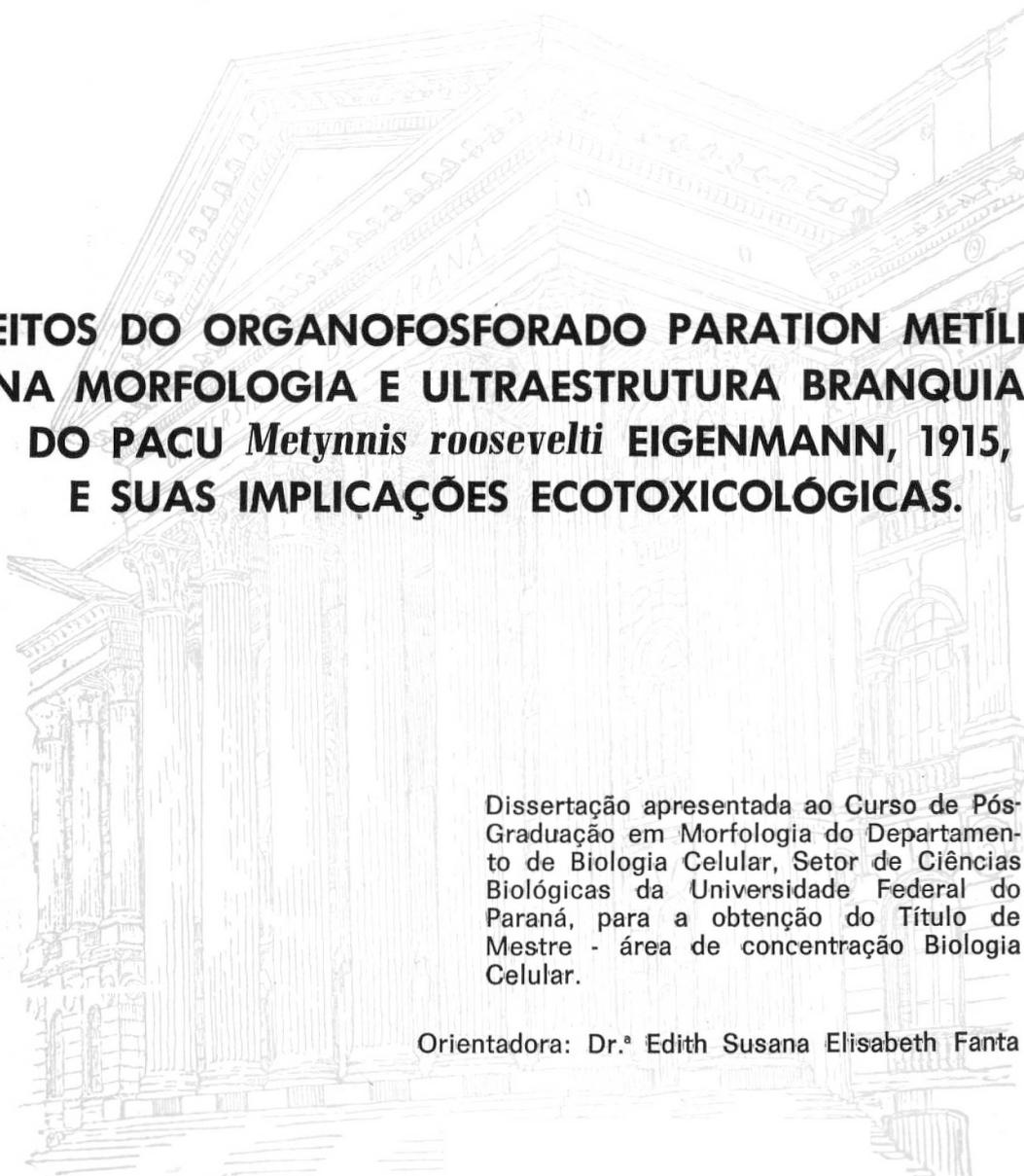


MARCELO RUBENS MACHADO



**EFEITOS DO ORGANOFOSFORADO PARATION METÁLICO
NA MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA BRANQUIAL
DO PACU *Metynnis roosevelti* EIGENMANN, 1915,
E SUAS IMPLICAÇÕES ECOTOXICOLÓGICAS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do Título de Mestre - área de concentração Biologia Celular.

Orientadora: Dr.^a Edith Susana Elisabeth Fanta

CURITIBA
1995

MARCELO RUBENS MACHADO

**EFEITOS DO ORGANOFOSFORADO PARATION METÍLICO
NA MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA BRANQUIAL
DO PACU *Metynnis roosevelti* EIGENMANN, 1915,
E SUAS IMPLICAÇÕES ECOTOXICOLÓGICAS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do Título de Mestre - área de concentração Biologia Celular.

Orientadora: Dr.^a Edith Susana Elisabeth Fanta

CURITIBA
1995

MARCELO RUBENS MACHADO

**EFEITOS DO ORGANOFOSFORADO PARATION METÁLICO NA
MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA BRANQUIAL DO PACU
Metynnis roosevelti EIGENMANN, 1915, E SUAS IMPLICAÇÕES
ECOTOXICOLÓGICAS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do Título de Mestre - área de concentração Biologia Celular.

Orientadora : Dra. Edith Susana Elisabeth Fanta.

CURITIBA

1995

Tempo rei, ó tempo rei, ó tempo rei
Transformai as velhas formas do viver !

G. Gil.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Edith Fanta pela orientação deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, na pessoa da professora Maria Célia Jamur, sempre disposta a contribuir com o trabalho dos pós-graduandos.

Ao governo deste país, que sob a forma de bolsa de estudo concedida pela CAPES, acreditou neste trabalho...e espero que de alguma forma eu possa ter retribuído.

Um especial agradecimento a personagens que, mesmo sem saber, participaram do roteiro desta história. A Stevie Ray Vaughan, um guitarrista fantástico que transformava notas musicais em sons humanos ; à companhia certa de um “grupinho” que está começando agora mas que já mostrou muita competência, os Rolling Stones ; ao Blues inebriante de Buddy Guy ; à estridente mas doce voz de Janis Joplin ; à contestação poética e sempre atual de Cazuza e, por fim, à genialidade na construção das palavras, de Gilberto Gil.

Aos amigos !!!

SUMÁRIO

Lista de ilustrações	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
2. Materiais e Métodos	14
2.1. Material Biológico.....	14
2.1.1. Espécie estudada.....	14
2.1.2. Acimação.....	15
2.2. Características da substância testada.....	16
2.3. Os testes de toxicidade.....	17
2.3.1. As concentrações utilizadas.....	17
2.3.2. A realização dos bioensaios.....	18
2.4. Coleta o material.....	19
2.5. Processamento histológico.....	19
2.5.1. Técnica para microscopia óptica.....	19
2.5.2. Técnica para microscopia eletrônica de varredura.....	20
3. Resultados	22
3.1. Comportamento normal do pacu <i>Metynnis roosevelti</i> (controle).....	22
3.2. Morfologia normal branquial do pacu <i>Metynnis roosevelti</i> (controle).....	22
3.3. Efeitos do organofosforado sobre o comportamento de <i>Metynnis roosevelti</i>	24
3.3.1. Bioensaio 7 ppm.....	24
3.3.2. Bioensaio 1 ppm.....	24
3.4. Efeito do organofosforado sobre o epitélio branquial de <i>Metynnis roosevelti</i>	25
3.4.1. Bioensaio 7 ppm.....	25
3.4.1.1. Tempo de exposição 1h.....	25
3.4.1.2. Tempo de exposição 4h.....	25
3.4.1.3. Tempo de exposição 8h.....	25
3.4.2. Bioensaio 1 ppm.....	25
3.4.2.1. Tempo de exposição 1h.....	25
3.4.2.2. Tempo de exposição 4h.....	25
3.4.2.3. Tempo de exposição 8h.....	26

3.4.2.4. Tempo de exposição 24h.....	26
3.4.2.5. Tempo de exposição 48h.....	26
3.4.2.6. Tempo de exposição 72h.....	26
3.4.2.7. Tempo de exposição 96h.....	26
4. Discussão.....	48
5. Conclusões.....	57
Apêndice 1. Soluções fixadoras e corantes.....	58
Apêndice 2. Processamento histológico para Microscopia Óptica.....	61
Processamento histológico para Microscopia Eletrônica de Varredura.....	61
Apêndice 3. Procedimento para coloração em Microscopia Óptica.....	63
6. Referências Bibliográficas.....	65

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Exemplar do pacu prata <i>Metynnis roosevelti</i>	21
Fig. 2 - Ambiente de realização dos bioensaios.....	21
Fig. 3 - Arco branquial de <i>Metynnis roosevelti</i> (MEV).....	28
Fig. 4 - Rastros e filamentos branquiais de <i>Metynnis roosevelti</i> (MEV).....	28
Fig. 5 - Lamelas respiratórias (MEV).....	28
Fig. 6 - Lamelas respiratórias e filamentos branquiais (MEV).....	29
Fig. 7 - Superfície do arco branquial (MEV).....	29
Fig. 8 - Detalhe de inserção de lamelas respiratórias (MEV).....	30
Fig. 9 - Microssaliências do epitélio do filamento (MEV).....	30
Fig. 10 - Base do filamento branquial (MO).....	31
Fig. 11 - Regiões secretoras de muco (MO).....	31
Fig. 12 - Região mediana do filamento branquial (MO).....	32
Fig. 13 - Detalhe de regiões interlamelares (MO).....	32
Fig. 14 - Base do filamento branquial (MO).....	33
Fig. 15 - Lamelas respiratórias (MO).....	33
Fig. 16 - Lamelas respiratórias em Bioensaio 7 ppm - 1h (MO).....	34
Fig. 17 - Desorganização das lamelas em Bioensaio 7 ppm - 1h (MO).....	34
Fig. 18 - Descolamento epitelial em Bioensaio 7 ppm 4h (MO).....	35
Fig. 19 - Alteração na secreção de muco em Bioensaio 7 ppm - 4h (MO).....	35
Fig. 20 - Hiperplasia. Bioensaio 7 ppm - 8h (MO).....	36
Fig. 21 - Detalhe de hiperplasia. Bioensaio 7 ppm - 8h (MO).....	36
Fig. 22 - Alterações nas lamelas respiratórias. Bioensaio 1 ppm - 1h (MO).....	37
Fig. 23 - Alterações nas células secretoras de muco (MO).....	37
Fig. 24 - Alterações no tecido lamelar. Bioensaio 1 ppm - 1h (MO).....	38
Fig. 25 - Alterações na secreção de muco. Bioensaio 1 ppm - 4h (MO).....	38
Fig. 26 - Alterações em células pavimentosas. 1ppm - 8h (MO).....	39
Fig. 27 - Alterações na secreção de muco. Bioensaio 1 ppm - 8h (MO).....	39
Fig. 28 - Desorganização das lamelas respiratórias. 1 ppm - 24h (MO).....	40
Fig. 29 - Diminuição da secreção de muco. Bioensaio 1 ppm 24h (MO).....	40
Fig. 30 - Enrugamento epitelial. Bioensaio 1 ppm - 24h (MEV).....	41
Fig. 31 - Alterações nas microssaliências. 1 ppm - 24h (MEV).....	41

Fig. 32 - Desestruturação das lamelas respiratórias. 1 ppm 48h (MO).....	42
Fig. 33 - Diminuição da secreção de muco. 1 ppm - 48h (MO).....	42
Fig. 34 - Enrugamento das lamelas. Bioensaio 1 ppm - 48h (MEV).....	43
Fig. 35 - Alterações epiteliais. Bioensaio 1 ppm - 48h (MEV).....	43
Fig. 36 - Descolamento epitelial. Bioensaio 1 ppm - 72h (MO).....	44
Fig. 37 - Alterações na secreção de muco. 1 ppm - 72h (MO).....	44
Fig. 38 - Alterações no filamento branquial. 1 ppm - 72h (MEV).....	45
Fig. 39 - Dobras da membrana celular. Bioensaio 1 ppm - 72h (MEV).....	45
Fig. 40 - Alterações no filamento e nas lamelas respiratórias. 1 ppm - 96h (MO).....	46
Fig. 41 - Descolamento epitelial. Bioensaio 1 ppm - 96h (MO).....	46
Fig. 42 - Modificações na forma das microssaliências. 1 ppm - 96h (MEV).....	47
Fig. 43 - Enrugamento e dobras das lamelas respiratórias. 1 ppm - 96h (MEV).....	47

RESUMO

As brânquias do pacu *Metynnis roosevelti* assemelham-se às da maioria dos teleósteos de água doce. O epitélio que reveste as lamelas respiratórias é simples pavimentoso, e sua superfície externa é lisa, sem microssaliências. O grande número de lamelas respiratórias e filamentos branquiais longos estão de acordo com o comportamento bastante ativo desta espécie. A pouca quantidade de células de cloreto, distribuídas apenas no epitélio do filamento branquial, sugere que as funções desempenhadas por estas células sejam realizadas também pelas células pavimentosas do epitélio respiratório. Células secretoras de muco, identificado como glicosaminoglicana ácida sulfatada e carboxilada, estiveram presentes nas regiões interlamelares.

Visando investigar os efeitos de um organofosforado sobre as brânquias de um peixe nativo, exemplares do pacu *Metynnis roosevelti* foram expostos a doses letais (7 ppm) e subletais (1 ppm) de Mentox 600 CE, cujo princípio ativo é o Paration metílico. Observações em Microscopia Óptica evidenciaram enrugamento do epitélio das brânquias, seguido de descolamento do epitélio respiratório e hiperplasia, caracterizada por multiplicação celular sobre a superfície respiratória dos peixes. Estas alterações, acompanhadas por hipersecreção de muco que foi encontrado por sobre as lamelas respiratórias, foram observadas em peixes expostos a 7 ppm do organofosforado e podem ter sido a causa da morte dos animais. Na concentração 1 ppm, as alterações foram semelhantes, mas surgiram após período de tempo maior. Nesta concentração, foi realizado um estudo ultraestrutural, através da Microscopia Eletrônica de Varredura, que indicou alterações na morfologia externa dos filamentos branquiais, como desorganização e conseqüente perda das microssaliências. Os resultados mostram que, mesmo em doses subletais, o organofosforado poderá levar o animal a sofrer conseqüências secundárias decorrentes das alterações da superfície de trocas gasosas e iônicas.

ABSTRACT

Gills are vital structures for fish, as they are the main site for gaseous exchange as well as partially responsible for osmoregulation, acid-base equilibrium, excretion of nitrogenous compounds and taste. To allow so many different functions they show many specialized cells and structures in the region of the arches and of the branchial filaments with respiratory lamellae. Gills of aquatic animals may indicate water quality as they are in close contact with the environment. Thus, chemicals in the water may alter the normal morphology of fish branchial cells that are, therefore, a useful model for environmental impact and ecotoxicology studies.

The gills of *Metynnis roosevelti*, the Brazilian native fish "Pacu", are similar to those of other Teleosts. Arches and filament epithelium is stratified and squamous cells at the surface are polygonal with concentric microridges. Microridges are not seen at the epithelial surface of respiratory lamellae. Chloride cells are rare and occur only at the filaments. Mucus secretory cells, in the interlamellar region, produce acid glycosaminoglycans.

In order to investigate the effects of an organophosphorous compound, Methyl Parathion, on the branchiae of fish, *Metynnis roosevelti* were exposed to a lethal (7 ppm) and a sublethal (1 ppm) concentration of Mentox 600 CE. Through optical and scanning electron microscopy the wrinkling of the branchial epithelium, followed by detachment and hyperplasia were observed. Externally, gill filaments presented the gradual disappearance of microridges.

One can conclude that, even in sublethal concentrations, the organophosphorates will diminish health and fitness of these fish. This is a consequence of secondary effects derived from important changes at the gill epithelium, responsible for providing adequate levels of oxygen and ionic balance of the whole organism.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes exibem enorme diversidade morfológica em sua biologia e nos habitats que ocupam, constituindo aproximadamente a metade de todas as espécies de vertebrados já descritas. Estes animais ocorrem dos mares polares até o Equador, desde a superfície até profundidades superiores a 9.000 metros, em poças de marés costeiras ou em lagos a mais de 4.500 metros de altitude, nos Andes. Vivem em águas abertas, em fundo arenoso, rochoso e lodoso, em fendas dos recifes de corais, em baías salgadas e estuários, em rios e lagos de água ácida ou alcalina, em águas de cavernas, em fontes quentes, ou em águas polares (ROMER e PARSONS, 1985).

Adaptações morfo-funcionais selecionadas ao longo da evolução foram necessárias para que os peixes obtivessem sucesso no povoamento de ambientes tão diversos. Em várias espécies, a bexiga natatória, órgão hidrostático que auxilia no ajuste de gravidade dos peixes em diferentes profundidades, pode contribuir no processo respiratório, servir como órgão de sentido, ou mesmo na produção de sons. Em outras espécies, fibras musculares modificadas emitem impulsos elétricos que podem atordoar presas e evitar predadores. Neste contexto adaptativo, entretanto, as brânquias dos peixes exercem papéis vitais, visto que, além de serem o principal sítio de trocas gasosas (HUGHES, 1966 ; HUGHES, 1982) também estão envolvidas nos processos de osmorregulação (GONZALES e McDONALD, 1992 ; FLIK e VERBOST, 1993 ; VERBOST et al., 1994), equilíbrio ácido-básico (EPSTEIN et al., 1980 ; EVANS et al., 1982 ; LIN e RANDALL, 1991 ; McDONALD et al., 1991 ; GOSS et al., 1992), excreção de compostos nitrogenados (GOLDSTEIN, 1982 ; EVANS e CAMERON, 1986 ; SAYER e DAVENPORT, 1987) e gustação (HUGHES, 1982).

Os arcos branquiais apresentam expansões, os rastros, direcionadas à cavidade faríngea, variando em forma, tamanho, quantidade e distribuição, para cada espécie. Servem para proteção dos filamentos branquiais¹ e, ainda, podem estar vinculados aos hábitos alimentares da espécie (EIRAS-STOFELLA, 1994).

Os peixes adquiriram grande eficiência na absorção do O₂ da água, graças à estrutura das brânquias, que permite um fluxo constante de água pelo epitélio respiratório, em qualquer estágio da respiração (PIIPER e SCHEID, 1982).

¹ Os termos filamentos branquiais e lamelas respiratórias, utilizados neste trabalho, são sinônimos de lamelas primárias e lamelas secundárias, respectivamente.

No processo respiratório dos peixes, os opérculos fecham-se e a cavidade bucal aumenta, permitindo a entrada de água pela boca. Simultaneamente, as câmaras branquiais aumentam de volume, produzem uma pressão negativa, e a água passa sobre as brânquias. Em seguida, a boca se fecha e as câmaras branquiais contraem-se forçando a água para fora através das aberturas operculares. Em resumo, a cavidade bucal e as câmaras branquiais atuam alternadamente como bombas de sucção e pressão, para manter um fluxo contínuo de água sobre as brânquias (ROMER e PARSONS, 1985).

A direção da corrente sanguínea nas lamelas respiratórias é oposta ao fluxo da água. O sangue, rico em CO_2 e pouco suprido de O_2 , que é trazido dos tecidos e bombeado pelo coração até as brânquias, passa entre as lamelas respiratórias em sentido contrário à passagem de água, possibilitando as trocas gasosas. Este mecanismo, chamado de contra-corrente, garante um suprimento de O_2 , mesmo que os peixes vivam em águas paradas e com pouco O_2 dissolvido (WITHERS, 1992).

Ainda que os estudos morfológicos e ultraestruturais tenham apontado para uma organização geral básica para as brânquias de peixes, as diferenças encontradas podem estar relacionadas a hábitos particulares de cada espécie. Em geral, peixes menos ativos têm a barreira água-sangue mais espessa que peixes de maior atividade (HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974).

A atividade dos peixes está diretamente relacionada ao tamanho de sua superfície branquial (HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974 ; DE JAGER e DEKKERS, 1975 ; GALIS e BAREL, 1980 ; PREIN e KUNZMANN, 1987).

DE JAGER e DEKKERS (1975) registraram que o primeiro estudo comparativo do aparelho respiratório de espécies bênticas e pelágicas somente ocorreu na década de 50. Durante esse período, as pesquisas atribuíram a maior atividade dos peixes à espessura da barreira água-sangue, à afinidade do sangue ao O_2 , à porcentagem de hemáceas no tecido muscular e ao desenvolvimento da cavidade opercular.

PREIN e KUNZMANN (1987), estudando duas espécies de peixes da mesma família e que vivem no mesmo habitat encontraram diferenças na morfologia branquial. A espécie mais ativa apresentou maior número de filamentos por arco branquial, além de mais lamelas por filamento.

Vários autores têm descrito a morfologia branquial de diversas espécies de peixes (HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974 ; HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1978 ; HUGHES, 1979 ; LEWIS e POTTER, 1982 ; COUGHLAN e GLOSS, 1984 ; DATTA-MUNSHI e HUGHES, 1986 ; METCALFE e BUTLER, 1986 ; HOSSLER et al., 1986 ; PREIN e

KUNZMANN, 1987 ; PERERA, 1993). Tais estudos evidenciam, basicamente, dois tipos de epitélio : epitélio branquial e epitélio respiratório ².

Revestindo o arco branquial, os rastros, os filamentos branquiais e as regiões interlamelares, encontra-se o epitélio branquial. Este epitélio é estratificado e composto por diversos tipos celulares, incluindo as células pavimentosas, as células secretoras de muco e as células de cloreto, além de botões gustativos e células de suporte não diferenciadas. O segundo tipo de epitélio é o chamado epitélio respiratório, o qual recobre as lamelas respiratórias. Geralmente, é constituído de uma única camada de células pavimentosas, através das quais ocorrem as trocas gasosas entre o sangue e o meio (EVANS et al., 1982).

É bastante comum encontrarmos na superfície externa das células que revestem o epitélio branquial, arranjos concêntricos de elevações da membrana, as microssaliências. Sugere-se que tais microssaliências estejam relacionadas com a retenção de muco sobre o epitélio, para protegê-lo de alterações ambientais. É menos comum, entretanto, a presença dessas microssaliências no epitélio respiratório (MALLATT, 1985).

PERERA (1993), estudando a ultraestrutura do epitélio branquial de *Scomber australasicus*, descreve, além das células epiteliais, das células de cloreto e das secretoras de muco, células contendo grânulos de secreção de diferentes formas e tamanhos, e localizadas próximas à superfície do epitélio.

As células secretoras de muco são descritas como células grandes e similares às encontradas na pele dos teleósteos. Há registros de desmossomos entre estas células e as células epiteliais adjacentes (PERERA, 1993), mas há poucos dados a respeito da constituição química das secreções e de suas funções na fisiologia branquial.

As células secretoras de muco são geralmente encontradas nos filamentos, mas o muco pode ser encontrado sobre o epitélio respiratório em peixes expostos à condições de estresse, sugerindo que a camada de muco proteja as superfícies lamelares contra agentes infecciosos, tóxicos e partículas em suspensão (MALLATT, 1985 ; POWELL et al., 1992).

O epitélio respiratório está apoiado sobre uma lâmina basal e esta sobre um grupo de células chamadas células pilares. O arranjo destas células permite a formação de canais

² Alguns autores utilizam as denominações epitélio primário e epitélio secundário para descrever os epitélios que revestem as lamelas primária e secundária, respectivamente. Neste trabalho optou-se pelas denominações epitélio branquial e epitélio respiratório para designar os epitélios que revestem os filamentos branquiais e as lamelas respiratórias, respectivamente.

por onde circula o sangue. Tais canais não são endotélios verdadeiros, pois não são revestidos por epitélio. São unicamente formados pelos prolongamentos citoplasmáticos das células pilares.

Filamentos contráteis semelhantes à actomiosina, encontrados no citoplasma das células pilares, sugerem uma função contrátil para estas células, e portanto, controladoras do fluxo e da pressão sanguínea. A proximidade destes filamentos contráteis a colunas de colágeno reforçam a idéia de um mecanismo ativo de controle da circulação sanguínea nas lamelas. As colunas de colágeno serviriam para resistir à distensão dos canais vasculares sanguíneos, tendo em vista que o sangue que passa pelas brânquias é diretamente bombeado do coração. As células pilares ainda podem ser influenciadas por reagentes transportados pelo sangue. Mudanças na estrutura destas células teriam considerável efeito na dinâmica cardio-vascular (BETTEX-GALLAND e HUGHES, 1973).

Os peixes apresentam a capacidade de manter a concentração osmótica de seu fluido corporal relativamente constante e, na maioria dos casos, diferente da concentração do meio externo. Na água doce, o fluido corporal de peixes teleósteos é hiperosmótico em relação ao meio, fazendo com que ocorra influxo de água do meio externo através dos epitélios corporais dos rins, intestinos e brânquias. Por outro lado, uma ocasional deficiência iônica é compensada em parte pela alimentação, mas principalmente pela absorção ativa de íons ao longo do epitélio branquial, através das células de cloreto. No ambiente marinho, entretanto, a situação é oposta e a diferença na concentração osmótica entre o sangue dos peixes e a água induz a uma perda de água para o meio, além de influxo de íons. Para compensar, os peixes marinhos ingerem grandes quantidades de água e reduzem o volume da urina. Mas juntamente com a absorção de água ocorre também a absorção de sais, que devem ser ativamente secretados para o meio (WITHERS, 1992).

Ainda que as primeiras investigações sobre os mecanismos de transporte de íons em peixes tenham ocorrido na década de 30, já se sabia que o principal sítio de regulação iônica eram as brânquias (EVANS et al., 1982). Entretanto, atualmente há ainda muita controvérsia a respeito dos possíveis mecanismos físico-químicos envolvidos no transporte de íons e das células que participam deste processo.

É certa, no entanto, a participação das células de cloreto neste processo. São células grandes, quando comparadas às demais células do epitélio branquial, e bastante ricas em mitocôndrias, o que as relaciona a processos de transporte ativo de íons. Estudos ultraestruturais descrevem as mitocôndrias em íntimo contato com um bem desenvolvido

sistema de membranas que parece estar envolvido no transporte de íons, uma vez que é acentuadamente desenvolvido quando a salinidade do meio aumenta (PISAM et al. 1987). Mecanismos morfofuncionais de ajuste à salinidade ambiental como migração de célula e alterações na superfície de contato com o meio também foram descritas (FANTA et al, 1995)

Um modelo hoje bastante aceito para explicar o transporte de íons em peixes de água doce é o que acopla a captação de Na^+ à excreção de NH_4^+ e H^+ , e a captação de Cl^- ao efluxo de HCO_3^- (EVANS, 1987). Este transporte ocorre nas células de cloreto e depende da enzima ATPase-Na-K, localizada na região basolateral das células de cloreto. Em peixes marinhos, a ação da enzima pode criar um potencial elétrico intracelular negativo, ao retirar íons Na^+ do citoplasma das células de cloreto. Tal carga negativa intracelular seria a responsável pela saída de Cl^- para o meio externo, e o excesso de Na^+ seria eliminado via rota paracelular, entre as células de cloreto.

Segundo GOSS et al. (1992), pouco certa também é a localização deste transporte de íons nas brânquias de peixes de água doce, visto que a população de células de cloreto nestes animais é bastante reduzida se comparada aos peixes de hábitat marinho. Baseados em estudos de microscopia eletrônica de transmissão, os autores propõem que o mecanismo de transporte de íons nas brânquias de teleósteos de água doce ocorra com a participação, além das células de cloreto, das células pavimentosas. Tais estudos, entretanto, requerem a confirmação de análises histoquímicas.

Os efeitos de poluentes em animais aquáticos podem ser avaliados em estudos populacionais, em particular através da avaliação da sobrevivência e do sucesso reprodutivo das populações. Entretanto, tendo em vista a necessidade dos animais aquáticos exporem ao ambiente grandes áreas de um tecido delicado, como as brânquias, estas podem servir como indicadores da qualidade da água (RANKIN et al., 1982).

Durante o processo respiratório, o fluxo de água que entra pela boca do peixe leva consigo agentes irritantes, dissolvidos ou suspensos na água. Os rastros impedem que agentes sólidos atravessem os filamentos branquiais, causando-lhes danos. Todavia, se os agentes encontrarem-se dissolvidos na água, inevitavelmente entrarão em contato com os filamentos branquiais e com as lamelas respiratórias e, em altas concentrações, poderão alterar a morfologia normal das brânquias (LUVIZOTTO, 1994).

Pesticidas orgânicos (DAVIS e WEDEMEYER, 1971 ; McBRIDE e RICHARDS, 1975 ; RAO e RAO, 1981 ; MALLATT, 1985 ; EVANS, 1987 ; LAURENT e PERRY, 1991 , NOWAK,

1992 ; WENDELAAR BONGA e LOCK, 1992), detergentes (SCHMID e MANN, 1961 ; ABEL, 1974 e 1976 ; BOLIS e RANKIN, 1980), ácidos (DAYE e GARSIDE, 1980 ; McDONALD, 1983 ; KAWALL, 1993), sais (HOSSLER, 1980 ; LUVIZOTTO, 1994 ; FANTA et al, 1995), despejos industriais (MITZ e GIESY, 1985 ; STOKER et al, 1985 ; LINDESJÖÖ e THULIN, 1994), amônia (SMART, 1976 , ARILLO et al., 1979 ; SODERBERG et al . 1984) e metais pesados (SKIDMORE, 1970 ; MATTHIESSEN e BRAFIELD, 1973 ; LOCK e van OVERBEEKE, 1981 ; ORONSAYE e BRAFIELD, 1984 ; OLIVEIRA RIBEIRO et al, 1994), além de provocarem alterações nos epitélios das brânquias, podem alterar a atividade da ATPase-Na-K, e dessa forma, o fluxo normal de íons.

Isso despertou o interesse de pesquisadores, que passaram a utilizar as brânquias de peixes como modelo para estudos de impacto ambiental (MALLATT, 1985 ; EVANS, 1987 ; McKIM e ERICKSON, 1991 ; LAURENT e PERRY, 1991 ; WENDELAAR BONGA e LOCK, 1992).

MALLATT (1985) realizou um levantamento estatístico sobre os tipos de respostas branquiais frente a agentes físicos e químicos presentes no ambiente. O autor, que analisou 130 publicações científicas, primeiramente listou a frequência de registro de cada tipo de lesão branquial. Em seguida utilizou estes dados para relacionar as lesões branquiais com a dose e o tipo do agente tóxico, a temperatura e o hábitat (marinho ou de água doce). Enfocando principalmente as regiões lamelar e interlamelar, as alterações morfológicas mais encontradas, pela ordem, foram : descolamento do epitélio, necrose, fusão lamelar, hipertrofia das células epiteliais, hiperplasia ou fusão das lamelas por crescimento celular, diminuindo a área de superfície respiratória, ruptura das células epiteliais, hipersecreção de muco, aneurisma lamelar, congestão vascular, proliferação de células secretoras de muco e de células de cloreto, infiltração de leucócitos no epitélio e alterações no espaço sanguíneo delimitado pelas células pilares. Com exceção dos metais pesados que em maior frequência provocaram necrose do epitélio branquial e hipersecreção de muco, não houve, ao menos estatisticamente, relação direta entre agentes irritantes e alterações branquiais, conclui o autor.

Para EVANS (1987), não está claro se os poluentes produzem diretamente os efeitos observados nos epitélios das brânquias, ou, mais provavelmente, que sejam alterações secundárias à ação dos poluentes em receptores ligados à membrana das células epiteliais.

LAURENT e PERRY (1991) consideram as alterações morfológicas das brânquias ocorridas durante mudanças ambientais como tentativas adaptativas de se conservar

algumas funções fisiológicas. Os autores relatam como variações na concentração de O_2 , NaCl e Ca^{+2} atingem a lamela respiratória dos peixes, a superfície apical das células de cloreto e as populações das células de cloreto e das células secretoras de muco. Sobre os efeitos de poluentes, os autores descrevem que alguns metais pesados, como o zinco, estimulam a proliferação de células de cloreto, pois aceleram a perda de íons pelo epitélio e dificultam sua absorção. O nitrito compete com o cloro pelos sítos de troca Cl^- / HCO_3^- , e a proliferação das células de cloreto seria um ajuste compensatório para manter a concentração interna de Cl^- em valor constante.

Biólogos têm publicado informações a respeito da morfologia das brânquias, suas funções e a dinâmica do fluxo de gases e íons. Em contrapartida, farmacologistas e toxicologistas, estudando a ação de drogas, divulgam suas descobertas sobre as características físico-químicas dos poluentes. Toxicologistas ambientais agrupam estas informações com o objetivo de compreender os mecanismos que controlam o movimento de substâncias químicas através das brânquias e de como a fisiologia branquial é afetada por estes compostos químicos (McKIM e ERICKSON, 1991).

NOWAK (1992) usou a distância de difusão respiratória para quantificar os efeitos do inseticida organoclorado Endosulfan sobre as brânquias de bagres. Foram observados edema, descolamento do epitélio respiratório e hiperplasia do epitélio branquial. Tais alterações resultaram em um significativo aumento da distância de difusão respiratória, afetando as trocas gasosas.

Os efeitos tóxicos provocados por pesticidas organoclorados em peixes podem estar relacionados à inibição da atividade da ATPase-Na-K (DAVIS e WEDEMEYER, 1971).

Os pesticidas organofosforados constituem uma classe de compostos que mostra uma grande toxicidade quando comparadas a outros pesticidas. O modelo de ação dos organofosforados está baseado na reação química direta com a enzima Acetilcolinesterase (AChE). Por ser responsável pela degradação da acetilcolina, esta inibição resulta numa estimulação excessiva dos nervos colinérgicos (De BRUIJN e HERMENS, 1993).

RAO e RAO (1981) investigaram os efeitos do organofosforado Paration metílico na síntese de derivados lipídicos, em diferentes tecidos de peixes (músculo, brânquia, fígado e cérebro). Suas análises quantitativas registraram decréscimo de lipídios totais e fosfolipídios, e acréscimo de ácidos graxos livres em peixes expostos a 0,09 ppm, por 48h (dose subletal). Os autores sugerem com estes resultados que houve maior requisição de energia pelos peixes nesta condição.

A toxicidade do Paration metílico é resultado de uma conversão metabólica, na qual o grupo P=S é convertido em P=O, processada no retículo endoplasmático dos hepatócitos. O composto formado, o Paraoxon, é o responsável pela inibição de vários sistemas enzimáticos (colinesterases, carboxilases, acetilcolinesterases e fosforilases oxidativas mitocondriais). A inibição da AChE é o efeito tóxico mais crítico, pois resulta no acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, interrompendo a transmissão neural. Ainda que reduções substanciais na atividade da AChE do cérebro de peixes não tenham sido fatais, o efeito desta condição em atividades como alimentação, reprodução e relações presa-predador não são conhecidas (EPA, 1986 ; SILVA, 1989).

SILVA (1989) e SILVA et al. (1992) investigaram os efeitos de doses subletais do organofosforado Folidol 600, cujo princípio ativo é o Paration metílico, no comportamento e na morfologia renal e hepática do tamboatá (*Callichthys callichthys*). Foram observadas alterações nos padrões comportamentais de motilidade, alimentação e respiração; lesões hepáticas e degeneração do epitélio tubular renal, além de inibição da colinesterase plasmática nos primeiros dias de intoxicação.

A acetilcolina tem a propriedade de excitar o sistema nervoso parassimpático e, somente pela sua presença, se dá a transmissão nervosa dos impulsos: das fibras paraganglionares aos gânglios autônomos; dos nervos colinérgicos pós-ganglionares aos músculos lisos, coração e células excretoras; dos nervos motores aos músculos estriados, além de certas estruturas do sistema nervoso central. A acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase quase que imediatamente, o que permite às sinapses transmitirem novamente o impulso. Desta forma, quando há inibição da acetilcolinesterase, há acúmulo de acetilcolina, provocando hiperexcitação do sistema nervoso (VERNALHA et al., 1977).

De um outro ponto de vista, são inegáveis a participação e a importância dos defensivos agrícolas na economia mundial, principalmente quando nos deparamos com a previsão de que a população mundial irá dobrar nos próximos vinte anos, se continuarem as atuais taxas de crescimento populacional.

Neste amplo campo de estudos de impacto ambiental, o controle dos riscos devidos à formulação, manipulação, uso e distribuição de substâncias químicas representa uma das principais preocupações em política ambiental na atualidade. Diversas medidas de controle têm sido propostas e implementadas por muitos países, baseadas na avaliação dos riscos e benefícios de substâncias ao homem e ao ambiente

Nas décadas de 40 e 50, a ciência e a tecnologia marcaram uma nova época no desenvolvimento agrícola, que destacou-se pela incorporação de tecnologias que promoveram o crescimento do PIB nos países desenvolvidos - somente no Japão, a riqueza aumentou 2,9 vezes. O desenvolvimento dos defensivos organossintéticos e o seu uso na agricultura foram marcantes nessa época. A propriedade inseticida do DDT foi descoberta em 1938, do 2,4-D em 1941, do BHC em 1942, do Aldrin e do Paration em 1948. O consumo destas substâncias aumentou em grande escala e os pesticidas agrícolas propiciaram um incremento significativo na produção agrícola de alimentos, através da redução das perdas ocasionadas por pragas, patógenos e plantas invasoras, entre outros (GOELLNER, 1987). Na década seguinte, entretanto, essas tecnologias começaram a ser questionadas em termos de seus efeitos na saúde humana e no ambiente.

Este consumo em grande escala, sem o devido treinamento dos aplicadores e dos envolvidos no seu transporte e armazenamento, resultou no aparecimento de problemas de intoxicação humana, contaminação do solo, ar e água, presença de resíduos nos alimentos, bioacumulação e efeitos adversos no ambiente. Só no Brasil, o consumo de defensivos agrícolas passou de 27.728 ton., em 1970, para 60.188 ton., em 1991 (GOELLNER, 1993). Em 1991, no Estado do Paraná, aconteceram 1.187 casos de intoxicação, dos quais 101 resultaram em mortes (ESPINOSA, 1993).

Segundo a Associação Nacional de Defesa Vegetal (ANDEF), uma consequência são as 3.500 ton. de embalagens plásticas de pesticidas produzidas somente na safra 1991/92. O destino delas não é menos preocupante: as margens de rios e córregos, poluindo o ambiente, quando não incineradas ou vendidas como sucatas sem qualquer controle (NICOLATO, 1994).

Os problemas relacionados aos efeitos ambientais adversos de pesticidas levaram ao desenvolvimento de metodologias para identificar, reconhecer, prevenir e minimizar tais efeitos. A importância de conceitos de análise de impacto ambiental foi reconhecida pela primeira vez em 1966, pelo Comitê de Ciência, Pesquisa e Desenvolvimento da Academia Nacional de Ciências dos EUA (GOELLNER, 1987).

Por avaliação de impacto ambiental entende-se um estudo destinado a identificar e interpretar as consequências de determinadas ações, entre as quais o uso de agrotóxicos, à saúde humana e do ambiente. Para tanto, cada país instituiu comissões multidisciplinares com características administrativas legais para avaliar o nível de periculosidade dessas substâncias para o homem e o ambiente (ZAGATTO, 1993).

A legislação brasileira de agrotóxicos, considerada moderna e rigorosa, é classificada entre as mais restritivas do mundo, nos aspectos de saúde pública e de meio ambiente. No anexo III da portaria normativa nº 139, de 21/12/1994, encontram-se os testes ecotoxicológicos exigidos para o registro de agrotóxicos, que são : testes para determinar as características físico-químicas do produto, como identificação molecular, solubilidade, pH, hidrólise, fotólise, densidade, entre outros ; testes de toxicidade para organismos não-alvo, como microrganismos, algas (*Chlorella vulgaris*), organismos do solo, abelhas, microcrustáceos (*Daphnia spp*), testes agudos, crônicos e de bioconcentração em peixes e aves ; estudos do comportamento do produto no solo ; testes de toxicidade para animais superiores (oral, inalatória e cutânea para ratos e coelhos) e avaliação do potencial genotóxico, embriofetotóxico e carcinogênico do produto em questão (MACHADO, 1992).

A constituição federal não se omitiu no prever a obrigatoriedade para o poder público no controle dos agrotóxicos, tendo sido mais abrangente ao não mencionar expressamente o termo agrotóxico, mas “substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e para o meio ambiente” (MACHADO, 1992).

A lei nº 4.785, de 6/10/1965, modificada pela lei 7.802 de 11/7/1989, obriga os produtores, importadores e exportadores de agrotóxicos a efetuar o registro desses produtos no Ministério da Agricultura. A portaria normativa 349, de 14/3/1990, dá competência ao IBAMA “para emissão e renovação do registro, para a extensão do uso de agrotóxicos e afins, bem como para avaliação e classificação dos agrotóxicos”.

Na avaliação do nível de periculosidade, os produtos são apenas classificados quanto à sua potencialidade tóxica e a alguns outros parâmetros ecotoxicológicos, não levando em consideração a concentração de exposição esperada do produto no ambiente, a qual é utilizada no procedimento de avaliação de risco ambiental. A portaria normativa nº 139, de 21/12/1994, determina que a classificação, quanto ao potencial de periculosidade, deve basear-se nos parâmetros bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico do produto, obedecendo à seguinte graduação : Produto altamente perigoso (Classe I) ; Produto muito perigoso (Classe II) ; Produto perigoso (Classe III) ; Produto pouco perigoso (Classe IV).

Para efeito de se atribuir uma classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico, são atribuídas, inicialmente, classificações individuais para cada parâmetro acima mencionado. Assim, um agrotóxico pode ser considerado pouco perigoso quanto à sua persistência no ambiente e altamente perigoso para organismos aquáticos. Desse modo, as classificações específicas, assim como a atribuição de uma

classificação final do produto, resultam de uma análise que se processa no âmbito de uma equipe técnica constituída por profissionais de diversas especialidades, bem como de consultas a publicações técnicas especializadas e a banco de dados .

Assim, uma nova ciência, a Ecotoxicologia, surgiu principalmente para atender a regulamentação cada vez mais exigente na área ambiental. Com o objetivo de verificar se o uso e a disposição de substâncias químicas causam problemas diretos ou indiretos para os ecossistemas, a ecotoxicologia vem estudando o comportamento e as transformações desses agentes químicos no ambiente, assim como seus efeitos sobre os organismos. Neste sentido, muita ênfase tem sido dada aos ecossistemas aquáticos pois, além das substâncias normalmente lançadas nestes sistemas, outras, provenientes do ar e do solo, podem eventualmente atingir o meio aquático na sua forma original ou como produto de transformação (BERTOLETTI, 1990).

Para melhor entender os efeitos de agentes químicos para a vida aquática, têm sido utilizados, nestas últimas décadas, testes de toxicidade com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e de campo (CAIRNS e DICKSON, 1973).

Como já exposto, uma série de estudos físico-químicos e os prováveis efeitos de um agrotóxico sobre diversos organismos, de bactérias a mamíferos, são exigidos por lei, para sua regulamentação e classificação. E fazendo parte destes estudos, estão os testes de toxicidade aguda para peixes, que foram objeto de investigação deste trabalho.

A utilização de testes de toxicidade para peixes surgiu primeiro na Grã-Bretanha, nas décadas de 20 e 30. Nestes estudos, os peixes eram expostos a águas de drenagem de minas de chumbo e zinco. Na década seguinte, apareceram os primeiros estudos recomendando o uso de testes com peixes para avaliar a toxicidade de despejos industriais. Mas foi somente na década de 60 que os testes de toxicidade aguda, com 96h de duração, foram padronizados dentro de metodologias em Toxicologia Aquática (BERTOLETTI, 1990).

No Brasil, os laboratórios credenciados pelo IBAMA a realizarem os testes de toxicidade utilizam uma normatização divulgada pela Associação Brasileira de Normas e Técnicas, a ABNT. Na **NBR 12714**, fatores abióticos como água, temperatura, O₂ dissolvido, luminosidade, e fatores bióticos como aclimatação e sensibilidade são considerados (ABNT, 1993).

Os testes de toxicidade aguda simulam, em laboratório, uma situação ambiental na qual o organismo é exposto, durante curto período de tempo, a concentrações elevadas de um

agente tóxico. Para este teste, há três tipos de sistemas, utilizados conforme as características físico-químicas do produto em questão : sistema estático, no qual não há renovação da solução teste ; sistema semi-estático, com renovação periódica da solução; e o sistema de fluxo contínuo, com renovação contínua da solução teste.

As espécies de peixes indicadas para estes bioensaios são *Poecilia reticulata*, *Hemigrannus marginatus*, *Cheirodon notomelas* e *Brachydanio rerio*, sendo que este último é amplamente utilizado graças à sua fácil manutenção em condições laboratoriais.

Nos testes de toxicidade aguda são testadas várias concentrações de um mesmo agrotóxico, em aquários com características bióticas e abióticas idênticas. Ao término de um teste é elaborado um relatório no qual, entre outras informações, devem constar a concentração mínima do agente tóxico letal a 100% dos organismos e a concentração máxima que não causa mortalidade. No entanto, é necessário dispor de métodos estatísticos para estimar um único valor que represente o conjunto dos dados gerados. Normalmente, o valor obtido num teste de toxicidade aguda é a CL 50 (concentração letal a 50% da população), sendo este o valor utilizado na prática. Com o estabelecimento de limites de confiança da CL 50, assegura-se que a verdadeira CL 50 esteja compreendida num determinado intervalo de concentrações.

A tabela de classificação de agrotóxicos, segundo a CL 50 para organismos aquáticos, foi elaborada por um grupo de consultores contratados pelo IBAMA, em 1990, quando foi iniciada a atividade de avaliação do potencial de periculosidade ambiental para agrotóxicos no Brasil.

CL 50 (ppm)	Fator	Classificação
> 100	4	praticamente não tóxico
10 - 100	3	pouco tóxico
0,1 - 10	2	moderadamente tóxico
< 0,1	1	altamente tóxico

Entretanto, é consenso de que a CL 50 é um dado preliminar que apenas oferece uma idéia a respeito da toxicidade de um agrotóxico aos peixes e outros organismos. Com este problema em mãos, este trabalho investigou mais aprofundadamente a questão dos bioensaios agudos, utilizando para isso, ferramentas da Biologia Celular.

Isso exposto, são as seguintes as propostas deste trabalho :

1. Oferecer dados a respeito da morfologia branquial normal do pacu *Metynnis roosevelti*, uma espécie nativa de nossos rios.
2. Descrever os efeitos do organofosforado Paration metílico sobre as brânquias de *Metynnis roosevelti*, submetidos a bioensaios, através de análises em Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Material Biológico.

2.1.1 - Espécie estudada.

Para realizar os experimentos propostos neste trabalho, optou-se pela espécie *Metynnis roosevelti* EIGENMANN, 1915, peixe vulgarmente conhecido por pacu prata, pacu prateado ou pacu caranha (Figura 1). Segundo FOWLER (1950), essa espécie é encontrada nas bacias dos rios Paraná e Paraguai, não atingindo mais do que 12 cm de comprimento. Há, entretanto, exemplares com cerca de 20 cm de comprimento no museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina.

Nos bioensaios, foram utilizados exemplares de *Metynnis roosevelti* medindo entre 4,0 e 5,0 cm de comprimento total, com peso médio de 3,0 g. Provenientes de estações de piscicultura do Estado de São Paulo, foram obtidos junto a estabelecimentos comerciais especializados.

Segundo a classificação apresentada por GÉRY (1977), o pacu *Metynnis roosevelti* pertence à família Serrasalminidae. Seu corpo é comprimido na forma de um disco, semelhante aos peixes disco da família dos ciclídeos. Os hábitos alimentares podem ser usados para dividir os serrasalmídeos em três pequenos grupos naturais : os pacus (subfamília Mileinae), vegetarianos ; as piranhas e as pirambebas (subfamília Serrasalminae) que são carnívoras ; e as espécies que formam uma terceira subfamília (Catoprioninae), representada por espécies que se alimentam das escamas de outros peixes, e que, provavelmente, evoluíram de um ancestral de hábito semi-parasita. Os serrasalmídeos habitam a América do Sul tropical e subtropical, com exceção dos rios costeiros do sudeste brasileiro e dos Andes (GÉRY, 1977).

Ainda que seja uma família de grande importância econômica (espécies dos gêneros *Piaractus* e *Colossoma* são amplamente utilizados em estações de piscicultura, com a finalidade de repovoamento de rios e produção de alimento), seus estudos taxonômicos apresentam problemas. A maioria das descrições de gênero e espécies foi realizada no final do século passado, e os métodos deficientes de coleção e preservação dos exemplares da época resultaram em descrições pobres que dificultam a análise dos dados nos dias de hoje (MACHADO - ALLISON, 1983).

GÉRY (1977) coloca em dúvida a identificação de várias espécies do gênero *Metynnis*. Segundo o autor, *Metynnis roosevelti* é sinonímia de *Metynnis lippincottianus*.

As dúvidas a respeito da Taxonomia da família podem ser elucidadas através da análise citogenética das espécies. AREFJEV (1990), que identifica o gênero *Metynnis* como pertencente à família Characidae, apresentou o cariótipo somático de quatro espécies usualmente cultivadas em aquários. O autor, que também identifica *M. roosevelti* como sinonímia de *M. lippincottianus*, utilizou células branquiais para seu estudo citogenético. Baseado em dados do cariótipo desta espécie, na qual descreveu 62 cromossomos, e de outras três espécies, o autor propõe uma árvore filogenética onde os serrasalmídeos se originaram da família Characidae.

A família Characidae é uma das mais variadas do ponto de vista citogenético, e a análise detalhada do processo evolutivo e das relações taxonômicas dos seus representantes depende da coleta de dados de um maior número de espécies e da utilização da técnica de bandeamento dos cromossomos (AREFJEV, 1990).

A posição sistemática do pacu *Metynnis roosevelti* adotada neste trabalho e confirmada por GIESSMANN (1994) é :

Classe OSTEICHTHYES

Sub-Classe ACTINOPTERYGII

Ordem CYPRINIFORMES

Sub-Ordem CYPRINOIDEA

Família CHARACIDAE

Sub-Família SERRASALMINAE

Gênero *Metynnis*

Espécie *Metynnis roosevelti*

2.1.2 - Aclimação

Foram colocados, aleatoriamente, 10 exemplares de *Metynnis roosevelti* em aquários de 30 litros de capacidade, contendo água previamente purificada em 4 filtros de celulose e carvão ativado. Para evitar a contaminação dos peixes por agentes microbianos, a água permaneceu estocada nos aquários por 10 dias, aerada continuamente por compressores da marca Beta, e aquecida até 25 °C por aquecedor de 50 w controlado por termostato eletrônico. Tais cuidados são necessários para se

evitar a contaminação dos peixes pela Ictiofitiríase. Esta enfermidade, provocada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, que desde suas fases iniciais atinge as brânquias, ocorre com maior frequência em águas frias, desaparecendo após três dias, caso o protozoário não encontre hospedeiros (FERRAZ DE LIMA et al., 1991).

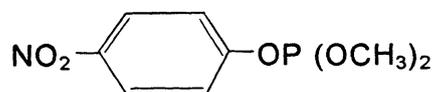
O pH da água foi de 7,0 e o fotoperíodo de 8 h diárias de luz “dia”. Os animais foram alimentados uma vez ao dia, 1 h após o início do período iluminado, com alimento industrializado à base de farinha de peixe e de camarão. Para se evitar o acúmulo de comida no fundo do aquário, o que poderia provocar a proliferação de bactérias, o alimento deveria ser consumido em aproximadamente 3 minutos. Durante a alimentação, o compressor de ar era desligado.

Nestas condições, os pacus permaneceram por duas semanas, antes do início dos bioensaios. Tal período de aclimação serviu para observação de comportamento - procura de alimento, atividade e modo de natação - feito de modo descritivo, além de possíveis enfermidades.

A fim de evitar contaminação ambiental, os aquários foram acondicionados em capela de exaustão de gases, na qual foi colocado um anteparo para se evitar interferências no comportamento natural dos peixes, que puderam ser observados através de frestas.

2.2 - Características da Substância Testada.

Exemplares de *Metynnis roosevelti* foram intoxicados com Mentox 600 CE, produzido pela Indústria Química Mentox LTDA. O produto é um inseticida organofosforado com grande amplitude de ação contra as principais pragas que atacam as culturas de algodão, alho, arroz, batata, café, cebola, citrus, feijão, fumo, milho, soja, tomate e trigo. O inseticida contém, em sua fórmula, 600 g/l do ingrediente ativo Paration metílico, descoberto na Alemanha em 1952, e produzido pela Bayer. O produto puro é sólido, branco cristalino, com ponto de fusão entre 35 °C e 36 °C e densidade de 1,358 a 25 °C. É pouco solúvel em água (25 ppm), mas é estável. Seu peso molecular é 263,2, sua fórmula bruta é $C_8H_{10}NO_5PS$, e sua fórmula estrutural é : (VERNALHA, 1977)



O Paration metílico é um dos vários pesticidas organofosforados desenvolvidos para substituir os pesticidas organoclorados. Isso porque os organofosforados são menos persistentes no ambiente, além de terem uma grande afinidade pela matéria orgânica, sendo adsorvidos a sedimentos e material particulado em suspensão (EPA, 1986).

O produto formulado utilizado nos experimento foi fornecido pela própria Indústria Mentox ; é incolor, líquido e com cheiro bastante forte.

2.3 - Os Testes de Toxicidade.

Os experimentos foram realizados em três aquários, cada um com capacidade para 30 litros (50 x 30 x 20 cm), com as faces laterais e posterior revestidas por papel "contact" de côr verde, para melhor adaptação dos animais (FANTA, 1995), os quais foram distribuídos da seguinte maneira : um aquário controle contendo água limpa (sem contaminante), e dois aquários-teste com a mesma concentração do organofosforado. Uma vez que as condições ambientais podem afetar a sensibilidade ao agente tóxico, os testes toxicológicos foram conduzidos sob condições abióticas pré-determinadas e constantes : temperatura a 25 °C (± 1 °C) ; pH 7,0 ; aeração permanente (compressores elétricos) e fotoperíodo de 8 h de luz "dia". Os animais foram alimentados 1 h após o início do período iluminado. Estas condições foram idênticas para os aquários experimentais e controle.

Os experimentos foram conduzidos no laboratório da Pós-graduação em Biologia Celular da UFPR (Figura 2).

2.3.1 - As concentrações utilizadas.

Foram testadas as concentrações de 7ppm (7 μ l / litro) e 1ppm (1 μ l / litro) do organofosforado em *Metynnis roosevelti*. Os critérios usados para a escolha dessas concentrações do inseticida basearam-se em informações obtidas junto à empresa distribuidora do Mentox 600 CE. Segundo estas informações, a concentração que mata 50% dos animais em testes de toxicidade (CL 50) para este produto, em *Brachydanio rerio*, foi de 8,5 ppm (8,50 μ l / litro), em ensaios agudos (96 h), e a concentração onde

houve o menor número de indivíduos mortos (1 peixe em 96 h de exposição) foi de 7 ppm, vindo daí o interesse nesta concentração. Já a concentração de 1 ppm foi escolhida por ter sido a menor concentração utilizada no estudo fornecido pela empresa.

Tais dados fornecidos pela empresa são resultados de testes de toxicidade em *Brachydanio rerio*, realizados por laboratórios credenciados pelo IBAMA, que os utiliza na elaboração de relatórios necessários para classificar um produto, quanto ao seu grau de toxicidade.

2.3.2 - A realização dos bioensaios.

O produto foi diluído em uma amostra de 100 ml da água do aquário para, em seguida, esta solução ser vertida no aquário-teste. Este procedimento foi realizado para os dois aquários-teste, ao mesmo tempo.

Para este estudo, optou-se pela realização de 3 bioensaios :

1° Bioensaio : Foi testada a concentração de 7 ppm do inseticida Mentox 600 CE. Nesta concentração, foi coletado o 2° arco branquial direito de animais expostos por 1h, 4h e 8h, sendo sacrificados 2 animais em cada tempo, tanto animais experimentais como controles. As brânquias coletadas foram utilizadas para estudo em Microscopia Óptica.

2° Bioensaio : Neste experimento, foi coletado o 2° arco branquial direito de peixes expostos ao inseticida, na concentração de 1 ppm, nos seguintes tempos após a contaminação : 1h, 4h, 8h, 24h, 48h, 72h e 96h. O material controle foi coletado nos tempos 1h, 8h, 24h, 48h e 96h. Posteriormente, as brânquias foram analisadas em Microscopia Óptica.

3° Bioensaio : Neste bioensaio, realizado para obtenção de material a ser analisado em microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi usada a concentração de 1 ppm, em peixes expostos por 24h, 48h, 72h e 96h ao produto. Os exemplares do aquário controle foram sacrificados nos mesmos tempos.

2.4 - Coleta do Material

Após os tempos de experimentação, os peixes foram submetidos à secção medular e sacrificados. Com o auxílio de um conta gotas, o fixador foi gotejado sobre os arcos branquiais, antes da dissecação, a fim de evitar o processo de autólise.

A coleta do material foi realizada com o auxílio de pinças e tesouras. Após sua retirada, os arcos branquiais foram mantidos em placas de Petri, banhados em solução fixadora, sob uma lamínula. Tal procedimento teve como objetivo alinhar os filamentos branquiais, de forma a permitir um melhor direcionamento dos cortes histológicos. Este procedimento teve continuidade mesmo após a retirada do fixador, quando as brânquias permaneceram em álcool 70%.

2.5 - Processamento Histológico.

As brânquias de *Metynnis roosevelti* foram estudadas através de técnicas histológicas de Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura, para identificação da morfologia normal e da morfologia alterada pelos efeitos do organofosforado Paration metílico, ao longo do tempo de exposição.

2.5.1 - Técnica para Microscopia Óptica.

O 2º arco branquial direito foi utilizado para este estudo. As brânquias foram fixadas em líquido de Bouin (BÜCHERL, 1962), por 8h, passando em seguida por sucessivas lavagens em álcool 70% para retirada do ácido pícrico. Em seguida, foram desidratadas em série alcoólica (etanol) crescente, diafanizadas em xilol (PA), impregnadas e incluídas em "Paraplast Plus" (Sigma®).

Os blocos trimados foram cortados em micrótomo Leitz Wetzlar, obtendo-se cortes de 2 a 3 µm de espessura. Os cortes foram aderidos à lâmina de vidro com albumina de Meyer (CULLING et al, 1985), esticados em placa aquecedora e secos ao ambiente antes da coloração.

Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (BÜCHERL, 1962) para descrição morfológica e azul de Alcian (CHAYEN e BITENSKY, 1991) pH 1,0 e 2,5 para identificação de células produtoras de mucopolissacarídeos, ou também chamados de glicosaminoglicanas. No pH 2,5 o corante identifica mucopolissacarídeos com grupos ácidos carboxilados (COOH), enquanto que os sulfatados (OSO₃H) coram-se fracamente. Já no pH 1,0 as carboxilas não são ionizadas e não coram-se, demonstrando apenas os grupos sulfato.

A montagem das lâminas permanentes foi feita com resina Poly-Mount (Poly Sciences, Inc.), seguida de secagem em temperatura ambiente. As lâminas foram estudadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BH-2, do Laboratório de Impacto Ambiental da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e o filme utilizado foi Kodakcolor Gold Plus (35 mm, asa 100).

2.5.2 - Técnica para Microscopia Eletrônica de Varredura.

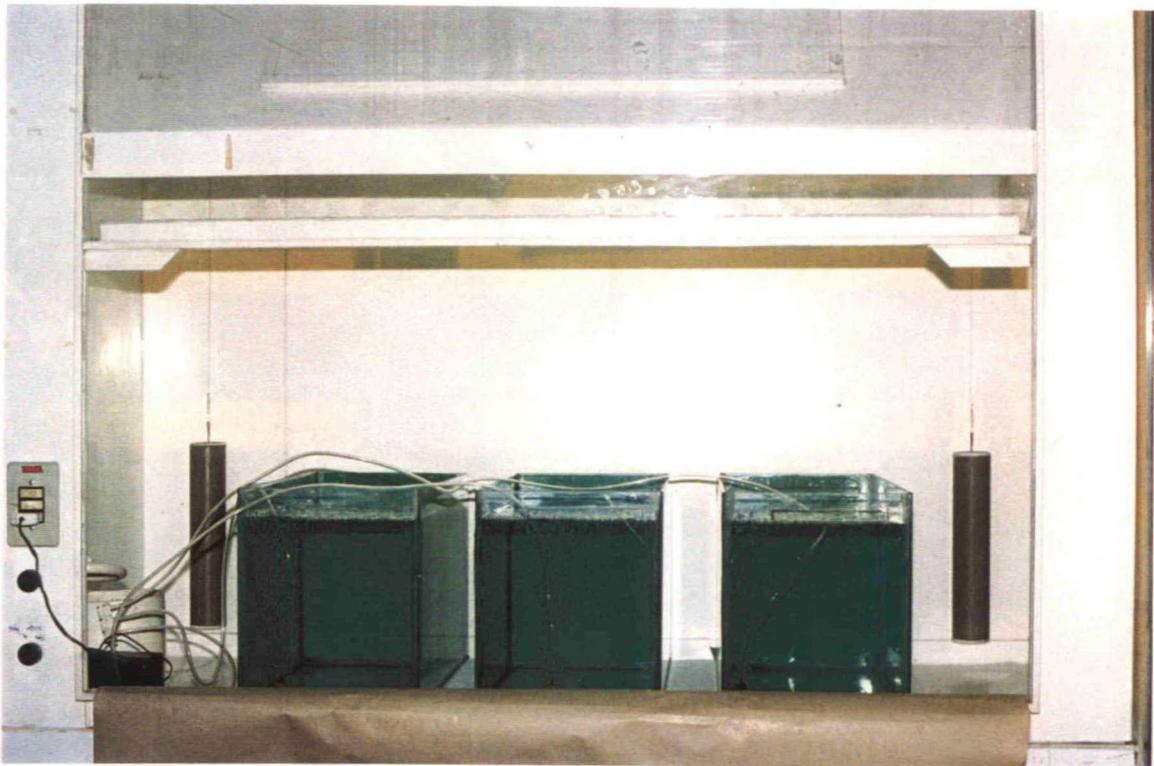
O 2º arco branquial esquerdo foi fixado em glutaraldeído 2,5%, diluído em tampão Cacodilato a 0,2 M e pH 7,4, a 4 °C, "overnight". Em seguida, o material foi lavado em tampão Cacodilato 0,5 M, pH 7,4, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 4%, diluído em tampão Cacodilato 0,2 M, pH 7,4, por 1h a 4 °C. Novamente foi submetido ao mesmo tampão de lavagem, sendo em seguida desidratado em série alcoólica (etanol) crescente - 50%, 70%, 90% e 100% (2x) - 10 minutos em cada etapa.

O ponto crítico foi obtido em instrumento Balzers CPD 030, a metalização em ouro com aparelho Balzers SCD 050 e a observação foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 5300, do Centro de Microscopia Eletrônica, na Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

1. As soluções fixadoras e corantes estão descritos no **Apêndice 1**.
2. Os roteiros para processamento histológico de M.O e MEV estão no **Apêndice 2**.
3. Os roteiros para coloração das lâminas estão descritos no **Apêndice 3**.

Figura 1 - Exemplar do pacu prata *Metynnis roosevelti*.

Figura 2 - Capela com aquários onde foram realizados os testes de toxicidade, no laboratório da Pós-graduação em Biologia Celular - UFPR.



3. RESULTADOS

3.1 - Comportamento Normal do Pacu *Metynnis roosevelti* - Controle.

A análise descritiva do comportamento do pacu *Metynnis roosevelti* demonstrou que são peixes de grande atividade, nadando constantemente próximos ao substrato e aproveitando os lados de maior comprimento do aquário. Muitas vezes, nadaram como se estivessem deitados, tocando a lateral do corpo na superfície do vidro. Todos os peixes procuraram alimento na superfície, assim que o compressor de ar era desligado, indicando comportamento condicionado.

Não foram observadas reações de agressão, territorialismo e canibalismo.

3.2 - Morfologia Normal Branquial do Pacu *Metynnis roosevelti* - Controle.

As brânquias de *Metynnis roosevelti* constituem-se de 4 pares de arcos branquiais cartilagosos, distribuídos em ambos lados da faringe. Toda a estrutura branquial encontra-se dentro de um compartimento denominado de câmara branquial comum, que se comunica com o meio externo através de aberturas laterais recobertas por opérculos. Os arcos são levemente curvados (Figura 3) e apresentaram tamanho médio de 7mm em seu eixo maior

Em toda a extensão do arco branquial observaram-se os rastros branquiais, que são projeções do arco distribuídas em fileiras. Na fileira voltada para o meio externo, portanto para o opérculo, os rastros são longos, curvados e com muitas pequenas saliências. Na fileira de rastros voltados para a cavidade faríngea, eles são bem menores (Figura 4). Cada arco branquial sustenta 2 fileiras de numerosos filamentos branquiais, que compõem a porção respiratória das brânquias.

Os filamentos apresentaram comprimento variável conforme a sua localização no arco branquial. Em *Metynnis roosevelti*, os filamentos maiores foram encontrados próximo à extremidade dos arcos, enquanto que na região central, foram menores. Foram encontradas ainda diferenças no tamanho dos filamentos de uma mesma região do arco, de hemibrânquias opostas.

Transversalmente aos filamentos, localizam-se as lamelas respiratórias, que são delicadas projeções dos filamentos em forma de um triângulo irregular (Figuras 5 e 6). As lamelas, distribuídas em ambos os lados dos filamentos, se apresentaram menores nas regiões basal e apical dos filamentos, e maiores na região intermediária.

O eixo central cartilaginoso que sustenta os filamentos e onde são encontrados os rastros é revestido por um epitélio estratificado que, na sua superfície externa, apresentou-se como um mosaico formado por células poligonais, nas quais havia microssaliências que se apresentaram de forma concêntrica. O epitélio era levemente ondulado, com pregas e regiões aprofundadas. Ainda na sua superfície externa, foram encontrados poros de pequeno diâmetro entre os bordos de células epiteliais adjacentes que podem representar o ápice de células de cloreto (Figura 7).

Os filamentos branquiais também apresentaram-se revestidos por um epitélio estratificado com superfície externa formada por células poligonais com microssaliências concêntricas (Figuras 8 e 9). Entretanto, sua superfície era bem menos ondulada do que a superfície do eixo central. Raríssimas foram as células de cloreto, que só foram identificadas ao microscópio eletrônico de varredura na região central do filamento entre os bordos das células epiteliais do filamento. O ápice das células de cloreto com microvilosidades foi observado entre os bordos das células epiteliais do filamento (Figura 9).

na região dos filamentos, entre as lamelas branquiais, foram encontradas células produtoras de mucopolissacarídeos, sendo seu produto de secreção lançado na superfície lamelar. Através da reação histoquímica com o corante azul de Alcian, identificou-se que os produtos liberados são glicosaminoglicanas ácidas sulfatadas e carboxiladas, havendo um predomínio destas últimas, uma vez que foram observadas reações positivas para o corante azul de Alcian pH 2,5, em contraste à reação fracamente positiva frente ao pH 1,0 deste mesmo corante (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Transversalmente ao epitélio estratificado, formador dos filamentos branquiais, projetaram-se as lamelas respiratórias, formadas por um epitélio próprio, simples e pavimentoso, que permite as trocas gasosas. Na superfície externa deste epitélio não foram encontradas as microssaliências, mas foi evidente uma região de transição entre filamento e epitélio (Figura 8). As lamelas respiratórias apresentaram-se como uma estrutura epitelial muito delicada, sustentadas por células pilares, que através de seus prolongamentos citoplasmáticos, delimitaram os espaços sanguíneos nos quais foram encontradas hemáceas (Figura 14 e 15). As células pavimentosas, que formam o epitélio

das lamelas respiratórias, apresentaram um grande núcleo central (Figura 15). As células pavimentosas são bastante finas, sendo que algumas podem apresentar núcleo saliente (Figuras 8 e 15).

3.3 - Efeitos do Organofosforado sobre o Comportamento de *Metynnis roosevelti*.

Peixes expostos ao organofosforado Paration metílico apresentaram mudanças comportamentais, analisadas por método descritivo.

3.3.1 - Bioensaio 7ppm : A concentração de 7ppm mostrou-se letal para *Metynnis roosevelti*, pois os peixes morreram após 24h de exposição ao Paration metílico. Nesta concentração, as alterações comportamentais foram mais dramáticas e apareceram em espaço de tempo mais curto. Os peixes reagiram logo nos primeiros 15 minutos de contaminação ao organofosforado. Diminuíram sua atividade de natação e procuraram ficar próximos à superfície. Em seguida, pôde-se observar aumento dos movimentos respiratórios e subsequente perda de equilíbrio. Após 1h de contaminação, alguns peixes apresentaram letargia, deixando-se levar passivamente pelo movimento da água provocado pelo borbuhador. A perda de equilíbrio e a respiração ofegante foram comuns a todos os peixes expostos a essa concentração. As respostas comportamentais foram mais dramáticas após paralisia dos movimentos respiratórios (8h). Os peixes nadaram com a boca bastante aberta, o que permitia a entrada de água pela cavidade bucal, possivelmente atingindo a região respiratória das brânquias.

2 - Bioensaio 1ppm : Não ocorreram mortes após 96h de exposição ao fosforado e, portanto, a concentração de 1ppm foi subletal para *Metynnis roosevelti*. Entretanto, nas primeiras 8h, algumas alterações comportamentais foram observadas. Durante essas primeiras 8h, os animais permaneceram próximos à superfície, não formaram grupos e a diminuição da atividade foi evidente. Os peixes ficaram a maior parte do tempo em repouso, enquanto seus movimentos respiratórios estiveram acelerados. Houve recuperação e aparente retorno à normalidade no período subsequente de exposição, até completar 96h.

3.4 - Efeito do Organofosforado sobre o Epitélio Branquial de *Metynnis roosevelti*.

3.4.1 - **Bioensaio 7ppm**

3.4.1.1 - **Tempo de exposição 1h** : Foi observada desorganização das lamelas respiratórias e do epitélio interlamelar, além de enrugamento do epitélio das lamelas respiratórias. Maior secreção de muco e sua subsequente localização sobre a superfície das lamelas respiratórias puderam ser observadas ao microscópio óptico, em material corado em azul de Alcian pH 2,5 (Figuras 16 e 17).

3.4.1.2 - **Tempo de exposição 4h** : Descolamento em ambos lados das lamelas respiratórias e pouca presença de células secretoras de muco foram registrados após 4h (Figura 18 e 19).

3.4.1.3 - **Tempo de exposição 8h** : Foi bastante frequente o aparecimento de regiões com hiperplasia, que se caracteriza por proliferação celular sobre a superfície das lamelas respiratórias (Figuras 20 e 21).

3.4.2 - **Bioensaio 1ppm** : Foram identificadas alterações morfológicas celulares no epitélio branquial de *Metynnis roosevelti* expostos ao Paration metílico nos tempos 1h, 4h, 8h, 24h, 48h, 72h e 96h.

3.4.2.1 - **Tempo de exposição 1h** : De uma forma geral, todo tecido branquial apresentou-se alterado. Ao microscópio óptico, o epitélio da região interlamelar apresentou-se irregular. O epitélio das lamelas apresentou-se mais estreito e o núcleo de suas células mais achatado do que o normal. Dobras neste epitélio também foram observadas. As células pilares sofreram alterações e, por consequência, a forma dos espaços sanguíneos. As hemáceas apresentaram nítida alteração na forma do núcleo e no contorno celular. (Figuras 22 e 23).

3.4.2.2 - **Tempo de exposição 4h** : Observou-se degeneração das células que constituem as lamelas e a região interlamelar. Os espaços sanguíneos não foram visualizados, e as hemáceas tornara-se fracamente coradas pela eosina. O grau de

alterações das regiões produtoras de muco permaneceu semelhante ao observado em 1h (Figuras 24 e 25).

3.4.2.3 - Tempo de exposição 8h : As lamelas respiratórias apresentaram-se bastante estreitadas, e em algumas regiões do epitélio lamelar já não foram observados os núcleos das células pavimentosas. O citoplasma das hemáceas corou-se muito fracamente pela eosina. A coloração azul de Alcian pH 2,5 evidenciou a presença de muco na superfície das lamelas respiratórias (Figuras 26 e 27).

3.4.2.4 - Tempo de exposição 24h : O enrugamento do epitélio das lamelas e a subsequente desorganização da estrutura lamelar foram bastante comuns. Observou-se também a constrição dos espaços sanguíneos. As células secretoras de muco foram mais escassas. A observação em microscopia eletrônica de varredura indicou desorganização e diminuição das microssaliências na superfície das células epiteliais do filamento, além de enrugamento generalizado nas lamelas (Figuras 28, 29, 30 e 31).

3.4.2.5 - Tempo de exposição 48h : O nível de degeneração dos tecidos foi semelhante ao observado em 24h, merecendo destaque a mais fraca reação, principalmente das hemáceas, ao corante eosina, e a difícil localização de espaços sanguíneos íntegros e de células secretoras de muco. Em MEV observaram-se ainda as lamelas enrugadas, além do reaparecimento de microssaliências no epitélio do filamento. Tais microssaliências apresentaram um aspecto irregular e descontínuo, contrastando com a figura mostrada no epitélio branquial de peixes controle (Figuras 32, 33, 34 e 35).

3.4.2.6 - Tempo de exposição 72h : Neste tempo de exposição foi observado descolamento do epitélio das lamelas, além da ausência de células secretoras de muco. A alteração mais evidente foi observada no epitélio do filamento. Ao MEV, na região de algumas células epiteliais, que no tempo 48h apresentaram microssaliências irregulares, apareceram estruturas identificadas como dobras da membrana celular. As regiões aprofundadas e as ondulações no filamento foram frequentes em 72h de exposição ao Paration metílico (Figuras 36, 37, 38 e 39).

3.4.2.7 - Tempo de exposição 96h : Observando-se o material ao microscópio óptico, verificou-se descolamento do epitélio das lamelas, desorganização da estrutura

lamelar, difícil visualização de espaços sanguíneos delimitados pelas células pilares, degeneração celular das regiões interlamelares e ausência de secreção de muco. O estudo em MEV demonstrou o grau avançado das alterações morfológicas, principalmente na superfície do filamento. As células apresentaram modificações na forma das microssaliências, que tornaram-se punctiformes, ou até desapareceram em algumas regiões, dando lugar a uma dobra que cobriu toda a extensão das células. A superfície do filamento reduziu-se de tal forma a contornar a estrutura de um vaso sanguíneo (Figuras 40, 41, 42 e 43).

Portanto, quando foi avaliada a toxicidade do organofosforado Paration metílico, vários efeitos sobre a morfologia das brânquias de *Metynnis roosevelti* foram detectados: enrugamento e descolamento epitelial, hiperplasia e alterações na secreção de muco e na forma das microssaliências. A concentração de 7 ppm deste organofosforado mostrou-se extremamente tóxica e letal para *M. roosevelti*, ao passo que a concentração de 1 ppm, ainda que subletal, alterou a morfologia normal das brânquias desta espécie.

Figura 3 - Arco branquiais de *Metynnis roosevelti*. Rastros branquiais (R) e filamentos branquiais (F). MEV (34 x).

Figura 4 - Região do arco branquial de *Metynnis roosevelti*, indicando rastros de diferentes tamanhos e alguns filamentos branquiais (). MEV (130 x).

Figura 5 - Formato triangular das lamelas respiratórias (L) de *Metynnis roosevelti*. Filamento branquial (F). MEV (1.363 x).

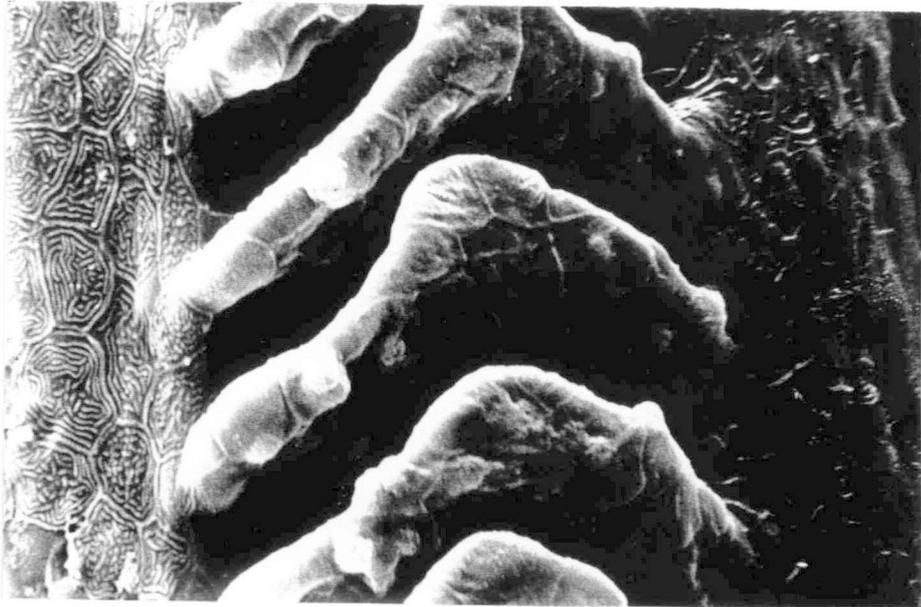
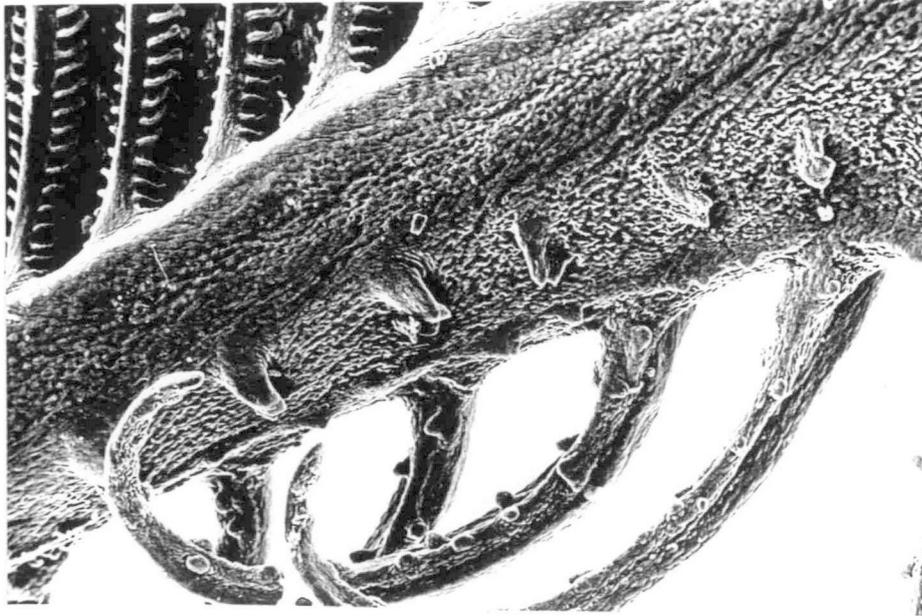
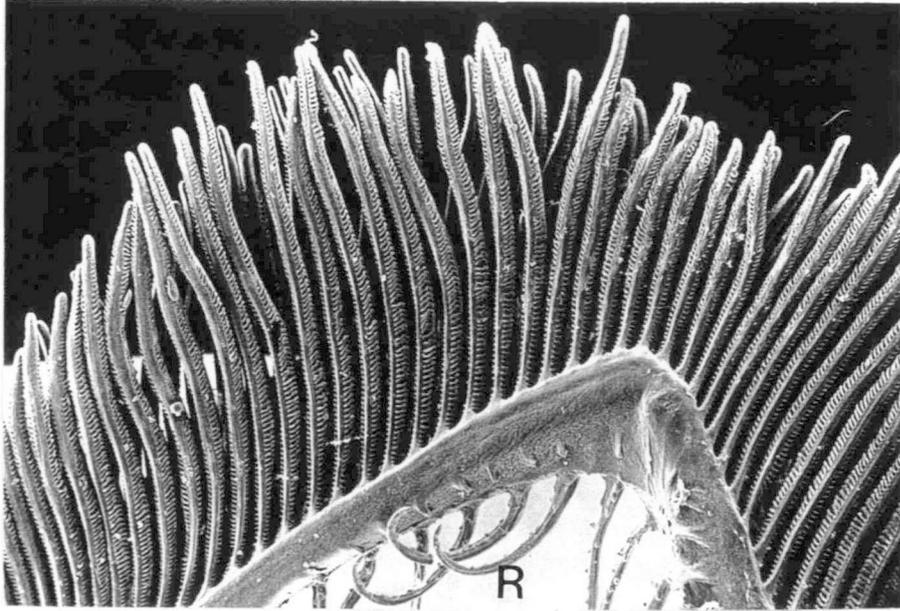


Figura 6 - Lamelas respiratórias (setas) e filamentos branquiais (F) de *Metynnis roosevelti*. MEV (654 x).

Figura 7 - Detalhe da superfície do arco branquial. Notar as ondulações do epitélio, as microssaliências e pequenos poros entre as células epiteliais (◊). MEV (654 x).

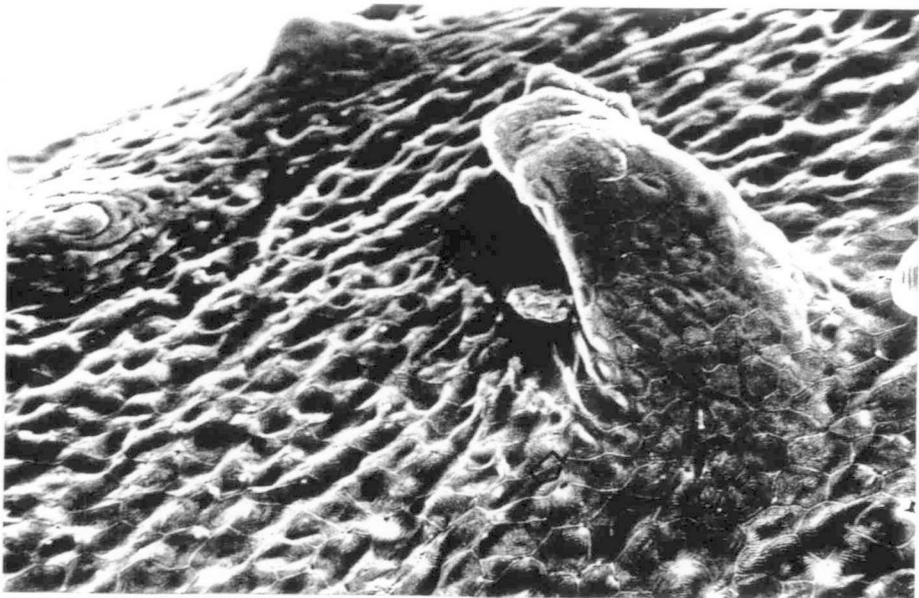
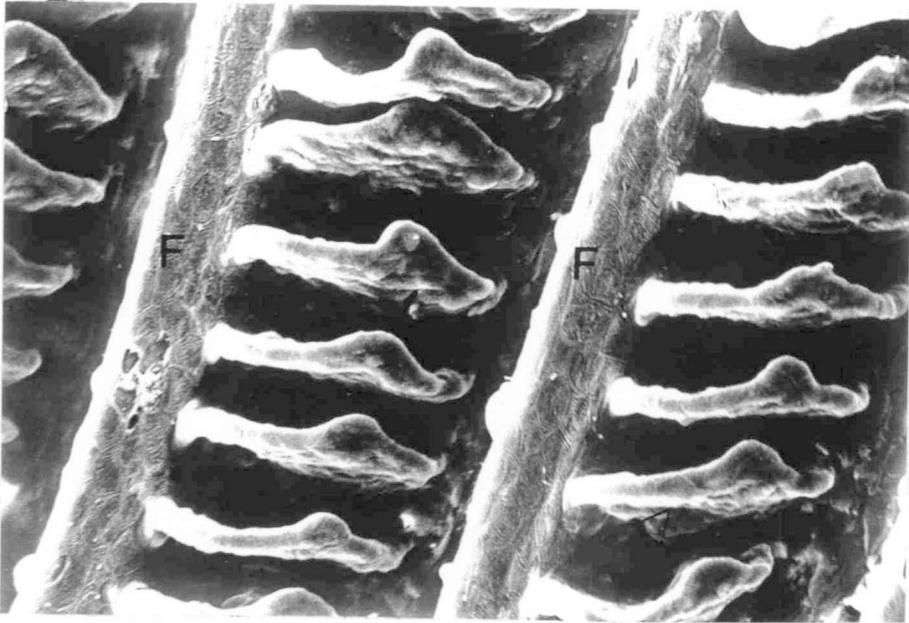


Figura 8 - Região de inserção de duas lamelas respiratórias (L) no filamento branquial (F). Observar a ausência de microssaliências no epitélio respiratório e sua presença no filamento (►). A seta (↯) indica um núcleo saliente. MEV (3.500 x).

Figura 9 - Superfície das células epiteliais do filamento, onde se destacam as microssaliências (►). Detalhe para uma célula de cloreto (↯). MEV (7.500 x).

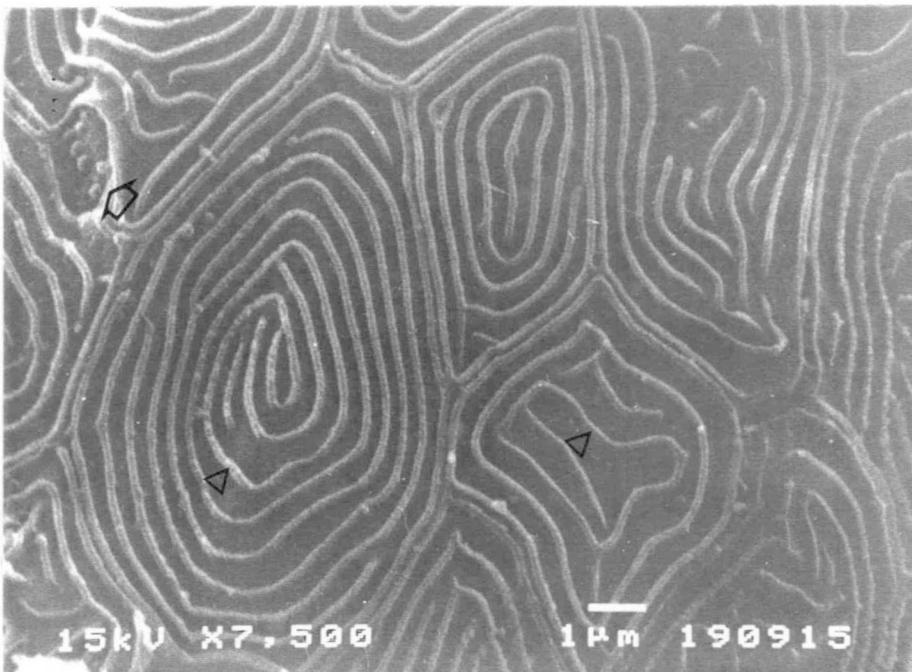
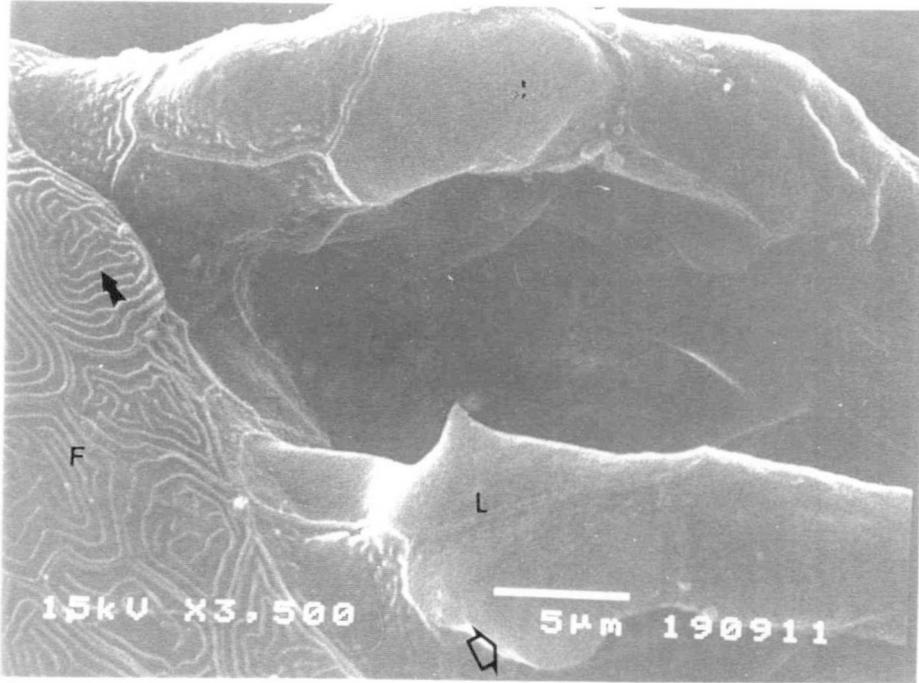


Figura 10 - Base do filamento branquial. Notar fraca reação ao corante azul de Alcian pH 1,0 nas regiões interlamelares (►). Cartilagem (C), lamelas respiratórias (L), filamentos branquiais (F). Azul de Alcian pH 1,0 (400 x).

Figura 11 - Identificação da secreção de glicosaminoglicanas ácidas nas regiões interlamelares (►). Azul de Alcian pH 2,5 (400 x).

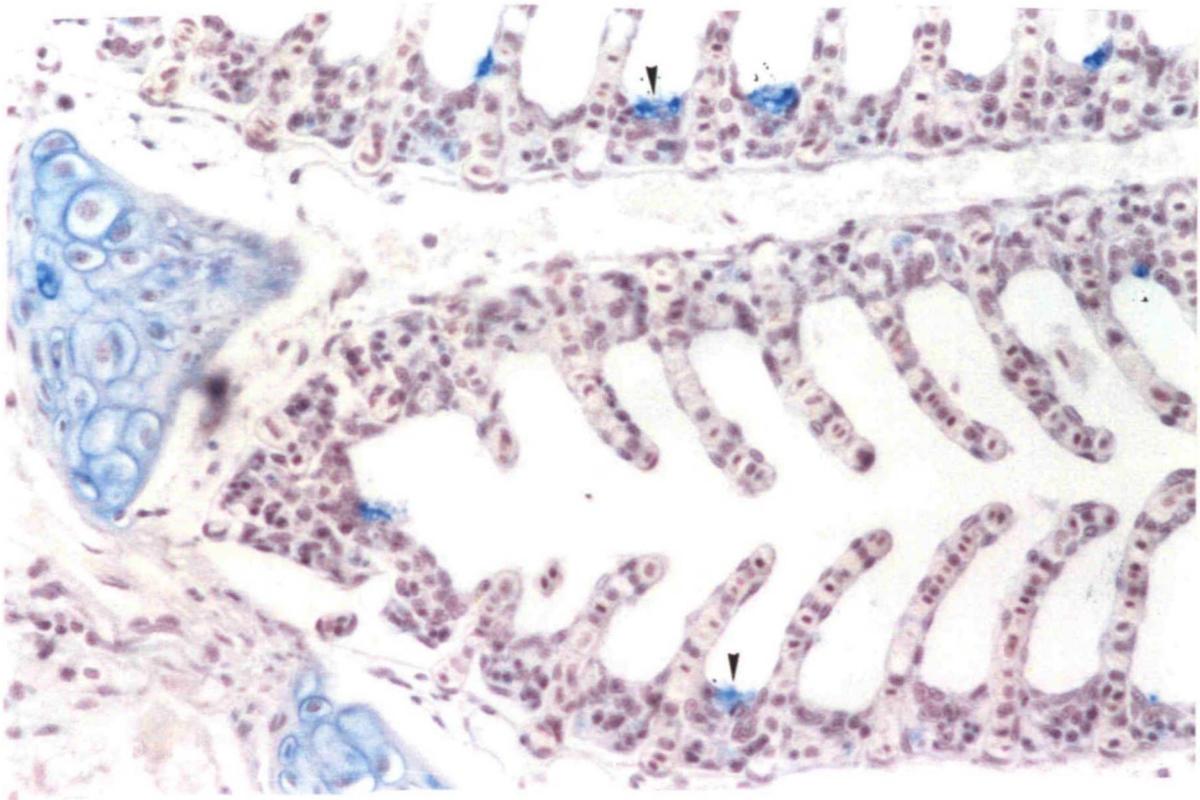
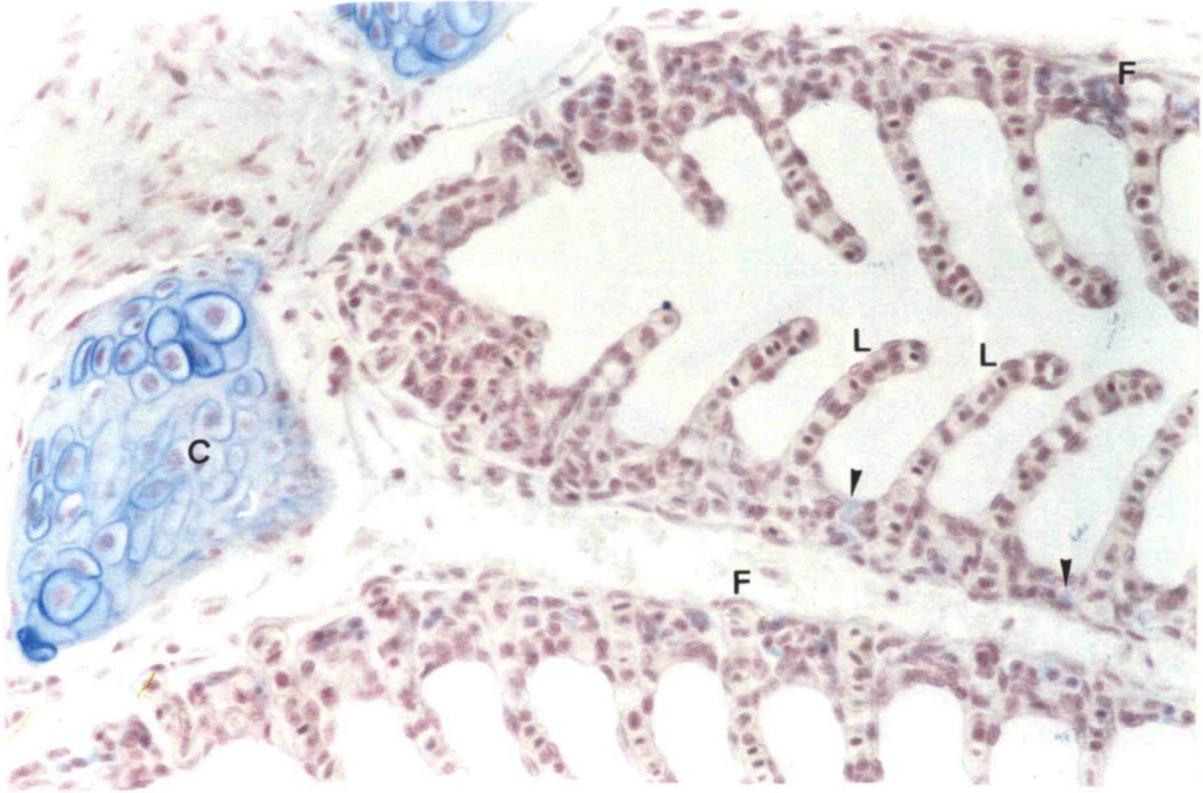


Figura 12 - Região mediana do filamento branquial. Observar as regiões secretoras de muco (►). Azul de Alcian pH 2,5 (400 x).

Figura 13 - Detalhe das regiões interlamelares indicando secreção de muco (►). Azul de Alcian pH 2,5 (1000 x).

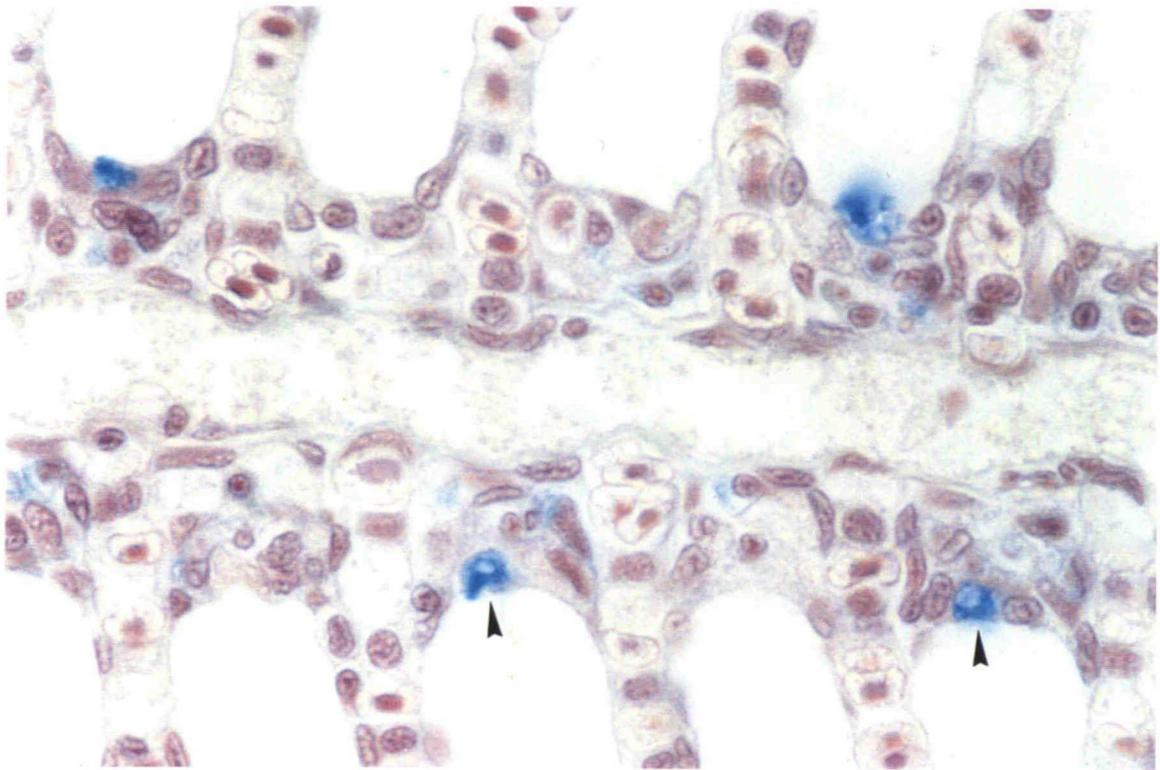
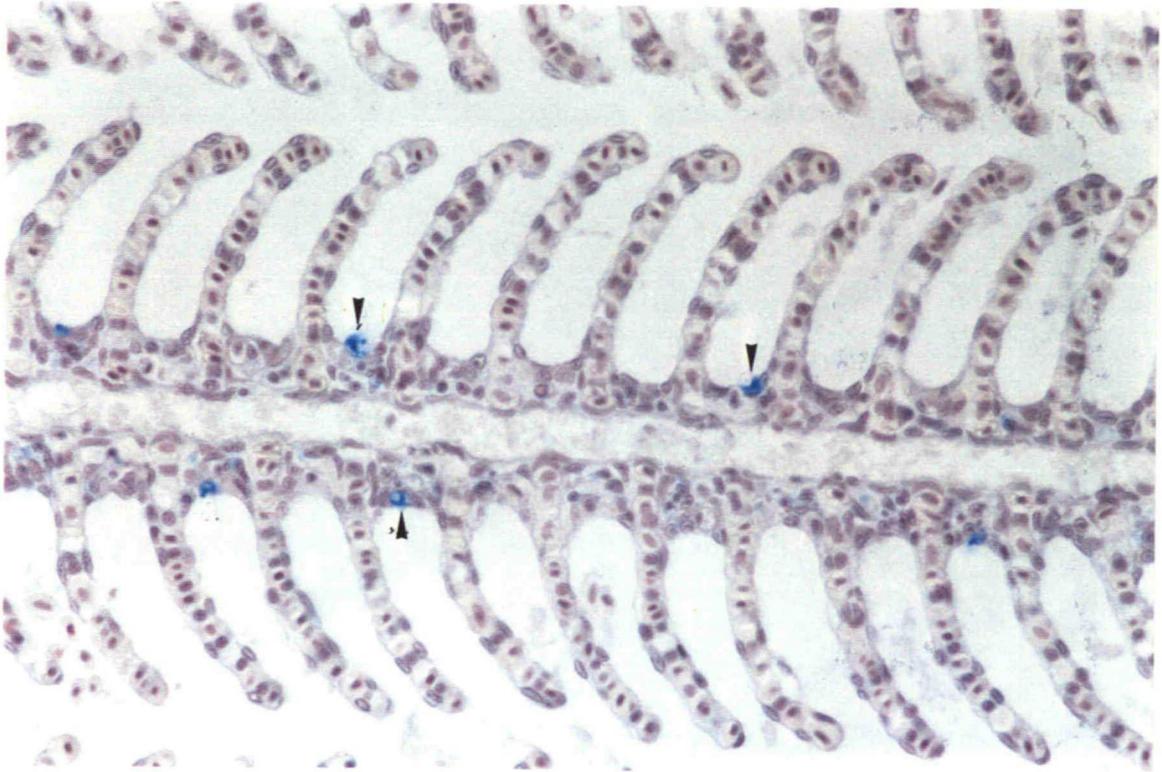


Figura 14 - Base de um filamento branquial. Lamelas respiratórias (L), filamentos branquiais (F) e cartilagem de sustentação do arco branquial (C). HE (400 x).

Figura 15 - Lamelas respiratórias (L) de *Metynnis roosevelti*. Observar células pavimentosas (→), células pilares (▶) e hemáceas (H). A seta dupla (▶▶) indica um núcleo saliente. HE (1.000 x).



Figura 16 - Lamelas respiratórias (L) alteradas. Observar enrugamento do epitélio (►) e desorganização da estrutura das lamelas. Bioensaio 7 ppm - 1h. HE (1.000 x).

Figura 17 - Evidência da desorganização das lamelas respiratórias. Observar maior secreção de muco e sua localização sobre as lamelas respiratórias (►). Bioensaio 7 ppm - 1h. Azul de Alcian pH 2,5 (400 x).

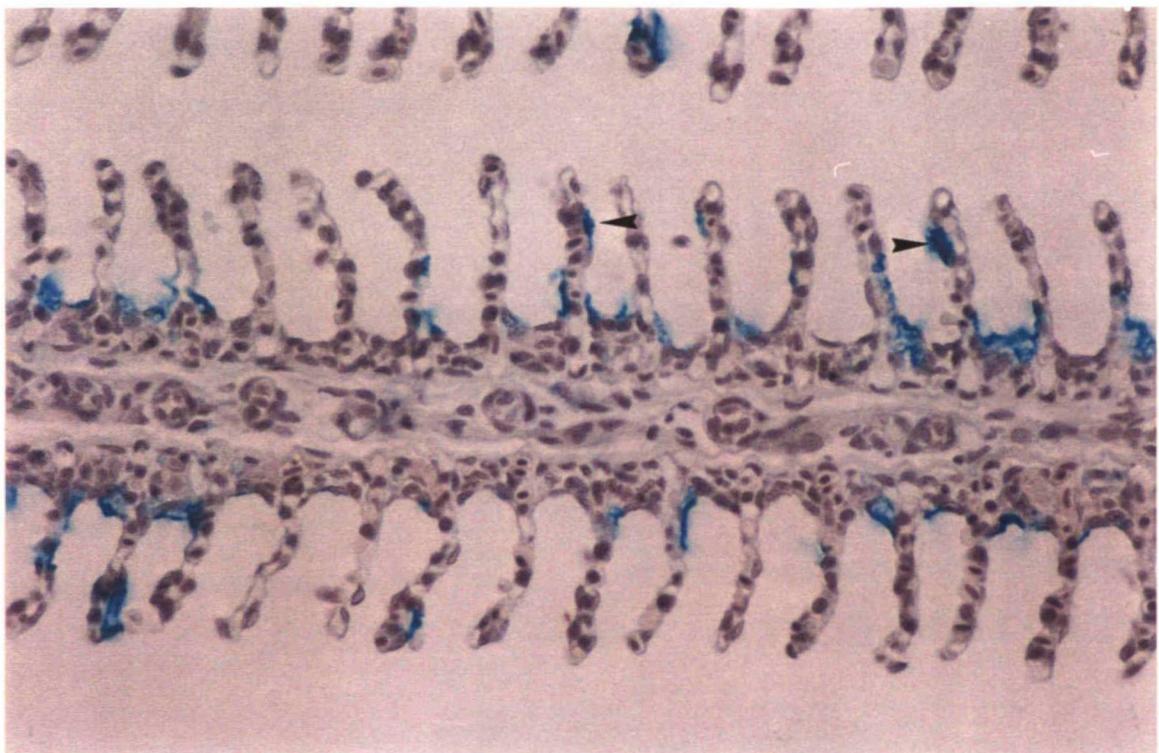
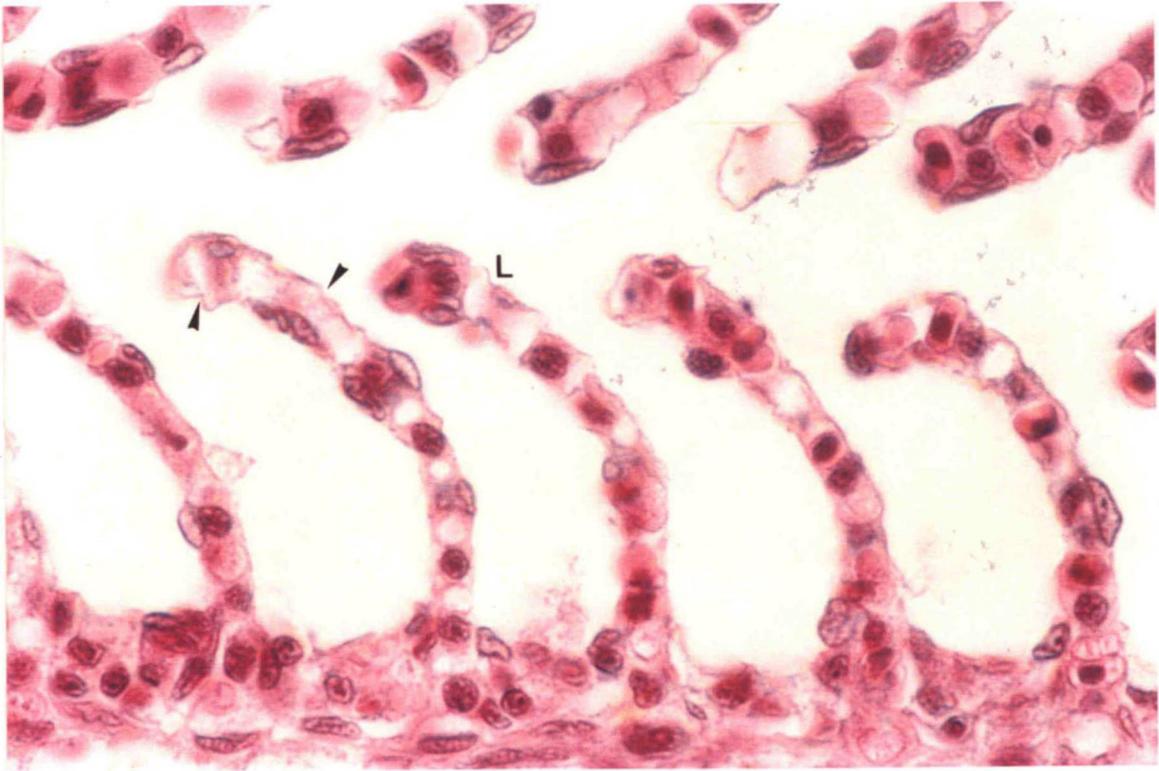


Figura 18 - Descolamento epitelial lamelar (►) de animais expostos ao organofosforado Paration metílico. Bioensaio 7 ppm - 4h. HE (1.000 x).

Figura 19 - Alteração na secreção de muco após descolamento epitelial (►). Bioensaio 7 ppm - 4h. Azul de Alcian pH 2,5. (1.000 x).

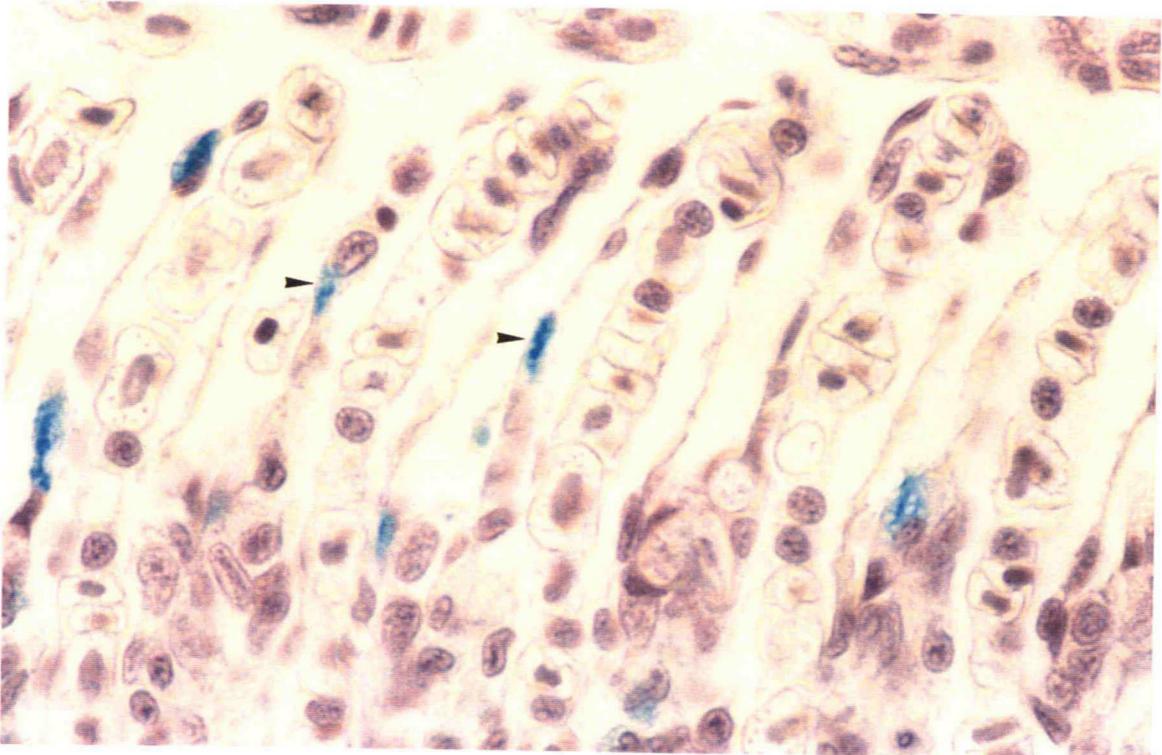
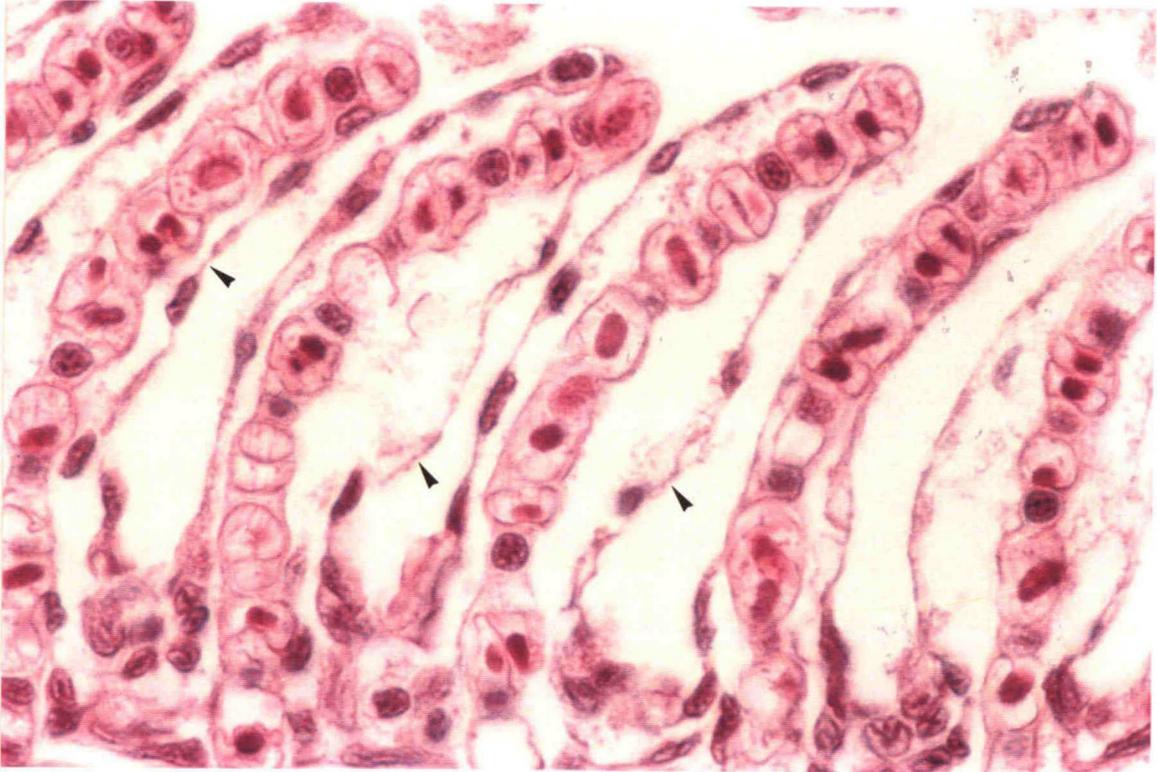


Figura 20 - Hiperplasia (►) registrada em brânquias de *Metynnis roosevelti* expostos ao organofosforado. Bioensaio 7 ppm - 8h. HE (400 x).

Figura 21 - Hiperplasia. Notar o recobrimento da superfície das lamelas respiratórias (►), dificultando o mecanismo de trocas gasosas. Bioensaio 7 ppm - 8h. HE (1.000 x).

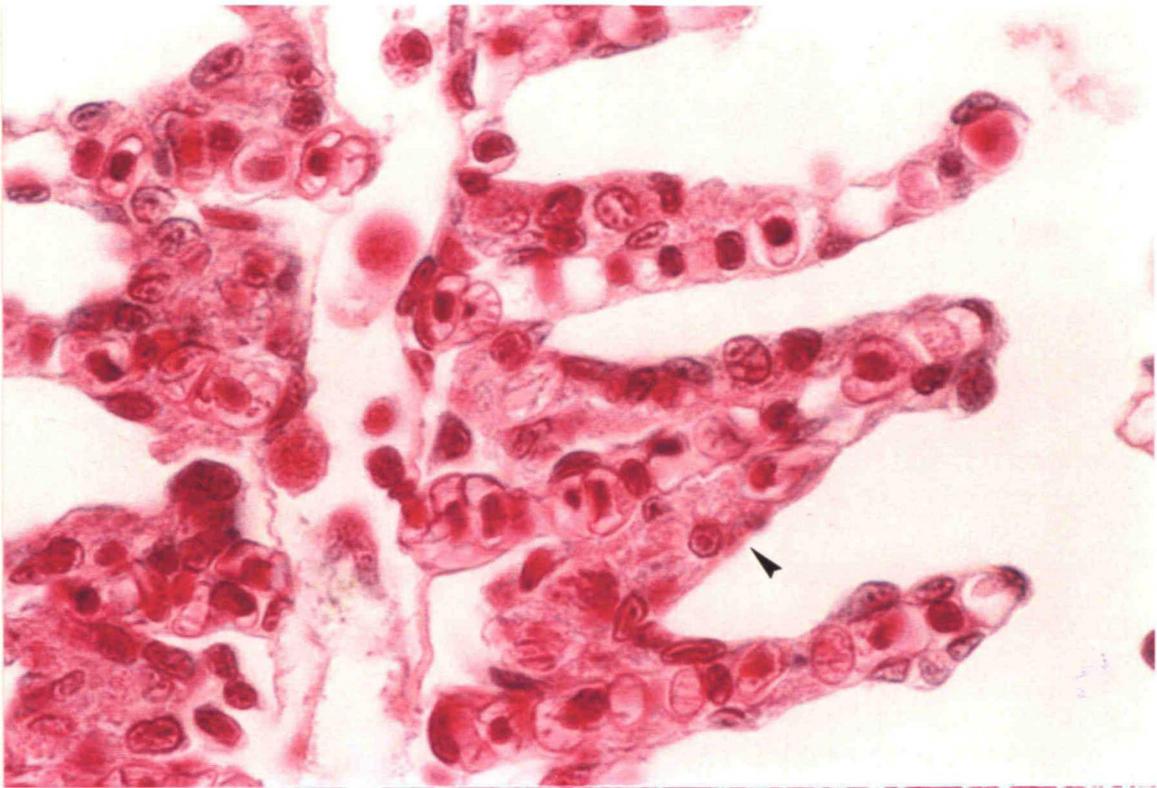
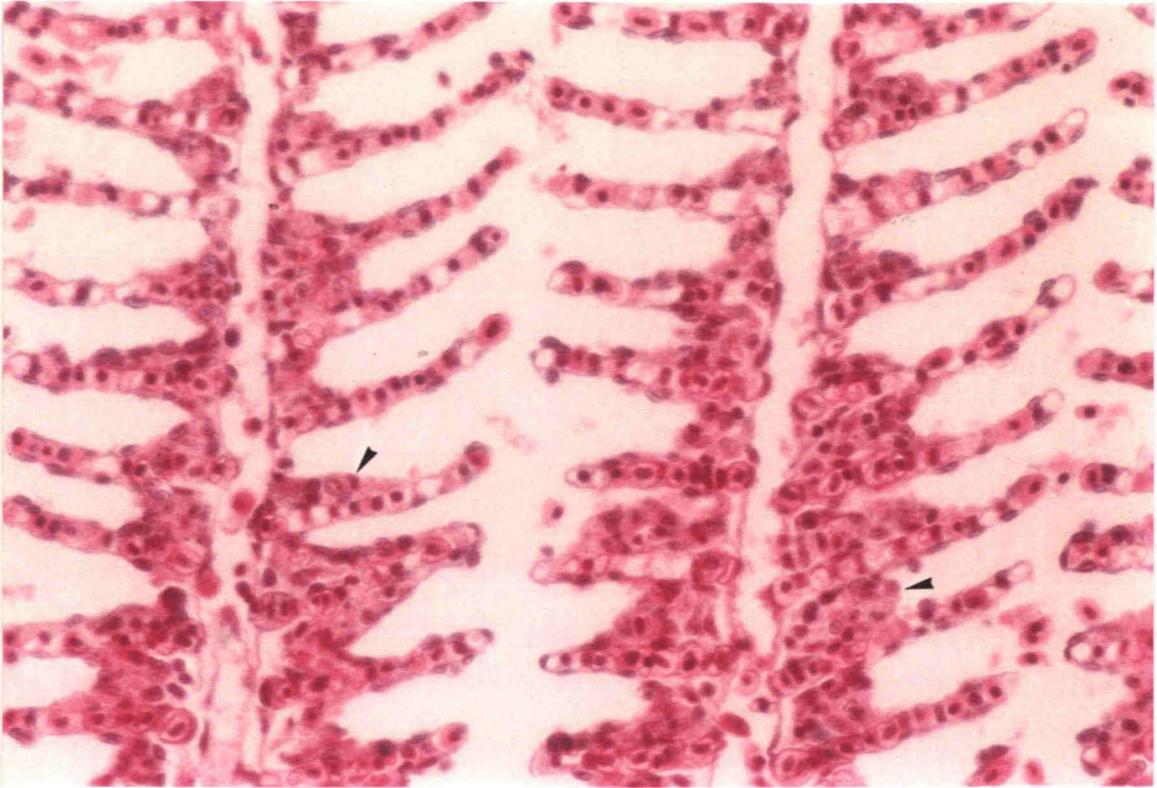


Figura 22 - Alterações nas lamelas respiratórias de *Metynnis roosevelti* expostos ao Paration metílico no **Bioensaio 1 ppm - 1h**. Observar achatamento do núcleo das células pavimentosas (►) e alterações na morfologia das células pilares e das hemáceas. HE (1.000 x).

Figura 23 - As alterações atingem as células secretoras de muco, localizadas nas regiões interlamelares. **Bioensaio 1 ppm - 1h**. Azul de Alcian pH 2,5 (1.000 x).

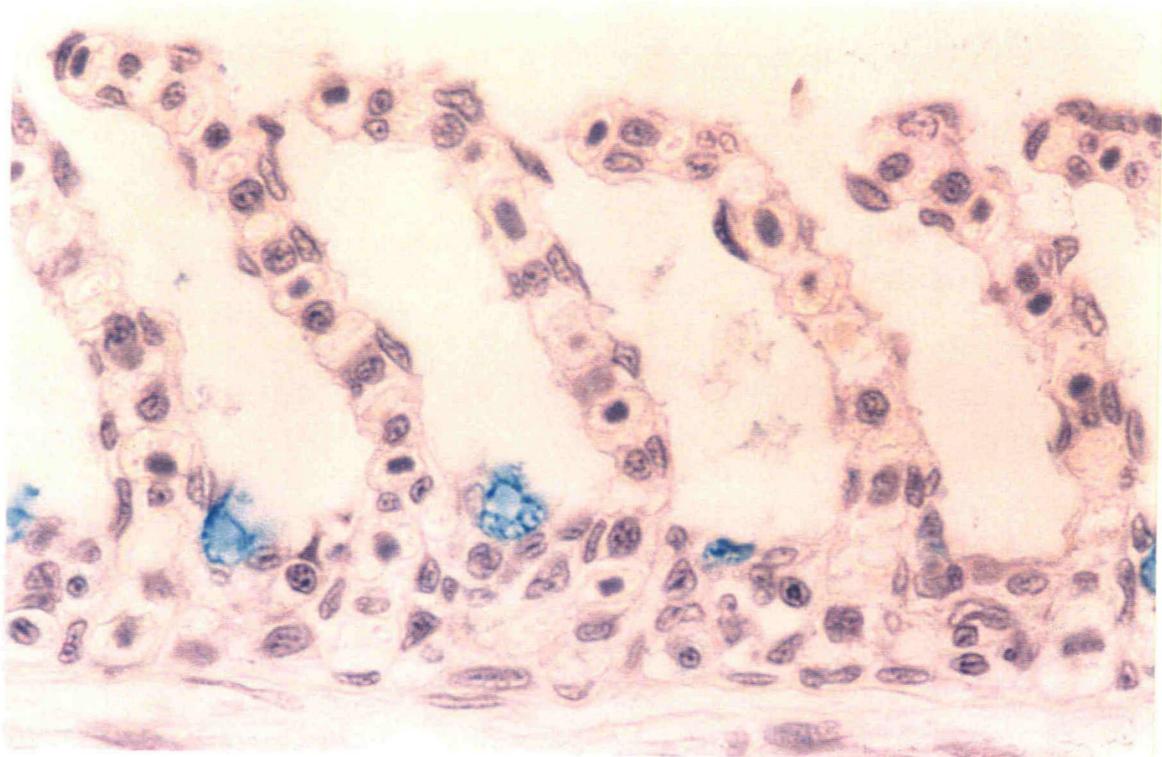


Figura 24 - Degeneração celular, desorganização dos espaços sanguíneos e fraca reação das hemáceas à eosina. Bioensaio 1 ppm - 4h. HE (1.000 x).

Figura 25 - Alterações do organofosforado sobre o epitélio das lamelas e do filamento. Bioensaio 1 ppm - 4h. Azul de Alcian pH 2,5 (1.000 x).

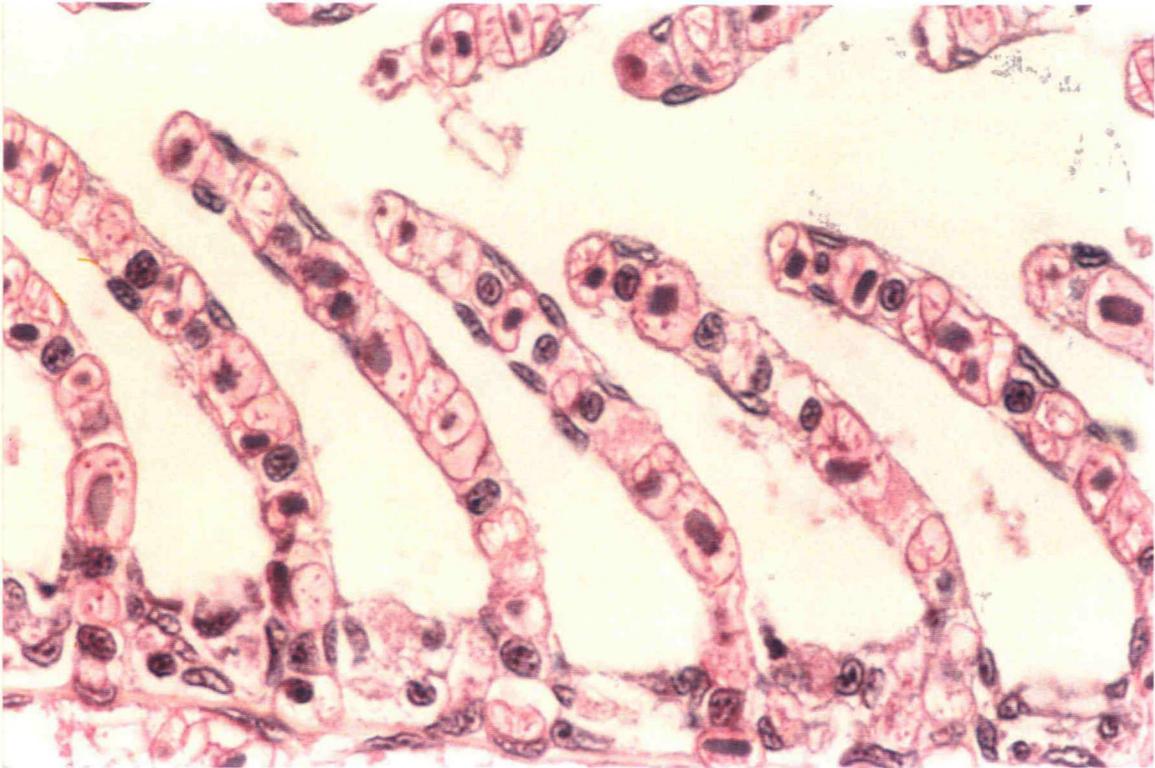


Figura 26 - Pronunciado achatamento do núcleo das células pavimentosas (►).
Bioensaio 1 ppm - 8h. HE (1.000 x).

Figura 27 - Evidência da presença de muco sobre a superfície das lamelas respiratórias (►) de peixes contaminados. **Bioensaio 1 ppm - 8h.** Azul de Alcian pH 2,5 (1.000 x).

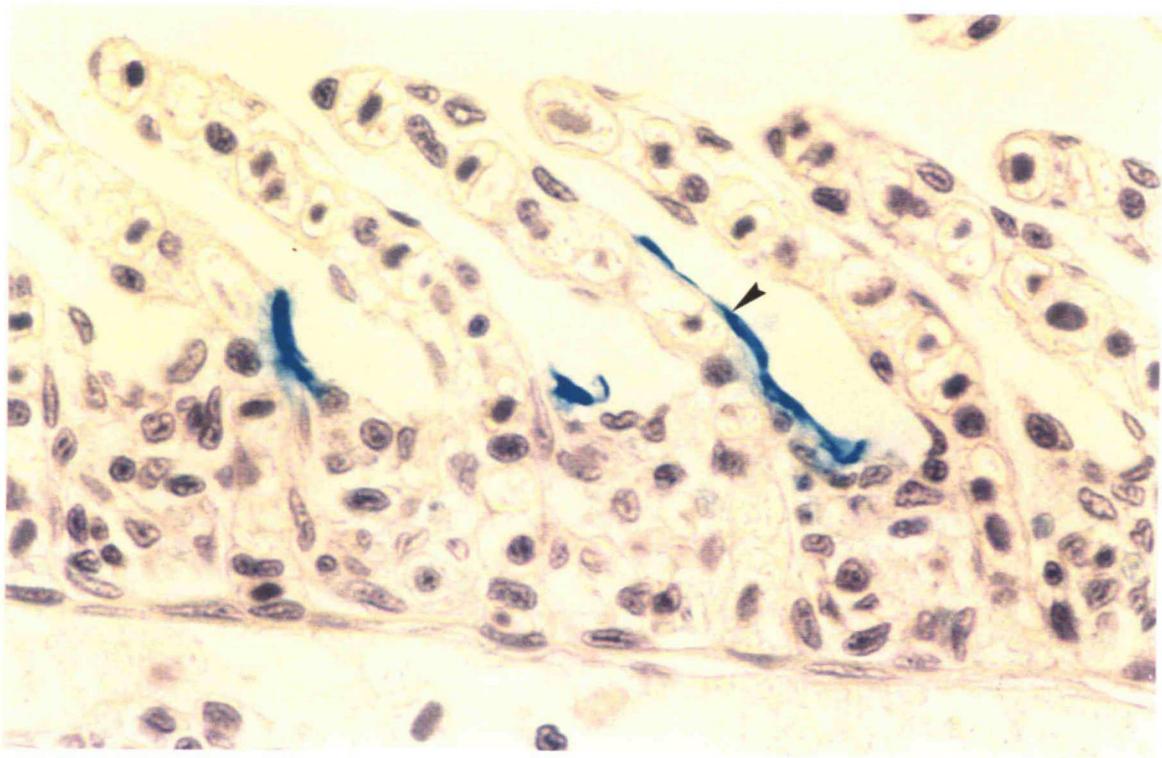


Figura 28 - Enrugamento do epitélio (►), degeneração celular (—►) e colapso dos espaços sanguíneos. Bioensaio 1 ppm - 24h. HE (1.000 x).

Figura 29 - Diminuição da secreção de muco em peixes expostos ao mesmo período. Bioensaio 1 ppm - 24h. Azul de Alcian pH 2,5 (1.000 x).

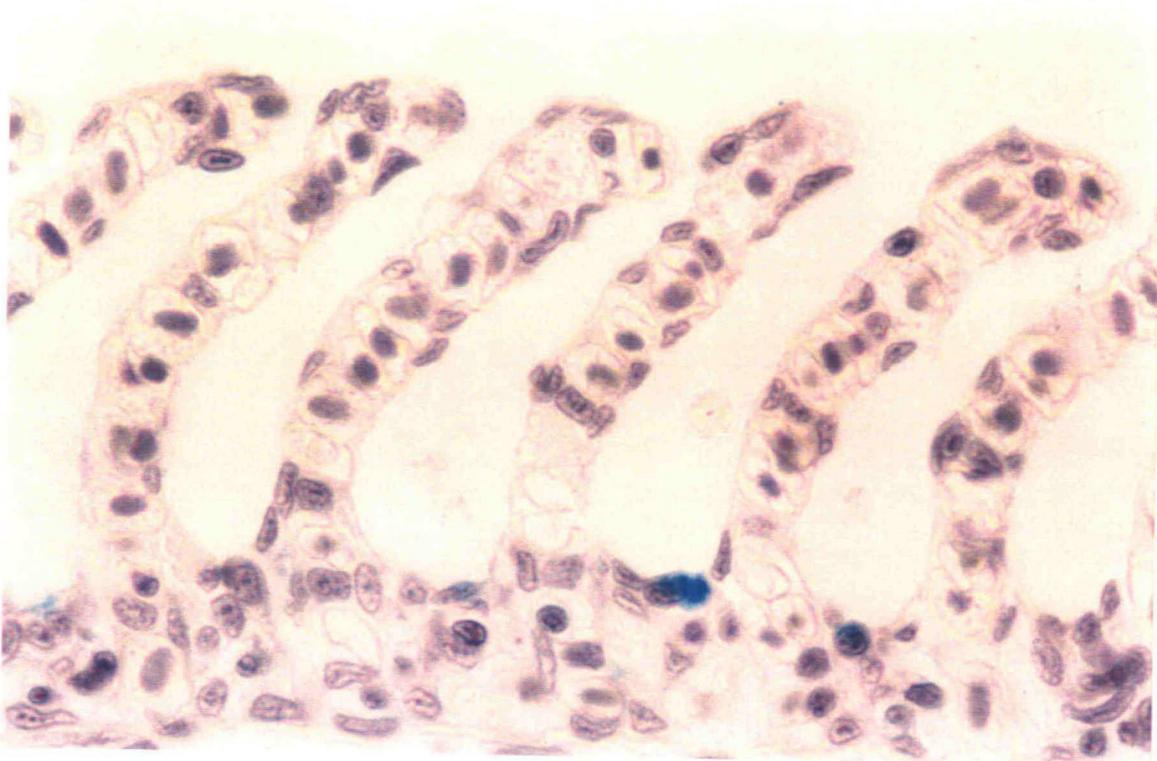


Figura 30 - Enrugamento do epitélio que reveste as lamelas respiratórias (►).
Notar as alterações nas microssaliências do epitélio do filamento (→). **Bioensaio**
1 ppm - 24h. MEV (2.000 x).

Figura 31 - Detalhe das alterações nas microssaliências do epitélio do filamento
(►). **Bioensaio 1 ppm - 24h.** MEV (5.000 x).

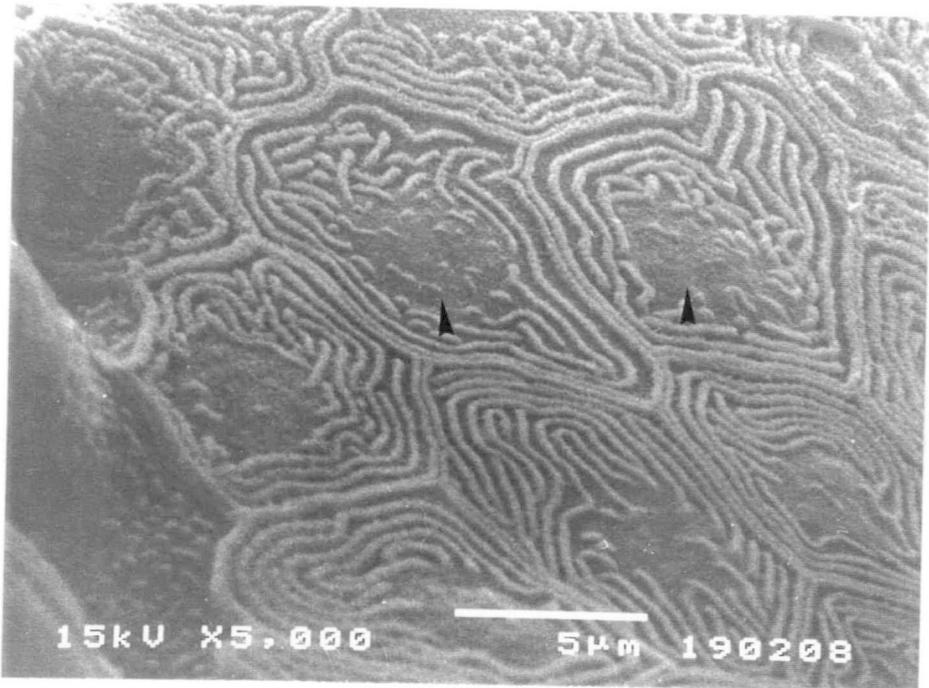
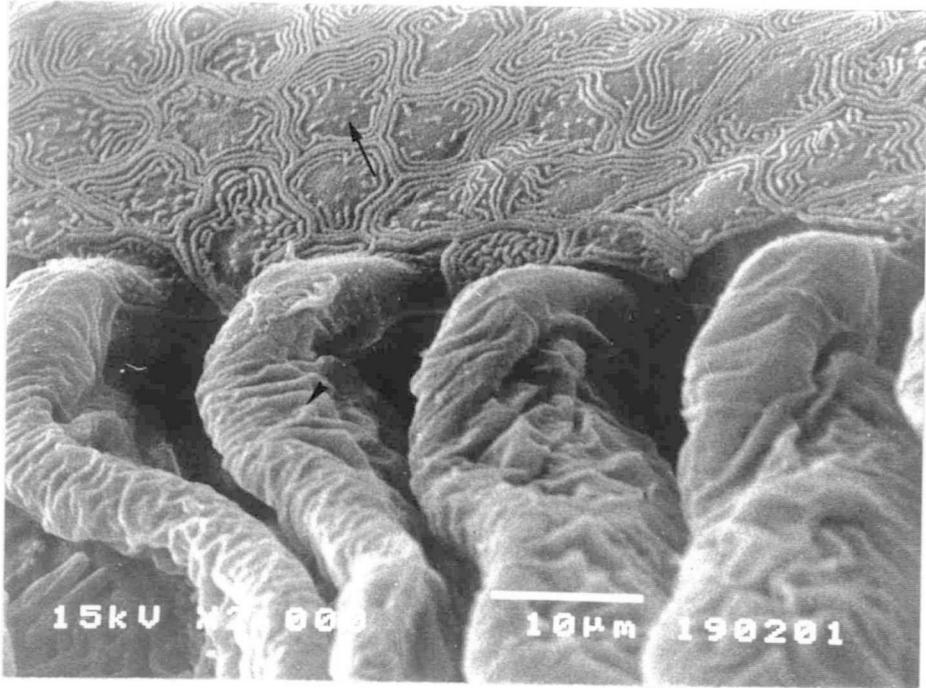


Figura 32 - Desestruturação da “arquitetura” normal das lamelas respiratórias, apresentando dificuldade na localização dos espaços sanguíneos. Observar a fraca reação das hemáceas à eosina. **Bioensaio 1 ppm - 48h**. HE (1.000 x).

Figura 33 - Diminuição na secreção de muco em peixes expostos ao Paration metílico. Observar as poucas regiões secretoras de muco (►). **Bioensaio 1 ppm - 48h**. Azul de Alcian pH 2,5 (200 x).

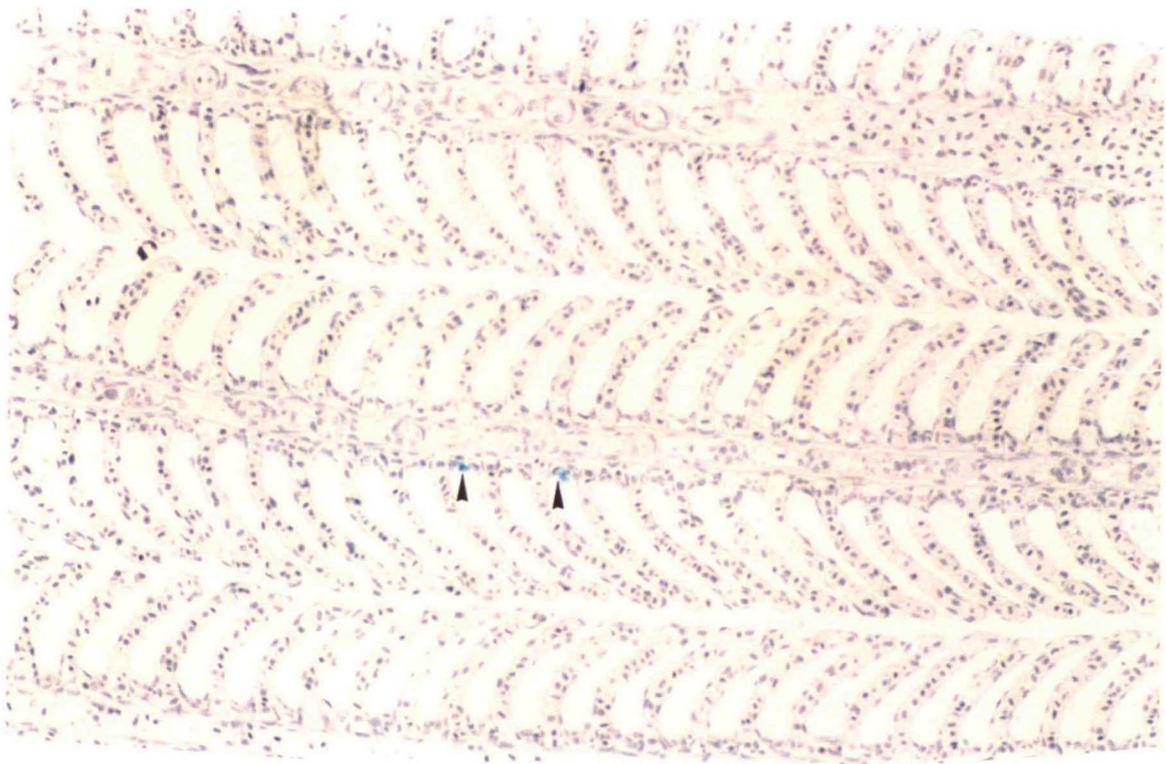
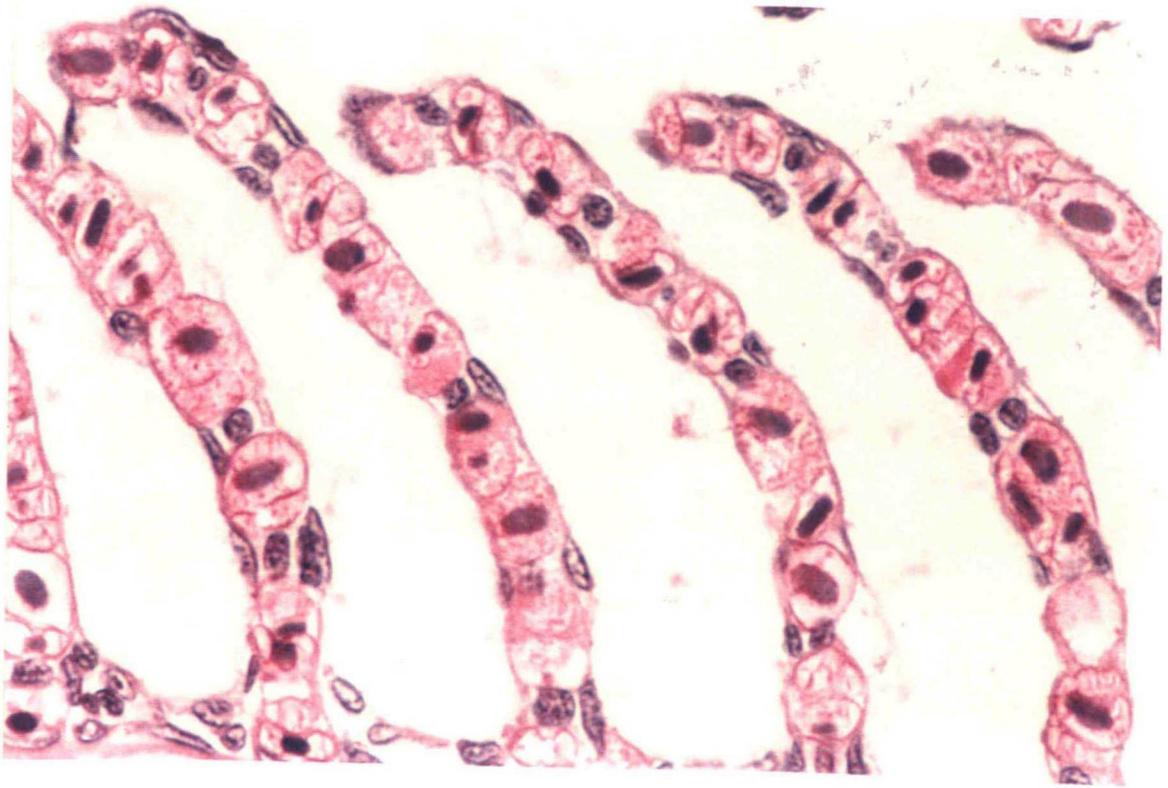


Figura 34 - Enrugamento lamelar persiste após 48h(→). Notar o reaparecimento de microssaliências no centro das células epiteliais do filamento (▶). **Bioensaio 1 ppm - 48h.** MEV (2.000 x).

Figura 35 - Região de inserção de duas lamelas respiratórias com epitélio enrugado. Observar o aspecto irregular das microssaliências no epitélio do filamento (seta). **Bioensaio 1 ppm - 48h.** MEV (3.500 x).

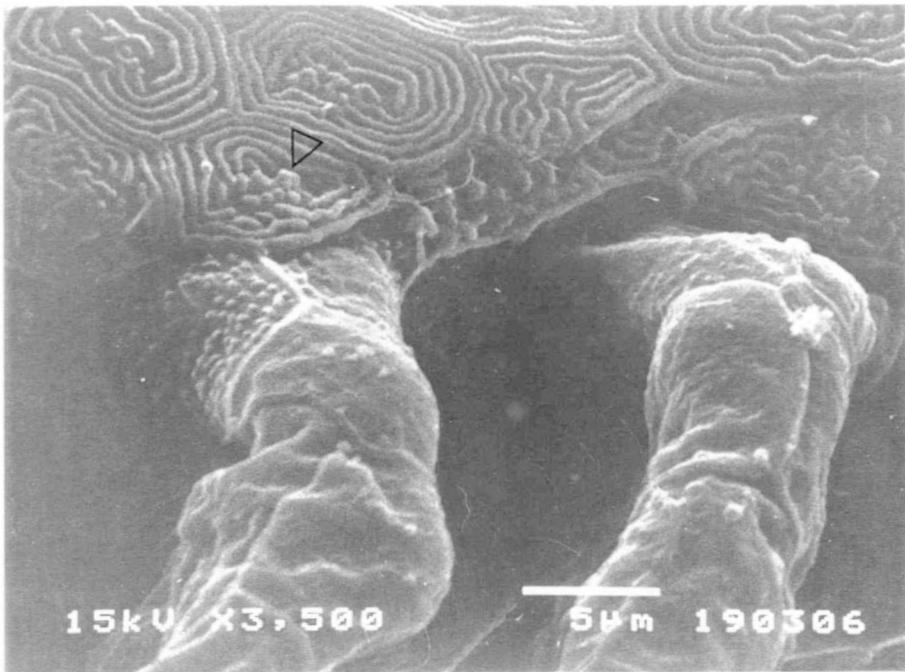
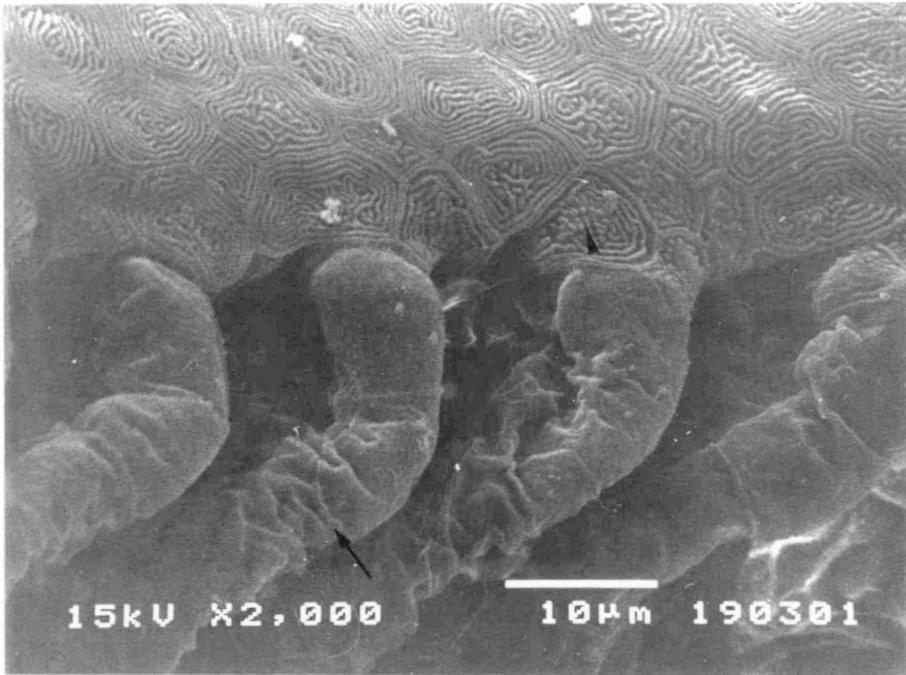


Figura 36 - Descolamento do epitélio das lamelas respiratórias (►).
Bioensaio 1 ppm - 72h. HE (1.000 x).

Figura 37 - Ausência de secreção de muco, registrada em boa parte do filamento branquial. **Bioensaio 1 ppm - 72h.** Azul de Alcian pH 2,5 (1.000 x).

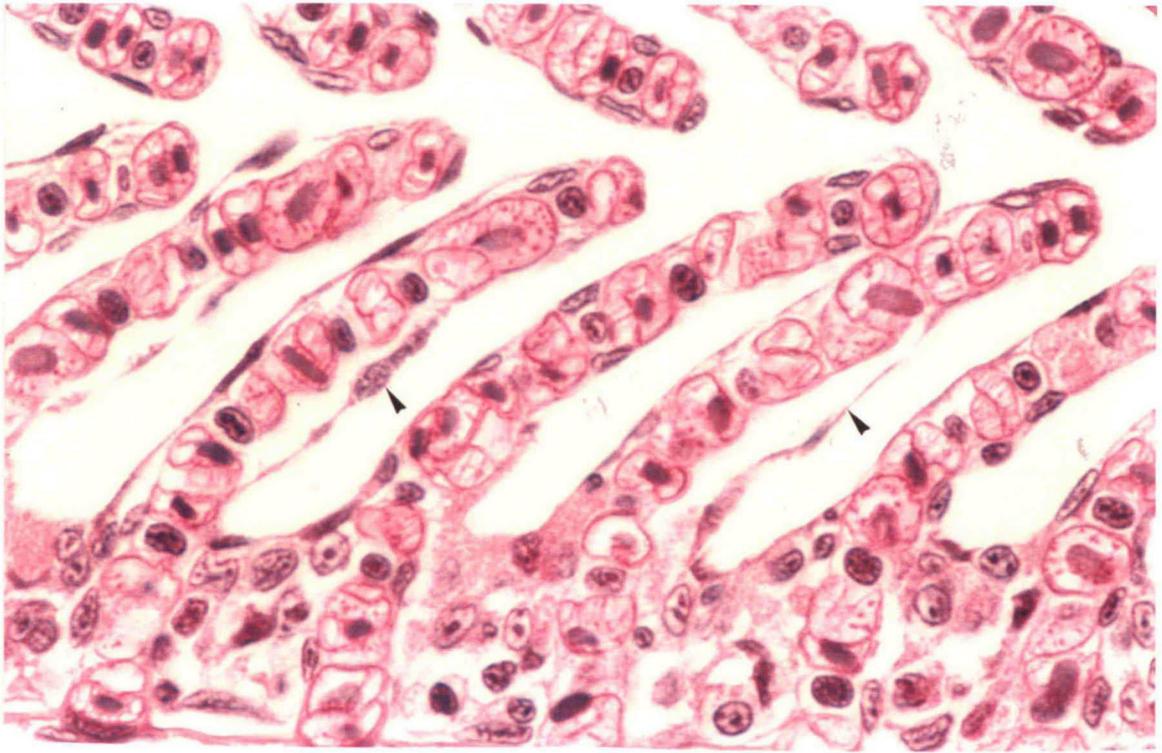


Figura 38 - Regiões aprofundadas e ondulações no filamento branquial (►).
Bioensaio 1 ppm - 72h. MEV (2.000 x).

Figura 39 - Dobras da membrana celular (◊) originadas das microssaliências irregulares que apareceram no tempo anterior. Bioensaio 1 ppm - 72h.
MEV (15.000 x).

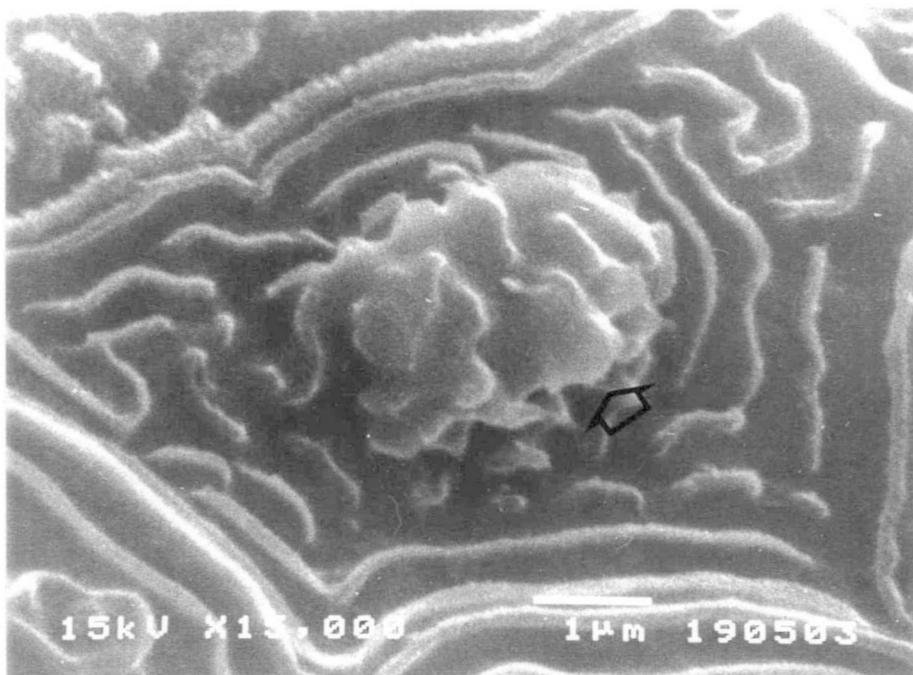
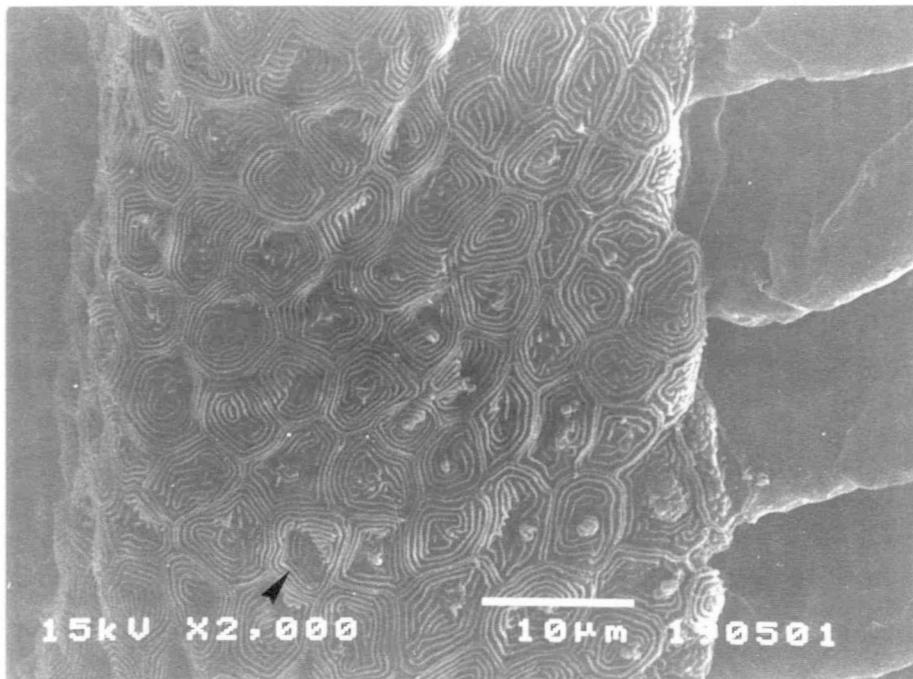


Figura 40 - Grau avançado de descolamento e degeneração celular nas lamelas respiratórias e no filamento branquial. Bioensaio 1 ppm - 96h. HE (1.000 x).

Figura 41 - Descolamento epitelial (►) e pouca secreção de muco. Cartilagem (C). Bioensaio 1 ppm - 96h. Azul de Alcian pH 2,5 (400 x).

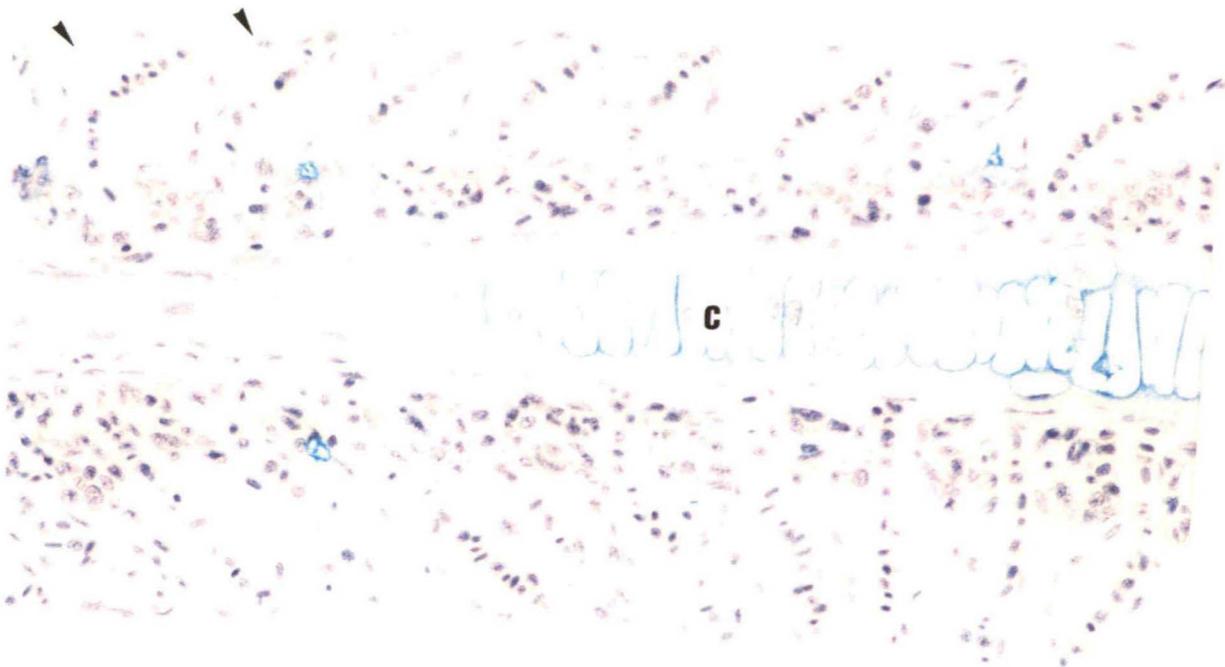
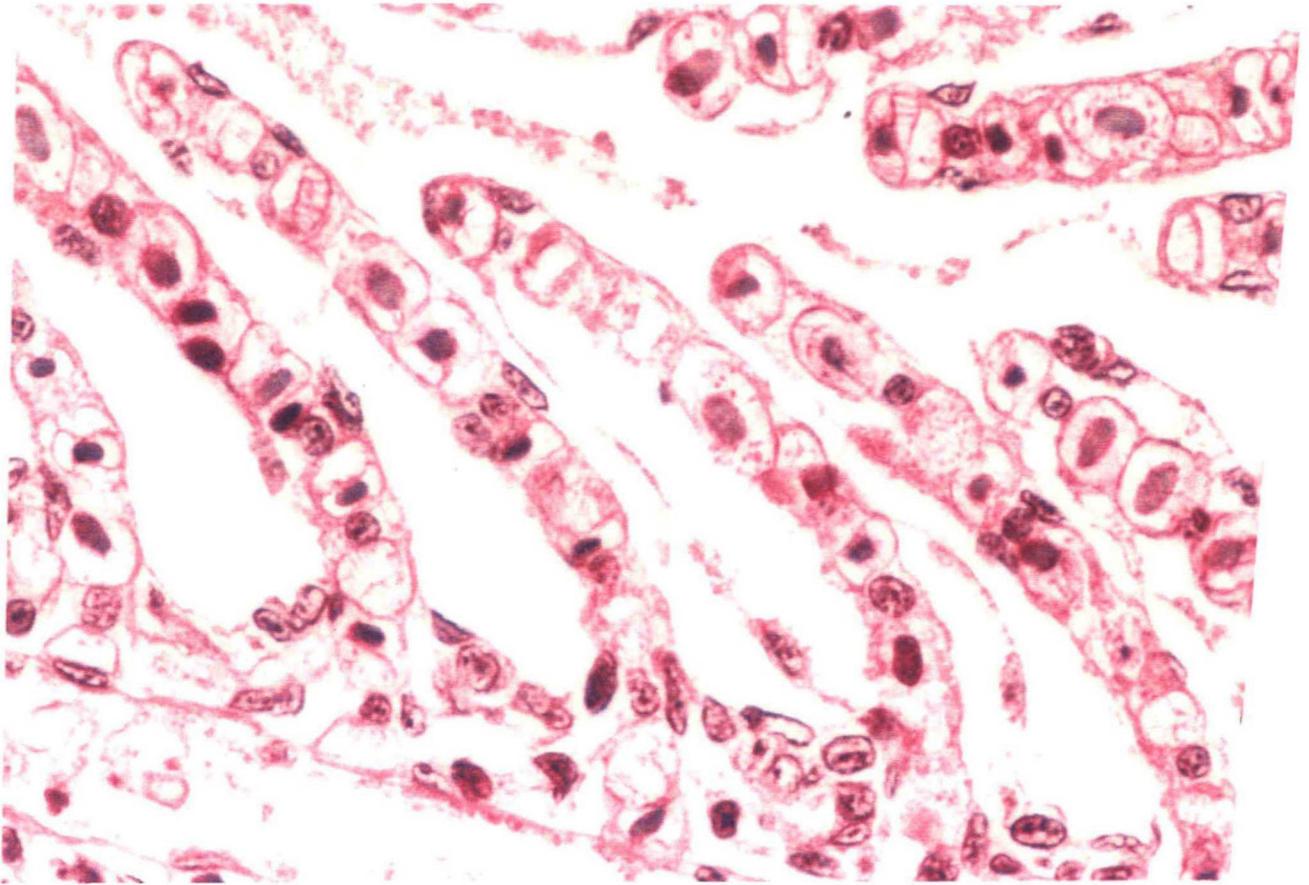
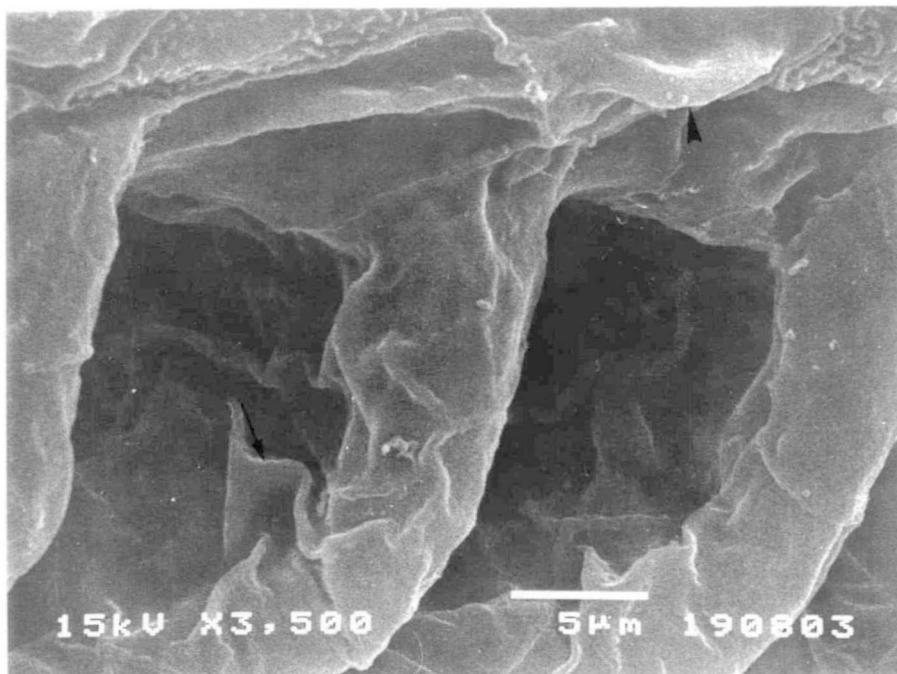
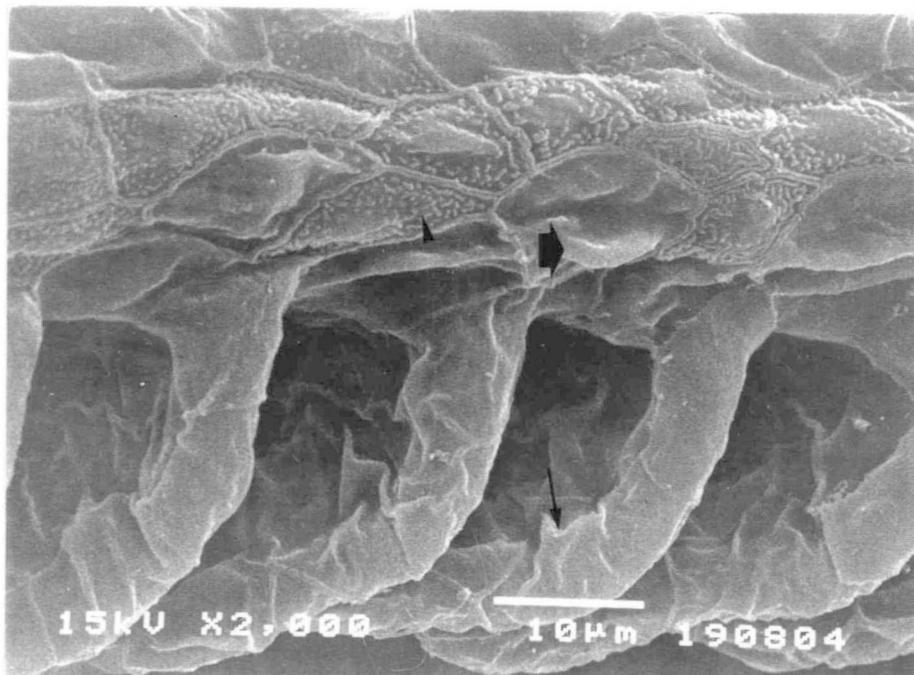


Figura 42 - Modificações na forma das microssaliências, que tornaram-se punctiformes (►) ou mesmo ausentes, formando dobras na superfície das células do filamento (◼). O epitélio respiratório ainda apresenta-se enrugado (—►). Observar a redução da área da superfície do filamento. Bioensaio 1 ppm - 96h. MEV (2.000 x).

Figura 43 - Detalhe das lamelas respiratórias de peixes expostos ao mesmo período. Observar enrugamento das lamelas (—►) e dobras na superfície do epitélio (►). Bioensaio 1 ppm - 96h. MEV (3.500 x).



4. DISCUSSÃO

Em meados deste século, o desenvolvimento agrícola foi marcado pelo aparecimento de compostos químicos extremamente eficientes no combate aos mais diversos tipos de pragas que atacavam a agricultura. O consumo de agrotóxicos como o DDT, o BHC, o Paration, entre outros, aumentou em grande escala, promovendo um significativo aumento na produção de alimentos, o qual mostrava-se necessário, tendo em vista o contínuo crescimento da população humana. Entretanto, poucos anos após a introdução destas substâncias, a comunidade científica foi alertada para seus prováveis “efeitos colaterais” sobre a saúde humana e o ambiente.

Dependendo da origem, das propriedades físico-químicas, da quantidade introduzida e das características dos ecossistemas, os agrotóxicos podem ser transportados e transformados no ambiente através de diferentes processos.

Dentre os ecossistemas, os aquáticos têm merecido maior atenção, pois além de serem os mais susceptíveis, recebem, indiretamente, agentes químicos provenientes das águas de chuva ou aqueles carregados pelo escoamento superficial dos solos. Assim, para o controle dos agentes químicos introduzidos nos ecossistemas aquáticos, é necessário o uso de técnicas que possam prever o impacto desses agentes sobre a biota dos recursos hídricos receptores. Nesse sentido, os testes de toxicidade devem ser considerados uma análise indispensável no controle da poluição hídrica, pois fundamentam-se na utilização de organismos vivos que são diretamente afetados por desequilíbrios que eventualmente ocorram nestes ambientes (BERTOLETTI, 1990).

De particular interesse nos estudos de toxicidade estão os peixes, pois ocupam o topo da cadeia alimentar. O potencial de captação e bioconcentração nestes organismos é um importante passo na determinação dos efeitos dos agrotóxicos nos ecossistemas aquáticos. Os peixes são particularmente sensíveis à contaminação ambiental, e os agrotóxicos podem desencadear alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em diversos tecidos. Dessa forma, foi escolhido o pacu *Metynnis roosevelti*, com o propósito de se avaliar algumas destas alterações em uma espécie nativa brasileira.

Os organofosforados são compostos mais biodegradáveis que os organoclorados, e por isso são bastante usados no combate a insetos. Segundo o manual de informações técnicas da Bayer, o Paration metílico é o único produto recomendado oficialmente para o

controle da broca (*Eutinobothrus brasiliensis*) no Estado do Paraná, estando, portanto, entre os mais utilizados, o que motivou sua escolha para a realização deste estudo.

As brânquias de *Metynnis roosevelti* têm características morfológicas como filamentos branquiais longos e lamelas respiratórias numerosas e revestidas por epitélio simples e pavimentoso, o que possibilita eficientes trocas gasosas. Estas descrições caracterizam espécies ativas, como observado no comportamento desta espécie e de outras, estudadas por vários autores.

Para HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK (1974), ainda que haja uma uniformidade na organização básica das brânquias de peixes, algumas diferenças podem estar relacionadas à atividade de cada espécie. Em geral, espécies menos ativas têm a barreira sangue / água mais espessa, além de microssaliências na superfície respiratória. Na espécie estudada pelos autores, *Chaenocephalus aceratus*, há um grande número de células secretoras de muco na superfície das lamelas respiratórias, reduzindo a área disponível para trocas gasosas.

Em PREIN e KUNZMANN (1987) encontramos um estudo morfológico comparativo entre duas espécies pertencentes à família Syngnathidae, *Syngnathus rostellatus* e *Nerophis ophidion*. Os autores relacionam o modo mais ativo de *S. rostellatus* ao maior número de filamentos por arco branquial e de lamelas respiratórias por filamento. Este aparelho branquial é mais adequado e eficiente para suprir as necessidades metabólicas de espécies mais ativas.

As brânquias de peixes foram escolhidas para esta investigação por que estão em contato direto com o meio aquático e, portanto, são ótimos indicadores da qualidade das águas. Há ainda uma vasta literatura a respeito de sua morfofisiologia, o que facilita a compreensão de prováveis alterações em sua estrutura.

Assim sendo, o organofosforado Paration metílico teve avaliada a sua toxicidade e os seus efeitos sobre as brânquias de um peixe nativo, o pacu *Metynnis roosevelti*. Enrugamento e descolamento epitelial, hiperplasia, alterações na secreção de muco e na forma das microssaliências foram modificações morfológicas encontradas neste trabalho, e são discutidas na literatura.

MALLATT (1985) analisou 130 publicações nas quais foram registradas alterações morfológicas em decorrência da ação de agentes químicos sobre o epitélio respiratório. Lesões observadas menos que 10 vezes não foram consideradas em sua análise estatística, e o enrugamento do epitélio respiratório está entre estas lesões. Entretanto, em *Metynnis roosevelti*, esta alteração surgiu na primeira hora após contaminação, em ambas

concentrações. Ao MEV observou-se uma regressão do enrugamento, podendo significar que o epitélio, após sofrer uma agressão inicial, ainda é capaz de recuperar-se.

MÜELLER et al. (1991), estudando os efeitos do alumínio sobre o epitélio branquial, propõem duas fases para explicar as mudanças morfológicas no aparelho respiratório dos peixes : uma fase inicial, que pode durar algumas horas a dias, é caracterizada pelo efluxo de íons, pela inibição da captação ativa de íons, e por interferência nas trocas gasosas. Numa fase seguinte, haveria um retorno às características morfo-fisiológicas normais.

GOSS et al. (1992) propõem que as células pavimentosas do epitélio respiratório de peixes de água doce participem de mecanismos de regulação iônica, mais precisamente da troca iônica Na^+ / H^+ , e que as enzimas envolvidas neste processo estejam na membrana destas células. Tendo em vista que o enrugamento atinge a membrana celular, é possível que uma dose subletal de Paration metílico altere o equilíbrio ácido-básico e a absorção de Na^+ em peixes de água doce.

Deve-se levar em consideração também que, no caso do Paration metílico, ocorrem dois efeitos subsequentes : o primeiro deles pelo contato direto da substância com as células epiteliais da brânquia, incluindo as do epitélio respiratório, através das quais ocorre sua entrada no organismo. Posteriormente, após ser metabolizado no fígado, o organofosforado, sob a forma de Metil paraoxon, é distribuído para os tecidos, via corrente sanguínea.

Descolamento epitelial foi observado nas duas doses estudadas. Na revisão de MALLATT (1985) este foi o tipo de alteração branquial mais comum, ocorrendo com maior frequência em peixes de água doce do que em peixes marinhos, provavelmente porque nos primeiros, que são hiperosmóticos em relação ao meio, a lesão do epitélio facilitou o influxo de água, e o decorrente aumento de volume provocou o descolamento. ABEL (1976) interpreta esta resposta como sendo um decréscimo da área superficial da brânquia, necessário para manter o ambiente osmótico interno, em vista da perda funcional das células epiteliais. Para NOWAK (1992), o descolamento do epitélio respiratório resulta no aumento da distância de difusão, afetando as trocas gasosas. Este fenômeno é descrito também em outros tipos de contaminação ambiental, como em águas ácidas (KAWALL, 1993), metais pesados (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 1994) e salinidade (LUVIZOTTO, 1994 ; FANTA et al. 1995).

Em *Metynnis roosevelti*, o processo de hiperplasia foi subsequente ao processo de descolamento epitelial, sugerindo ser decorrência deste. A hiperplasia caracteriza-se por proliferação celular entre as lamelas respiratórias, diminuindo a área de superfície de

trocas gasosas. Para MAGOR (1988), estas células originam-se do epitélio do filamento no espaço interlamelar e podem agir como uma barreira impedindo a difusão de substâncias nocivas para o sangue dos peixes. KHAN e KICENIUK (1984), estudando os efeitos histopatológicos do óleo cru em peixes, concordam que, juntamente com a secreção de muco, a hiperplasia é uma resposta que protege as brânquias contra futuros danos causados por substâncias tóxicas. Esta alteração é extremamente intensa no caso de agressões por metais pesados (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 1994).

As respostas branquiais podem servir para dificultar a entrada de substâncias tóxicas na corrente sanguínea, mas têm o indesejável efeito de diminuir a oxidação dos tecidos, ao criar uma barreira às trocas gasosas (MALLATT, 1985). Esta dificuldade na respiração foi confirmada pela resposta comportamental de *Metynnis roosevelti*, pois quando expostos à dose letal 7 ppm, os animais apresentaram respiração ofegante. É possível, portanto, traçar um paralelo entre a hiperplasia e os efeitos verificados no comportamento dos animais intoxicados, permitindo relacionar ambos os fenômenos.

NOWAK (1992) não encontrou diferença significativa no diâmetro dos espaços sanguíneos formados pelas células pilares, em peixes expostos ao organoclorado endosulfan. Mas vários estudos relatam danos nas células pilares provocados por poluentes (SCHMID e MANN, 1961 ; BETTEX-GALLAND e HUGHES, 1973 ; ABEL, 1976). Tais danos celulares frequentemente estão associados a doses muito altas, nas quais os animais estão próximos da morte (MALLATT, 1985).

Todavia, o mesmo não se pode dizer quando os resultados deste trabalho são analisados. Logo na primeira hora de exposição à dose subletal, toda a estrutura da lamela respiratória de *Metynnis roosevelti* foi alterada, inclusive a forma das células pilares. Este colapso das células pilares, que mostrou-se progressivo ao longo das 96h do experimento, foi acompanhado por deformação das hemáceas, o que pode indicar uma alteração a nível osmótico e iônico.

A ação do Paration metílico é de inibidor de enzimas, bloqueando a acetilcolinesterase e outras enzimas. Para este resultado, não atua o Paration metílico propriamente dito, mas um metabólito seu, o Metil paraoxon, resultante de oxidação enzimática. Quimicamente, a inibição da acetilcolinesterase pelo Metil paraoxon é vista como uma fosforilação, deixando livre a acetilcolina endógena (BARBERÁ, 1976). Estas informações encontram respaldo no trabalho de BETTEX-GALLAND e HUGHES (1973), os quais sugerem que a contração de células pilares seja favorecida pela acetilcolina presente no sangue.

As alterações morfológicas das células pilares devem ser vistas com preocupação. Primeiro porque estas células, de certa forma, controlam a pressão sanguínea dos peixes, e quando a pressão sanguínea é mantida em níveis insatisfatórios, distúrbios fisiológicos em outros órgãos são possíveis. Segundo, porque mudanças na pressão e no fluxo sanguíneo podem afetar o número de lamelas irrigadas, a distribuição do sangue dentro das lamelas, a permeabilidade do epitélio branquial e, por consequência, os mecanismos osmorregulatórios e de trocas gasosas (RANDALL, 1982).

Ainda que a deformação das hemáceas seja claramente visível, a quantificação deste dano para o processo respiratório dos peixes não foi determinada. Entretanto, supõe-se que a capacidade de transporte dos gases pelo sangue seja reduzida, conseqüentemente induzindo o animal a alguma forma de hipóxia. Estes argumentos também podem ser traçados como paralelos aos efeitos verificados no comportamento respiratório dos animais intoxicados por Paration metílico.

As microssaliências são estruturas comumente encontradas na superfície branquial dos peixes. Sua localização e suas funções, entretanto, geram discussões.

DATTA MUNSHI e HUGHES (1986) estudaram a superfície respiratória das brânquias de *Anabas testudineus* e encontraram microssaliências nas células epiteliais da lamela respiratória. HOSSLER et al. (1986) demonstraram, através de estudos ultraestruturais, uma estrutura branquial semelhante a encontrada em *Metynnis roosevelti*. Em *Morone saxatilis*, as microssaliências, que os autores chamam de micropregas, estão presentes no arco e nos filamentos branquiais, e ausentes nas lamelas respiratórias, que são revestidas por células pavimentosas de superfície lisa. Os autores lembram que algumas publicações têm relacionado a presença de microssaliências no epitélio das lamelas respiratórias com o ancoramento de muco, com a finalidade de proteção deste epitélio contra agentes microbianos ou sólidos em suspensão. Mas sugerem que a ausência de tais estruturas neste epitélio possa servir para reduzir a espessura da barreira sangue / água, facilitando as trocas gasosas.

HUGHES (1979) propõe diferentes funções para as microssaliências que encontrou na superfície das lamelas respiratórias de truta, *Salmo gairdneri*. Entre elas, o aumento da superfície respiratória, aumentando a possibilidade de trocas gasosas e a produção de microturbulência, que favoreceria a captação de O₂. A função mais provável, entretanto, seria a ocupação por muco no espaço entre as microssaliências, promovendo, dessa forma, um fluxo laminar de água por sobre o epitélio das brânquias.

Lamelas bastante reduzidas e microvilos no epitélio respiratório também foram encontrados em *Saccobranchus* (= *Heteropneustes*) *fossilis* (HUGHES e DATTA MUNSHI, 1978). Segundo os autores, tais características encontradas no aparelho respiratório desta espécie indicam uma adaptação à respiração aérea, visto que esta espécie apresenta órgão de respiração aérea com longos microvilos que representam uma maior superfície respiratória.

As microssaliências em *Metynnis roosevelti* foram estruturas de arranjo concêntrico observadas nos arcos e nos filamentos branquiais. Entretanto, sob a ação do organofosforado, na dose subletal 1 ppm, observou-se uma progressiva alteração na forma das microssaliências, as quais, após 96h, desapareceram em algumas células.

Resultado semelhante foi encontrado em MALLATT et al. (1985), que investigaram o modo de ação de um veneno específico contra lampréias, no aparelho branquial de larvas de lampréia. Em doses subletais, os autores descrevem microssaliências mais escassas e de comprimento e forma variados, além de alterações na borda de contato entre células adjacentes, que tornou-se menos evidente. O dado alarmante deste resultado está no fato de que o veneno utilizado pelos autores é específico contra o organismo testado. Se estas alterações na superfície das brânquias refletirem o modo de ação tóxica do veneno, pode-se supor que a dose subletal 1 ppm de Paration metílico foi extremamente tóxica para *Metynnis roosevelti*.

No caso das microssaliências estarem realmente envolvidas com o ancoramento de muco, este mecanismo foi prejudicado pela ação do Paration metílico

Células secretoras de muco foram observadas no espaço compreendido entre as lamelas respiratórias das brânquias de *Metynnis roosevelti*, sendo a substância produzida identificada como glicosaminoglicana ácida sulfatada e carboxilada.

Em, *Chaenocephalus aceratus*, HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK (1974) descrevem numerosas células secretoras de muco nas lamelas respiratórias, algumas tão grandes que ocupam boa parte do espaço interno destas lamelas, o que reduziu a área disponível para as trocas gasosas.

KHAN e KICENIUK (1984), analisando os efeitos do óleo cru sobre uma espécie de peixe marinho migratório, observaram alterações no fígado e na produção de espermatozóides. A mais dramática mudança histológica, entretanto, ocorreu no tecido branquial. Entre outras alterações, a excessiva produção de muco foi considerada como resposta de proteção contra substâncias tóxicas. Conclusão semelhante foi encontrada por KUMARAGURU et al. (1982) em peixes expostos a piretróides, e por MÜELLER et al.

(1991), em peixes contaminados por alumínio. Para MALLATT (1985), a hipersecreção de muco, mais do que refletir uma ação tóxica direta, cria uma barreira à entrada do agente tóxico.

Em *Metynnis roosevelti* expostos ao Paration metílico, observou-se alteração na secreção de muco. Na dose letal 7 ppm, já na primeira hora, notou-se uma maior secreção de muco, e este localizou-se sobre as lamelas respiratórias. Esta observação foi registrada na dose subletal 1 ppm, após 8h, sugerindo que o muco esteja envolvido na proteção do epitélio respiratório. Entretanto, após 96h, pouco muco foi encontrado, tanto nas regiões interlamelares como sobre a superfície das lamelas respiratórias, sugerindo diminuição da atividade secretora destas células. É provável que se houvesse microssaliências neste epitélio, estas promoveriam melhor retenção deste muco.

Em outras palavras, o organofosforado Paration metílico atinge o aparelho respiratório dos peixes, seja atuando diretamente sobre o epitélio branquial, seja secundariamente através da corrente sanguínea. Tais mecanismos de ação provocaram alterações morfológicas graves, de consequências fisiológicas que podem levar à morte os animais, ou a prejuízos graves quando a dose for subletal.

SPRAGUE (1973) define bioensaio como um teste no qual a qualidade ou intensidade de uma substância é determinada pela reação de um organismo exposto a esta substância. Questões como “Essa substância é tóxica?” ou ainda “O quanto essa substância é tóxica ?” são facilmente respondidas por testes de toxicidade. Entretanto, a questão “Como estas substâncias exercem seus efeitos tóxicos ?” não pode ser respondida por estes testes, pois eles baseiam-se apenas na mortalidade provocada por estas substâncias. Com a utilização de ferramentas como a Biologia Celular, pode-se notar a fragilidade da utilização apenas da concentração em que 50% dos indivíduos morreram (CL 50), como limite seguro para a população. O organofosforado Paration metílico, ainda que não tenha provocado a morte de nenhum peixe em 96h, gerou alterações morfológicas no aparelho respiratório destes animais, que certamente tem repercussão em um contexto ecológico.

No presente trabalho, foram realizados apenas bioensaios laboratoriais, sendo os peixes submetidos a condições controladas. Entretanto, é admissível extrapolar os resultados para condições ambientais naturais. Primeiro, porque algumas alterações morfológicas foram registradas após curto período de exposição (1h), tempo suficiente para atingir peixes confinados a ambientes mais restritos, como pequenos lagos, por exemplo. Além disto, quando expostos à dose subletal, os peixes não demonstraram reação de fuga.

Segundo, as doses utilizadas (1 ppm e 7 ppm) são insignificantes diante das doses recomendadas para aplicação na lavoura, presentes no rótulo do produto. Para combater algumas pragas que atacam a cultura do tomate, por exemplo, recomenda-se 110 ml para cada 100 litros de água, ou 1.100 ppm do organofosforado ! É claro que este volume, caso eventualmente venha a contaminar um curso d'água, estará bastante diluído. Assim mesmo, a diferença entre as concentrações merece reflexão.

Um terceiro ponto refere-se ao modo de utilização do produto e à disposição final das embalagens. O produto pode ser aplicado por aparelhos costais, tratorizados ou por aeronaves. O manual do produto alerta para que, ao se utilizar aeronaves, o vento esteja calmo ou menor que 8 Km/h, a fim de se evitar a contaminação de ambientes próximos. O manual também adverte para que os consumidores não lavem as embalagens ou a aparelhagem aplicadora em rios e demais coleções de água. Estes cuidados podem esbarrar no despreparo de nossos agricultores, que muitas vezes ignoram cuidados com a própria saúde (BULL e HATHAWAY, 1986).

A utilização de *Brachydanio rerio* em testes de toxicidade também é motivo de debate, uma vez que esta espécie não pertence à fauna ictiológica de nosso país. Esta preocupação já parece resolvida em países mais desenvolvidos. No manual da EPA (1986), a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana, encontramos que alguns dados a respeito dos efeitos do Paration metílico em organismos aquáticos não foram usados porque tais estudos foram conduzidos com espécies não residentes nos EUA. SPRAGUE (1973) é mais exigente ao não recomendar a utilização de *Pimephales promelas* em laboratórios de uma determinada região dos EUA, porque esta espécie não é nativa desta região. A grande diferença de sensibilidade ao Paration metílico, apresentada por *Brachydanio rerio* e *Metynnis roosevelti*, ilustra bem este problema.

Recentemente, um método mais completo para determinar o nível de toxicidade de poluentes tem sido proposto. Denominado de microcosmos, este experimento procura repetir, dentro de limitações, as características naturais de um ambiente. Os testes de toxicidade são realizados em tanques com sedimentos, água e organismos (desde algas a peixes) naturais da região onde será aplicado determinado produto. Durando em média 6 meses, os microcosmos estão sujeitos a alterações ambientais e, dessa forma, podem refletir, com mais exatidão, eventuais distúrbios ecológicos.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam, portanto, a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a ação dos agrotóxicos, já que, mesmo em doses consideradas seguras, podem atingir órgãos vitais para os organismos. As alterações branquiais

observadas incidem diretamente sobre o metabolismo do animal, tendo em vista que é através das brânquias que os peixes respiram, eliminam excretas nitrogenadas e mantém o equilíbrio ácido-básico e iônico de seu fluido corporal. Sob o aspecto ecológico, estas alterações podem provocar desequilíbrio nas populações, com a morte dos animais ou mesmo interferência na relação presa / predador. Vale alertar, ainda, para a importância dos efeitos produzidos na cadeia alimentar, trazendo consequências para animais e seres humanos que porventura fizerem parte dela.

Estudos ultraestruturais de células branquiais podem detectar alterações a nível citoplasmático, com prováveis manifestações em mitocôndrias, membranas celulares, núcleo e citoesqueleto. Análises genéticas poderão descrever modificações cromossômicas e gênicas, que, expressas, resultarão em problemas para as outras gerações da espécie. Tais pesquisas devem ser a continuidade deste trabalho.

5. CONCLUSÕES

1. A morfologia das brânquias de *Metynnis roosevelti* é semelhante à da maioria dos teleósteos de água doce. As brânquias são constituídas de filamentos branquiais arranjados ao longo de arcos branquiais revestidos por epitélio estratificado e, em sua superfície externa, encontraram-se microssaliências. Nas lamelas respiratórias observou-se um delicado epitélio simples pavimentoso, estando ausentes as microssaliências

2. Análise histoquímica indicou, entre as lamelas respiratórias, a presença de células secretoras de muco de natureza glicoproteica ácida sulfatada e carboxilada, com predomínio desta última. Muito raras, entretanto, foram as células de cloreto, cujo ápice se exterioriza através de filamentos.

3. A concentração de 7 ppm do organofosforado Mentox 300 CE, cujo princípio ativo é o Paration metílico, foi letal para *Metynnis roosevelti* nas primeiras 24h. Nesta concentração foram observados enrugamento e descolamento do epitélio respiratório, e hiperplasia, sugerindo diminuição de eficácia das trocas gasosas.

4. A concentração de 1 ppm foi subletal em 96h de exposição ao organofosforado. Entretanto, enrugamento e descolamento do epitélio respiratório, além de alterações na superfície externa das células epiteliais que revestem os filamentos foram observados, o que mostra que a dose subletal de Paration metílico, ainda que não tenha causado a morte dos peixes após 96h, alterou a morfologia das brânquias, levando a consequências fisiológicas secundárias.

5. Os experimentos demonstraram que *Metynnis roosevelti* é mais sensível ao organofosforado Paration metílico do que *Brachydanio rerio*, uma espécie utilizada como padrão em testes de toxicidade. Contesta-se, portanto, a generalização para peixes, a partir da utilização de uma espécie exótica, o *Brachydanio rerio*, em testes de toxicidade aguda para a determinação da CL 50, valor utilizado para classificação toxicológica de defensivos agrícolas em geral.

APÊNDICE 1

1. Soluções fixadoras e corantes para Microscopia Óptica.

1.1 Fluido de Bouin (BÜCHERL, 1962).

Fórmula :

Solução aquosa de ácido pícrico saturado.....	75 ml
Formol.....	25 ml
Ácido acético glacial.....	5 ml

Preparo : Misturar os componentes da fórmula e conservar a solução sob refrigeração.

1.2. Albumina de Meyer (CULLING et al, 1985).

Fórmula :

Glicerina.....	1 parte
Clara de ovo.....	1 parte
Alguns cristais de Timol.	

Preparo : Agite a glicerina com a clara de ovo por 30 minutos. Filtre e acrescente alguns cristais de Timol para evitar o aparecimento de fungos. Conserve sob refrigeração.

Modo de utilizar : Passe esta solução com algodão acrílico sobre as lâminas de vidro, formando uma película fina. Em seguida, acrescente 2 gotas de água destilada, deposite o corte e leve para esticar em placa aquecedora.

1.3. Hematoxilina de Harris (CULLING et al., 1985).

Reagentes :

Hematoxilina.....	1,0 g
Alúmen de Potássio ou de Amônio.....	20,0 g

Óxido de mercúrio amarelo.....	0,5 g
Álcool 95% PA.....	10, 0 ml
Água destilada.....	200,0 ml
Ácido acético glacial.....	5,0 g

Preparo : Dissolva a hematoxilina no álcool e reserve. Dissolva o alúmen de potássio na água destilada fervendo. Misture as duas soluções e adicione o óxido de mercúrio amarelo. Esfrie em água corrente. Filtre e adicione o ácido acético glacial somente na hora do uso.

1.4. Eosina (CULLING et al., 1985).

Solução estoque a 1%.

Reagentes :

Eosina YCL 45330.....	1,0 g
Água destilada.....	20,0 ml
Álcool 95% PA.....	80,0 ml

Preparo : Misture os reagentes até obter uma solução homogênea.

Solução para uso :

Eosina 1%.....	1 parte
Álcool 80% PA.....	3 partes

Preparo : Misturar os componentes da fórmula e acrescentar 0,5 ml de ácido acético glacial para cada 95 ml de solução corante antes do uso.

1.5. Azul de Alcian (CHAYEN e BITENSKY, 1991).

Reagentes :

Azul de Alcian.....	1,0 g
Água destilada.....	97,0 ml
Ácido acético glacial.....	3,0 ml

Ajustar ao pH desejado.

2. Soluções fixadoras para Microscopia Eletrônica de Varredura.

2.1. Fixadores.

- Glutaraldeído 2,5%, em tampão Cacodilato 0,2 M, pH 7,4
- 0,5 ml de Tetróxido de Ósmio (OsO_4) 4%, diluído em 1,5 ml do mesmo tampão.

2.2. Tampão de lavagem.

- Cacodilato 0,5 M, ajustado ao pH 7,4.

APÊNDICE 2

1. Processamento histológico para Microscopia Óptica (CULLING et al., 1985 modificado)

- a. Fixação em Bouin.....8h
- b. Lavagens sucessivas em álcool 70%.
- c. Desidratação em : álcool 80%.....1h
 - álcool 90%.....1h
 - álcool 95%.....1h
 - álcool 100%.....1h
 - álcool 100%.....1h
 - álcool 100% + xilol (1:1).....1h
- d. Diafanização em xilo PA.....2 x 5 min
- e. Impregnação em estufa a 56 °C com :
 - xilol + paraplast (1:1).....1h
 - paraplast.....1h
 - paraplast.....1h
- f. Emblocagem em moldes cúbicos de papel com paraplast solidificado a temperatura ambiente.
- g. Microtomia : A trimagem dos blocos foi feita na forma de pirâmide para serem obtido cortes de 3 µm em micrótomo Wetzlar.
- h. Montagem de lâminas : Os cortes obtidos na microtomia foram aderidos às lâminas com albumina de Meyer e água destilada. Em seguida foram esticados em placa aquecedora e secos a temperatura ambiente por 24h.

2. Processamento histológico para Microscopia Eletrônica de Varredura.

- 2.1. Fixar o material em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% e tampão Cacodilato 0,2 M, pH 7,4 "overnight", a 4 °C.

- 2.2.** Lavar em tampão Cacodilato 0,5 M pH 7,4, por 3 vezes durante 5 minutos cada.
- 2.3.** Pós-fixar com Tetróxido de Ósmio diluído em tampão cacodilato, por 1h a 4°C.
- 2.4.** Repetir o procedimento de lavagem do item **2.2**.
- 2.5.** Desidratar em série gradual de alcoóis 50%, 70%, 80%, 90% e 100% (2x), por 10 minutos cada.
- 2.6.** Submeter a ponto crítico e metalização.

APÊNDICE 3

1. Procedimento para coloração em Microscopia Óptica.

1.1. Hematoxilina e Eosina (BÜCHERL, 1962).

- a. Desparafinizar com 2 banhos de xilol, por 3 minutos cada.
- b. Hidratar em série gradual de alcoóis 100%, 90% e 70%, por 3 minutos cada.
- c. Lavar em água corrente e destilada.
- d. Corar com Hematoxilina de Harris por 3 minutos.
- e. Lavar em água corrente e destilada.
- f. Contracorar com Eosina solução corante por 3 minutos.
- g. Desidratar em série gradual de alcoóis 95%, 100% e 100% por 3 minutos cada.
- h. Tratar em álcool 100% + xilol (1:1) por 3 minutos.
- i. Diafanizar em dois banhos de xilol, 3 minutos cada.
- j. Montar as lâminas em resina Polymount.

1.2. Azul de Alcian pH 2,5 (CHAYEN e BITENSKY, 1991)

- a. Desparafinizar com 2 banhos de xilol por 3 minutos cada.
- b. Hidratar em série gradual de alcoóis 100%, 90% e 70% por 3 minutos cada.
- c. Lavar em água corrente e destilada.
- d. Corar com azul de Alcian pH 2,5 por 20 minutos.
- e. Lavar rapidamente em água corrente e destilada.
- f. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 3 minutos.
- g. Lavar em água corrente e destilada.

- h. Desidratar em série gradual de alcoóis 95%, 100% e 100% por 3 minutos cada.
- i. Tratar em álcool 100% + xilol (1:1) por 3 minutos.
- j. Diafanizar em xilol (2x) por 3 minutos cada.
- k. Montar as lâminas em resina Polymount.

1.3. Azul de Alcian pH 1,0 (CHAYEN e BITENSKY, 1991).

- a. Desparafinizar com dois banhos de xilol por 3 minutos cada.
- b. Hidratar em série gradual de alcoóis 100%, 90% e 70% por 3 minutos cada.
- c. Lavar em água corrente e destilada.
- d. Tratar com HCL 1N por 3 minutos.
- e. Lavar em água corrente e destilada.
- f. Corar com azul de Alcian pH 1,0 por 20 minutos.
- g. Lavar em água corrente e destilada.
- h. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 3 minutos.
- i. Lavar rapidamente em água corrente e destilada.
- j. Desidratar em série gradual de alcoóis 95%, 100% e 100% por 3 minutos cada.
- k. Tratar em álcool 100% + xilol (1: 1) por 3 minutos.
- l. Diafanizar em dois banhos de xilol por 3 minutos cada
- m. Montar as lâminas em resina Polymount.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, P. D. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. **J. Fish. Biol.** v. 6, p. 279 - 298, 1974.
- ABEL, P. D. Toxic action of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). **J. Fish. Biol.** v. 9, p. 441 - 446, 1976.
- ABNT. **Água - ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte 1 - sistema estático**, NBR 12714. Rio de Janeiro, 1993.
- AREFJEV, V. A. Karyotypic diversity of characid families (Pisces, Characidae). **Caryologia.** v. 43 (3-4), p. 291 - 304, 1990.
- ARILLO, A. ; MARGIOCCO, C. ; MELODIA, F. The gill sialic acid content as an index of environmental stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **J. Fish. Biol.** v. 15, p. 405 - 410, 1979.
- BARBERÁ, C. Pesticidas agrícolas. Barcelona : Ediciones Omega, 3. ed., 1976.
- BERTOLETTI, E. Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição. **Cetesb**, São Paulo, 1990.
- BETTEX-GALLAND, M. ; HUGHES, G. M. Contractile filamentous material in the pillar cells of fish gills. **J. Cell. Sci.** v. 13, p. 359 - 370, 1973.
- BOLIS, L. ; RANKIN, J. C. Interactions between vascular actions of detergent and catecholamines in perfused gills of european eel, *Anguilla anguilla* L. and brown trout, *Salmo trutta* L. **J. Fish. Biol.** v. 16, p. 61 - 73, 1980.
- BÜCHERL, W. **Técnicas microscópicas**. São Paulo : Polígono, 1962.

- BULL, D. ; HATHAWAY, D. **Pragas e venenos : agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo.** Petrópolis : Editora Vozes, 1986.
- CAIRNS, J. ; DICKSON, K. L. **Biological methods for the assessment of water quality.** American Society for Testing and Materials, 256 p., 1973.
- CHAYEN, J. ; BITENSKY, L. **Practical histochemistry.** N.York : Wiley, 2. ed, 1991.
- COUGHLAN, D. J. ; GLOSS, S. P. Early morphological development of gills in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). **Can. J. Zool.** v. 62, p. 951 - 958, 1984.
- CULLING, C. F. A. ; ALLISON, R. T. ; BARR, W. T. **Cellular Pathology Tecnique.** London : Butterworth & Co., 4. ed., 1985.
- DATTA-MUNSHI, J. S. ; HUGHES, G. M. - Scanning electron microscopy of the respiratory organs of juvenile and adult climbing perch, *Anabas testudineus*. **Japanese Journal of Ichthyology.** v. 33 (1), p. 39 - 45, 1986.
- DAVIS, P. W. ; WEDEMEYER, G. A. Na^+ , K^+ - activated-ATPase inhibition in rainbow trout : a site for organochlorine pesticide toxicity ? **Comp. Biochem. Physiol.** v. 40 B, p. 823 - 827, 1971.
- DAYE, P. G. ; GARSIDE, E. T. Structural alterations in embryos and alevins of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced by continuous or short-term exposure to acidic levels of pH. **Can. J. Zool.** v. 58, p. 27 - 43, 1980.
- DE BRUIJN, J. ; HERMENS, J. Inhibition of acetylcholinesterase and acute toxicity of organophosphorous compounds to fish : a preliminary structure-activity analysis. **Aquatic Toxicology.** v. 24, p. 257 - 274, 1993.
- DE JAGER, S. ; DEKKERS, W. J. Relations between gill structure and activity in fish. **Netherlands Journal of Zoology.** v. 25 (3), p. 276 - 308, 1975.

- EIRAS-STOFELLA, D. R. **Variabilidade morfológica da região faríngea dos arcos branquiais de algumas espécies de peixes (Teleostei), estudada através da microscopia eletrônica de varredura.** Curitiba, 1994. 125p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Zoologia), Universidade Federal do Paraná.
- EPA. **Ambient water quality criteria for parathion.** Washington, DC. 1986.
- EPSTEIN, F. H. ; SILVA, P. ; KORMANIK, G. Role of Na-K-ATPase in chloride cell function. **Am. J. Physiol.** v. 238 p. 246 - 250, 1980.
- ESPINOSA, H. R. M. Desenvolvimento e meio ambiente sob nova ótica. **Cetesb.** v. 7 (1), p. 40 - 44, 1993.
- EVANS, D. H. The fish gill : site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspectives.** v. 71, p. 47 - 58, 1987.
- EVANS, D. H. ; CAMERON, J. N. Gill ammonia transport. **Journal of Experimental Zoology.** v. 239, p. 17 - 23, 1986.
- EVANS, D. H. ; CLAIBORNE, J. B. ; FARMER, L. ; MALLERY, C. ; KRASNY, E. J. Fish gill ionic transport : methods and models. **Biol. Bull.** v. 163, p. 108 - 130, 1982.
- FANTA, E. Behavior of the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) under the influence of monochromatic background. **Netherlands Journal of Zoology.** 1995 (In press).
- FANTA, E. ; LUVIZOTTO, M. F. ; MEYER, A. P. Gill structure of the Antarctic fishes *Notothenia (Gobionotothen) gibberifrons* and *Trematomus newnesi*, Nototheniidae stressed by salinity changes and some behavioral consequences. **Nankyoku Shiriô (Antartic Record)**, v. 39 (1), p. 25 - 39, 1995.
- FERRAZ DE LIMA, C. L. B. ; REIS, N, S. ; CECCARELLI, P. S. Caracterização histológica da ictiofitiríase em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae). **B. Téc. Cepta.** v. 4 (2), p. 39 - 46, 1991.

- FLIK, G. ; VERBOST, P. M. Calcium transport in fish gills and intestine. **J. Exp. Biol.** v. 184, p. 17 - 29. 1993.
- FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arq. Zool.** v. 6, p. 392 - 398, 1950.
- GALIS, F. ; BAREL, C. D. N. Comparative functional morphology of the gills of african lacustrine cichlidae (Pisces, Teleostei). An eco-morphological approach. **Netherlands Journal of Zoology.** v. 30 (2), p. 392 - 430, 1980.
- GÉRY, J. **Characoids of the world.** Neptune City, TFH publications, 672 p., 1977.
- GIESSMANN, G. H. **Interação, crescimento e comportamento de *Tilapia rendalli* (Cichlidae) e *Metynnis roosevelti* (Characidae) (Pisces).** Curitiba, 1994, 164 p. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná.
- GOELLNER, C. I. **Impacto ambiental dos defensivos agrícolas : metodologia e interpretação dos resultados.** Palestra ministrada aos técnicos da Associação Nacional dos Defensivos Agrícolas, São Paulo, 1987.
- GOELLNER, C. I. **Utilização dos defensivos agrícolas no Brasil : análise do seu impacto sobre o ambiente e a saúde humana.** São Paulo: Ed.Artgraph, 102 p., 1993.
- GOLDSTEIN, L. Gill nitrogen excretion. In: HOULIHAN, D. F. ; RANKIN, J. C. ; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills.** Cambridge University Press, 1982. p. 193 - 206.
- GONZALES, R. J. ; McDONALD, D. G. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. **J. Exp. Biol.** v. 163, p. 317 - 332, 1992.
- GOSS, G. G. ; PERRY, S. F. ; WOOD, C. M. ; LAURENT, P. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology.** v. 263, p. 143 - 159, 1992.
- HOSSLER, F. E. Gill arch of the mullet, *Mugil cephalus*. III. Rate of response to salinity change. **Am. J. Physiol.** v. 238, p. 160 - 164, 1980.

- HOSSLER, F. E. ; HARPOLE, J. H. ; KING, J. A. The gill arch of the striped bass, *Morone saxatilis*. I. Surface ultrastructure. **J. Sci. Microsc. Cytol.** v. 18 (3), p. 519 - 528, 1986.
- HUGHES, G. M. Species variation in gas exchange. **Proceedings of the Royal Society of Medicine.** v. 59 (6), p. 494 - 500, 1966.
- HUGHES, G. M. Scanning electron microscopy of the respiratory surfaces of trout gills. **J. Zool.** v. 188, p. 443 - 453, 1979.
- HUGHES, G. M. An introduction to the study of gills. In: HOULIHAN, D. F. ; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills.** Cambridge University Press, 1982. p. 1 - 24.
- HUGHES, G. M. ; BYCZKOWSKA-SMYK, W. Ultrastructure of secondary gill lamella of the icefish, *Chaenocephalus aceratus*. **J. Zool.** v. 174, p. 79 - 87, 1974.
- HUGHES, G. M. ; DATTA-MUNSHI, J. S. Scanning electron microscopy of the respiratory surfaces of *Saccobranchus* (= *Heteropneustes*) *fossilis* (Bloch). **Cell. Tiss. Res.** v. 195, p. 99 - 109, 1978.
- KAWALL, H. G. **Efeitos de águas ácidas em *Gymnocorymbus ternetzy*** (Boulenger, 1895) (Pisces : Characidae). Curitiba, 1993. Tese (Mestrado em Zoologia). Universidade Federal do Paraná.
- KUMARAGURU, A. K. ; BEAMISH, F. W. H. ; FERGUSON, H. W. Direct and circulatory paths of Permethrin (NRDC-143) causing histopathological changes in the gills of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **J. Fish. Biol.** v 20, p. 87 - 91, 1982.
- KHAN, R. A. ; KICENIUK, J. Histopathological effects of crude oil on Atlantic cod following chronic exposure. **Can. J. Zool.** v. 62, p. 2038 - 2043, 1984.
- LAURENT, P. ; PERRY, S. F. Environmental effects on fish gill morphology. **Physiological Zoology.** v. 64 (1), p. 4 - 25, 1991.

- LEWIS, S. V. ; POTTER, I. C. A light and electron microscope study of the gills of larval lampreys (*Geotria australis*) with particular reference to the water-blood pathway. **J. Zool. Lond.** v. 198, p. 157 - 176, 1982.
- LIN, H. ; RANDALL, D. Evidence for the presence of an electrogenic proton pump on the trout gill epithelium. **J. Exp. Biol.** v. 161, p. 119 - 134, 1991.
- LINDESJÖÖ, E ; THULIN, J. Histopathology of skin and gills of fish in pulp mill effluents. **Dis. Aquat. Org.** v. 18, p. 81 - 93, 1994.
- LOCK, R. A. C. ; van OVERBEEKE, A. P. Effects of mercuric chloride and methylmercuric chloride on mucus secretion in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 69 C, p. 67 - 73, 1981.
- LUVIZOTTO, M. F. **Efeito de diferentes salinidades sobre as células de cloreto e as células secretoras do epitélio branquial do peixe antártico *Nototheniops nudifons* (Lonnberg, 1905).** Curitiba, 1994. Tese (Mestrado em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MACHADO, P. A. L. **Direito ambiental brasileiro.** São Paulo: Malheiros Editores Ltda., 4. ed., 1992.
- MACHADO-ALLISON, A. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte II. Discusion sobre la condicion monofilética de la subfamilia. **Acta. Biol. Venez.** v. 11(4), p. 145 - 195, 1983.
- MAGOR, B. G. Gill histopathology of juvenile *Oncorhynchus kisutch* exposed to suspended wood debris. **Can. J. Zool.** v. 66, p. 2164 - 2169, 1988.
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants : a statistical review. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 42, p. 630 - 648, 1985.

- MALLATT, J. ; RIDGWAY, R. L. ; PAULSEN, C. Ultrastructural effects of 3-trifluor-4-nitrophenol on gills of the larval lamprey *Petromyzon marinus*. **Can. J. Zool.** v. 63, p. 155 - 164, 1985.
- MATTHIESSEN, P. ; BRAFIELD, A. E. The effects of dissolved zinc on the gills of the stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. **J. Fish. Biol.** v. 5, p. 607 - 613, 1973.
- McBRIDE, R. K. ; RICHARDS, B. D. The effects of some herbicides and pesticides on sodium uptake by isolated perfused gills from the carp *Cyprinus carpio*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 51 C, p. 105 - 109, 1975.
- McDONALD, D. G. The effects of H⁺ upon the gills of freshwater fish. **Can. J. Zool.** v. 61, p. 691 - 703, 1983.
- McDONALD, D. G. ; CAVDEK, V. ; ELLIS, R. Gill design in freshwater fishes : interrelationships among gas exchange, ion regulation, and acid-base regulation. **Physiological Zoology.** v. 64 (1), p. 103 - 123, 1991.
- McKIM, J. M. ; ERICKSON, R. J. Environmental impacts on the physiological mechanisms controlling xenobiotic transfer across fish gills. **Physiological Zoology.** v. 64 (1), p. 39 - 67, 1991.
- METCALFE, J. D. ; BUTLER, P. J. The functional anatomy of the gills of the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). **J. Zool. Lond (A).** v. 208, p. 519 -530, 1986.
- MITZ, S. V. ; GIESY, J. P. Sewage effluent biomonitoring. I. Survival, growth, and histopathological effects in channel catfish. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 10, p. 22 - 39, 1985.
- MUELLER, M. E. ; SANCHEZ, D. A. ; BERGMAN, H. L. ; McDONALD, D. G. ; RHEM, R. G. ; WOOD, C. M. Nature and time course of acclimation to aluminum in juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). II. gill histology. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 48, p. 2016 - 2027, 1991.

- NICOLATO, R. **Jornal Multirural - Multipress Agência de Notícias**, Curitiba, junho de 1994. n. 12, p. 4 - 5.
- NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endossulfan. **Aquatic Toxicology**. v. 23, p. 65 - 84, 1992.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. ; TURCATI, N. M. ; CARVALHO, C. S. ; CARDOSO, R. ; FANTA, E. Efeito tóxico do HgCl₂ na estrutura dos arcos branquiais de *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces, Siluroidei). **II Simpósio sobre meio ambiente**. Univ. Salgado de Oliveira, Rio de Janeiro, 1994.
- ORONSAYE, J. A. O. ; BRAFIELD, A. E. The effect of dissolved cadmium on the chloride cells of the gills of the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. **J. Fish. Biol.** v. 25, p. 253 - 258, 1984.
- PERERA, K. M. L. Ultrastructural of the primary gill lamellae of *Scomber australasicus*. **J. Fish Biol.** v. 43, p. 45 - 49, 1993.
- PIIPER, J. ; SCHEID, P. Physical principles of respiratory gas exchange in fish gills. In: HOULIHAN, D. F. ; RANKIN, J. C. ; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. Cambridge University Press, 1982. p. 45 - 62.
- PIRES, J. S. R. ; SANTOS, J. E. Bacias hidrográficas : interação entre meio ambiente e desenvolvimento. **Ciência Hoje**. v. 19 (110), p. 40 - 45, 1995.
- PISAM, M. ; CAROFF, A. ; RAMBOURG, A. Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater-adapted euryhaline fish : *Lebistes reticulatus*; their modifications during adaptation to saltwater. **American Journal of Anatomy**. v. 179, p. 40 - 50, 1987.
- POWELL, M. D. ; SPEARE, D. J. ; BURKA, J. F. Fixation of mucus on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) gills for light and electron microscopy. **J. Fish Biol.** v. 41, p. 813 - 824, 1992.

- PREIN, M. ; KUNZMANN, A. Structural organization of the gills in pipefish (Teleostei, Syngnathidae). **Zoomorphology**. v. 107 p. 161 - 168, 1987.
- RANDALL, D. Blood flow through gills. In: HOULIHAN, D. F. ; RANKIN, J. C. ; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. Cambridge University Press, 1982. p. 173 - 192.
- RANKIN, J. C. ; STAGG, R. M. ; BOLIS, L. Effects of pollutants on gills. In: HOULIHAN, D. F. ; RANKIN, J. C. ; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. Cambridge University Press, 1982. p. 207 - 220.
- RAO, K. S. P. ; RAO, K. V. R. Lipid derivatives in the tissues of the freshwater teleost, *Saurotherodon mossambicus* (alias *Tilapia mossambica*) (Peters) - Effect of methyl parathion. **Proc. Indian Natn. Sci. Acad.** v. 47 B (1), p. 53 - 57, 1981.
- ROMER, A. S. ; PARSONS, T. S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Ateneu, 1985.
- SAYER, M. D. J. ; DAVENPORT, J. The relative importance of the gills to ammonia and urea excretion in five seawater and one freshwater teleost species. **J. Fish Biol.** v. 31, p. 561 - 570, 1987.
- SCHIMD, O. J. ; MANN, H. Action of a detergent (dodecylbenzenesulphonate) on the gills of the trout. **Nature**. v. 192, p. 675, 1961.
- SILVA, H. C. **Efeitos subletais do folidol 600 em *Callichthys callichthys* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Teleostei)**. Curitiba, 1989. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná.
- SILVA, H. C. ; MEDINA, H. S. G. ; FANTA, E. ; BACILA, M. Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (Methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces, Teleostei). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 105 C (2), p. 197 - 201, 1992.

- SKIDMORE, J. F. Respiration and osmoregulation in rainbow trout with gills damaged by zinc sulphate. **J. Exp. Biol.** v. 52, p. 481 - 494, 1970.
- SMART, G. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish. Biol.** v. 8, p. 471 - 475, 1976.
- SODERBERG, R. W. ; McGEE, M. V. ; BOYD, C. E. Histology of cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **J. Fish. Biol.** v. 24, p. 683 - 690, 1984.
- SPRAGE, J. P. The ABC's of pollutant bioassay using fish. In: CAIRNS, J. ; DICKSON, K. L. **Biological methods for the assessment of water quality**. Philadelphia : ASTM, 1973. p. 6 - 30.
- STOKER, P. W. ; LARSEN, J. R. ; BOOTH, G. M. ; LEE, M. L. Pathology of gill and liver tissues from two genera of fishes exposed to two coal-derived materials. **J. Fish. Biol.** v. 27, p. 31 - 46, 1985.
- VERBOST, P. M. ; SCHOENMAKERS, T. J. M. ; FLIK, G. ; WENDELAAR BONGA, S. E. Kinetics of ATP and Na⁺ gradient driven Ca⁺² transport in basolateral membranes from gills of freshwater and seawater adapted tilapia. **J. Exp. Biol.** v. 186, p. 95 - 108, 1994.
- VERNALHA, M. M. ; SILVA, R. P. ; GABARDO, J. C. ; COSTA, F. A. R. **Toxicologia dos inseticidas**. Universidade Federal do Paraná, Série Didática, v. 5, 86 p., 1977.
- WENDELAAR BONGA, S. E. ; LOCK, R. A. C. Toxicants and osmoregulation in fish. **Netherlands Journal of Zoology**. v. 42 (2-3), p. 478 - 493, 1992.
- WITHERS, P. C. **Comparative animal physiology**. Saunders College Publishing, 949 p., 1992.
- ZAGATTO, P. A. Avaliação de risco para homologar agrotóxicos. **Ambiente**. v. 7 (1), p. 23 - 28, 1993.