

EDSON DE LARA RODRIGUES

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM HEPATÓCITOS
DE *Brachydanio rerio* (HAMILTON-BUCHANAN, 1822,
1823) EXPOSTO À AÇÃO DO ORGANOFOSFORADO
DIMETOATO 500 EM DOSE SUBLETAL

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

Orientadora: Dr.^a Edith Susana Elisabeth Fanta

CURITIBA
1994

EDSON DE LARA RODRIGUES

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM HEPATÓCITOS DE
Brachydanio rerio (HAMILTON-BUCHANAN, 1822, 1823) EXPOSTO
À AÇÃO DO ORGANOFOSFORADO DIMETOATO 500 EM
DOSE SUBLETAL

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Profa. Dra. Edith Susana Elisabeth Fanta
 Departamento de Biologia Celular, UFPR

 Profa. Dra. Dorly de Freitas Buchi
 Departamento de Biologia Celular, UFPR

 Prof. Dr. Francisco Hernandez-Blasques
 Departamento de Histologia, USP

Curitiba, 23 de Novembro de 1994

" A maior necessidade do mundo é a de homens - homens que se não comprem nem se vendam; homens que no íntimo da alma sejam verdadeiros e honestos; homens que não temam chamar a transgressão pelo seu nome exato; homens, cuja consciência seja tão fiel ao dever como a bússola o é ao pólo; homens que permaneçam firmes pelo que é reto, ainda que caiam os céus. Mas um caráter tal não é obra do acaso; nem se deve a favores e concessões especiais da Providência. Um caráter nobre é o resultado da disciplina própria, da sujeição da natureza inferior pela superior - a renúncia do *eu* para o serviço de amor a Deus e ao homem. "

E.G. WHITE

AGRADECIMENTOS

Ao vencer mais uma etapa de minha vida, gostaria de render homenagem de agradecimento ao " Grande Arquiteto do Universo, Deus ", por ter-me concedido mais esta oportunidade de desenvolver meu intelecto e fortalecer a minha alma, situando-me numa posição que enseja adquirir sabedoria para empregar os meus talentos a serviço do Mestre, em prol de meu semelhante.

Ao término deste trabalho, registro meu reconhecimento às pessoas e entidades que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização do mesmo.

Desejo expressar minha elevada estima à minha amável esposa Sueli, pelo constante estímulo, amor e dedicação que me proporcionou no decorrer dos anos em que estive realizando este estudo.

A meus filhos Allan Diego e Jean Filipe, pelo perdão a mim concedido, em face dos longos períodos em que tive de estar ausente de seus problemas.

Aos meus pais Samuel e Alair, pelos sacrifícios nunca medidos em todos os momentos e que, desde muito cedo, acreditaram em mim e, apesar de suas limitadas visões, conseguiram impressionar o meu ser, de modo que eu me tornasse a pessoa que hoje sou.

À Professora Dra. Edith Susana Elisabeth Fanta, que me orientou e ofereceu sua compreensão, constante disponibilidade e amizade, subsídios valiosos, aliados às lições implícitas no seu exemplo técnico-científico.

Às amigas Ana Cristina C. Viana e Silvia Zanetti da Cruz, pela ajuda técnica, nos processamentos e nas fotomicrografias utilizadas nesta dissertação.

Às amigas: Solange Maria da C. Ribas, pela disponibilidade em assessorar-me na produção do material de microscopia eletrônica, e Sônia Regina Grötzner, pelo auxílio na obtenção das fotos utilizadas neste trabalho.

À Professora Célia Regina C. Franco, pelas sugestões e ajuda na composição das eletromicrografias.

À Professora Dra. Márcia H. Mendonça, pelo estímulo e acolhida, quando de meu ingresso no Curso de Mestrado.

À toda equipe de pesquisa do Laboratório de Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular da UFPR, pela amizade, companherismo, solidariedade e colaboração demonstrados ao longo do convívio.

Ao meu irmão Edmir, pelo assessoramento técnico de informática.

Aos amigos Francisco Zanin e Evandro Varela, pelo empréstimo de equipamentos de informática.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e do Departamento de Biologia Celular, pelo interesse e amizade.

Ao amigo Rubens Simões Gayer, técnico do Departamento de Biologia Celular, pelas informações técnicas prestadas.

À Bióloga Alcianne Crivellaro Viana, pela amizade e companherismo durante o período de estágio no Laboratório de Avaliação da Toxicidade para Peixes, UFPR.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, na pessoa da Professora Dra. Maria Célia Jamur.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos, concedida durante o tempo de desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores e funcionários da UFPR que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho e para meu desenvolvimento profissional.

SUMÁRIO

Lista de ilustrações.....	ix
Lista de Abreviações e Siglas	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1.Introdução	01
1.1. Objetivos	09
2. Materiais e Métodos.....	10
2.1. Material Biológico.....	10
2.1.1. Espécie Estudada	10
2.1.2. Aclimação.....	11
2.2. Substância Testada e suas Características	11
2.3. Determinação da CL 50 e Dose Subletal	13
2.4. Bioensaio	14
2.5. Coleta do Material e Pré-Fixação	15
2.6. Processamento Histológico.....	15
2.6.1. Técnicas para Microscopia Óptica.....	16
2.6.2. Técnicas para Microscopia Eletrônica	17
3. Resultados.....	18
3.1. Determinação da Dose Subletal do Dimetoato 500 para <i>Brachydanio rerio</i>	18
3.1.1. Resultados do Teste Preliminar para CL 50.....	18
3.1.2. Resultados Definitivos para CL 50.....	19

3.1.3. Análise Estatística dos Resultados do Teste de Toxicidade	
Aguda	20
3.2. Morfologia Hepática Normal de <i>Brachydanio rerio</i> (Controle)	21
3.3. Efeitos do Dimetoato 500 sobre a Morfologia Hepática do	
<i>Brachydanio rerio</i>	23
3.3.1. Tempo de Exposição 2 horas.....	23
3.3.2. Tempo de Exposição 4 horas.....	23
3.3.3. Tempo de Exposição 8 horas.....	24
3.3.4. Tempo de Exposição 24 horas	24
3.3.5. Tempo de Exposição 72 horas	25
4. Discussão.....	47
5. Conclusão.....	59
Apêndice I: Soluções Fixadoras e Corantes para M.O.....	61
Soluções Fixadoras e Contrastação para M.E.T.	63
Apêndice II: Roteiro de Processamentos Histológicos.....	65
Apêndice III: Roteiro de Procedimentos para Coloração M.O.....	67
Roteiro para Contrastação em M.E.T.....	67
Referências Bibliográficas	69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 01 - (a,b) Exemplos de <i>Brachydanio rerio</i>	26
Fig. 02 - Laboratório de Impacto Ambiental, UFPR.....	27
Fig. 03 - Vista geral das cubas utilizadas para bioensaio agudo (CL 50)	28
Fig. 04 - Secção de fígado normal de <i>B. rerio</i> em M.O.....	28
Fig. 05 - (a) Estrutura normal de fígado (M.O.)	29
(b) Cordões hepáticos, granulações citoplasmática e sinusóide (M.O.)	29
Fig. 06 - (a,b) Hepatócito de <i>B. rerio</i> controle (M.E.T.) vista geral.....	30
Fig. 07 - (a,b,) Núcleo, nucléolo e sinusóide hepático de <i>B. rerio</i> (M.E.T.)...	31
Fig. 08 - (a,b,c) REr., mitocôndrias e glicogênio hepático de <i>B. rerio</i> (M.E.T.).....	32
Fig. 09 - (a,b,c,d) Hepatócito de <i>B. rerio</i> , com suas organelas (M.E.T.).....	33
Fig. 10 - (a,b,c) Extensão do REr. em hepatócito de <i>B. rerio</i> (M.E.T.)	34
Fig. 11 - (a,b) União das membranas dos hepatócitos de <i>B. rerio</i> (M.E.T.).	35
Fig. 12 - Canalículo biliar, REr, REl. (M.E.T.).....	35
Fig. 13 - (a,b,c); 14; 15 - Células de defesa no interior de sinusóides de <i>B. rerio</i> (M.E.T.)	36
Fig. 16 - Fígado de animal contaminado após 2 horas (M.O.)	37
Fig. 17 - Vacuolização e desorganização celular em contaminado 2 horas (M.O.)	37
Fig. 18 - Lateralização nuclear e condensação da cromatina (2 h.) (M.O.)	38
Fig. 19 - Início de processo de necrose focal, contaminado 2 horas	38

Fig. 20 - Granulações finas e grossas em hepatócito de <i>B. rerio</i> 4 horas (M.O.)	39
Fig. 21 - Desaparecimento da membrana celular do hepatócito de <i>B. rerio</i> em contaminado 4 horas (M.O.)	39
Fig. 22 - Observação de células ainda normais, em contaminado 4 horas (M.O.)	40
Fig. 23 - Regiões com e sem vacuolização, em contaminado 8 horas (M.O.)	40
Fig. 24 - Citoplasma granular, vacúolos diminuídos em contaminado 8 horas (M.O.)	41
Fig. 25 - Tempo caracterizado pelos grânulos citoplasmáticos, (8 h.)(M.O.)	41
Fig. 26 - Núcleos com diversos diâmetros e grau de densidade 8 horas (M.O.)	42
Fig. 27 - Perda de conteúdo celular. (8 h.) (M.O.)	42
Fig. 28 - Tecido hepático necrosado e início de necrose em contaminado 24 horas (M.O.)	43
Fig. 29 - Lateralização nuclear e vacuolização citoplasmática, em contaminado 24 horas (M.O.)	43
Fig. 30 - Vacuolização e necrose em contaminado 24 horas (M.O.)	44
Fig. 31 - Extravasamento sangüíneo e necrose (24 h.) (M.O.)	44
Fig. 32 - Fígado de <i>B. rerio</i> , 72 horas após exposição (M.O.).....	45
Fig. 33 - Retomada da reorganização após 72 horas da contaminação ...	45
Fig. 34 - Necrose em hepatócito de <i>B. rerio</i> em T ₇₂ (M.O.).....	46
Fig. 35 - Núcleos retornando a normalidade, em contaminado 72 horas (M.O.)	46

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

UFPR - Universidade Federal do Paraná

M.O. - Microscopia Óptica

M.E. - Microscopia Eletrônica

M.E.T. - Microscopia Eletrônica de Transmissão

μ l - microlitro (s)

ml - mililitro

l - litro (s)

μ g - micrograma

mg - miligrama (s)

g - grama (s)

μ m - micrômetro (s)

mm - milímetro (s)

cm - centímetro (s)

μ S - microsiemens

% - percentagem

min - minuto (s)

h - hora (s)

M - Molar

N - Normal

°C - Grau(s) Celsius

CL 50 - Concentração letal para 50% da população

RESUMO

RESUMO

Nas últimas décadas, a síntese de novas substâncias pela indústria química trouxe uma grande contribuição para a melhoria da qualidade de vida. Entretanto, há efeitos importantes sobre o ambiente biótico e abiótico que ocorrem em níveis agudos e crônicos, em doses subletais, provocados por estes produtos ou seus subprodutos.

Entre as substâncias introduzidas no meio ambiente, encontramos os pesticidas de uso agropecuário.

Embora os pesticidas produzam resultados positivos no controle de pragas, seus efeitos adversos sobre organismos devem ser considerados.

Neste trabalho foram estudadas as alterações morfológicas em hepatócitos de *Brachydanio rerio* (HAMILTON-BUCHANAN, 1822, 1823) exposto ao organofosforado Dimetoato 500, em dose subletal de 0,025 µl/l.

Em bioensaio agudo, a exposição ocorreu durante 24 horas, sendo os peixes mantidos em meio descontaminado até um total de 72 horas. As alterações observadas nas primeiras 24 horas foram: descaracterização da forma celular, com perda da visualização da membrana plasmática; lateralização nuclear; núcleos com diversos diâmetros e graus de densidade; cromatina condensada na região central e outros núcleos picnóticos; aumento de vacúolos citoplasmáticos; após 8 horas há grande quantidade de grânulos citoplasmáticos e necrose focal. Após 72 horas ainda há intensas modificações, mas pode ser vista regeneração focal dos hepatócitos, ductos e sinusóides. Estudos adicionais sobre a toxicidade do Dimetoato a longo prazo seriam necessários, visto que alterações histológicas significativas foram observadas, sugerindo uma possível evolução de neoplasias.

ABSTRACT

ABSTRACT

During the last decades, new substances were synthesised by the chemical industry contributing to rise the life quality. But some important effects on the biotic and the abiotic environment, are caused by these products or their subproducts, at acute or chronical level, even in sublethal concentrations.

Among the substances that enter the environment, pesticides used in agropecuary became significant.

Even producing good results in fighting plagues, their adverse effects on organisms has to be taken into account.

The morphological changes in hepatocytes of the fish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822, 1823), caused by the organophosphate (OP) Dimetoato 500, in a sublethal dosis of 0,025 µl/l, were studied.

In an acute test the fish were exposed for 24 hours to the OP, being then maintained in clean water for the next 48 hours.

The main changes that occurred after 24 hours were loss of the typical cell shape, and of clear cell limits; migration of nuclei and changes in its shape and size; chromatin condensed in the central region of nuclei and some others picnotic; increase in cytoplasmic vacuoles. After 8 hours high amount of cytoplasmic grannules and focal necrosis. After 72 hours there are still strong changes but focal regeneration of the hepatocytes, canalicules, ducts and synusoids is seen.

Even having been exposed to the half of the dosis considered as the lethal level, significant changes of the liver tissue were observed sugesting a possible evolution into hepatic neoplasia.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O contínuo aumento da população humana exige uma crescente produção alimentar. A síntese de novas substâncias químicas, nos últimos decênios, trouxe grande contribuição para a produtividade e melhoria da qualidade de vida. A partir do desenvolvimento da era industrial, o homem passou a transformar matéria prima em ferramentas, máquinas e insumos. O resultado destas atividades são resíduos inúteis e o uso de muitas substâncias que, com o tempo, acabam comprometendo a biosfera, causando problemas que, às vezes, somente são identificadas após a ocorrência de casos graves e extremos.

Entre as substâncias introduzidas no meio ambiente e que poluem a água, solo e alimentos, encontramos os pesticidas de uso agropecuário. Os pesticidas ou defensivos agrícolas, como substâncias químicas que são, podem ter ação fisiológica sobre organismos vivos, incluindo outros que não são seu alvo. Assim, seu uso deve ser equilibrado, levando-se em conta todas as informações sobre seus efeitos, tanto em pessoas que manipulam os produtos nas fábricas e nos campos, quanto nos consumidores dos alimentos que apresentam resíduos, assim como nos animais domésticos e silvestres, nos organismos aquáticos e no meio ambiente. A classificação destas substâncias está ligada à sua ação e, assim, temos: inseticidas, herbicidas e fungicidas. Em relação a sua estrutura química, podem ser classificadas em organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e muitos outros (ITAL, 1989).

Aproximadamente 70% das substâncias químicas que têm sido sintetizadas são usadas na agricultura, sendo que 90% são inseticidas, herbicidas e fungicidas (JONSSON, 1991).

O uso dos inseticidas fosforados iniciou-se com os trabalhos de Gerhard Schrader em 1937, que sintetizou cerca de 300 compostos orgânicos fosforados. Demonstrou serem altamente tóxicos para os insetos, ocasionando elevado índice de mortalidade (ALMEIDA e PIEDADE, 1958).

A partir da descoberta dos organofosforados como agentes anticolinesterásicos, cresceu também o interesse em empregá-los como inseticidas, bem como em estudar suas propriedades químicas e bioquímicas, inclusive com a finalidade de serem reconhecidos como potenciais armas de guerra (KOELLE e GILMAN, 1949).

Os organofosforados, considerados inseticidas de 2ª geração, são até hoje amplamente utilizados em nossa agricultura, com poucos casos de restrição, podendo ser sistêmicos e não sistêmicos. Os inseticidas organofosforados podem ser derivados do ácido fosfórico e fosfônico, como ésteres destes ácidos, interferindo às vezes em diferentes estruturas orgânicas e em níveis diferentes.

Seus efeitos são conhecidos nos vertebrados, como inibidores da acetilcolinesterase (AChE), em diferentes níveis de inibição, causando a fosforilação da AChE (COPPAGE, 1972). Estudos em hamsters revelaram que os diferentes graus de inibição da AChE foram sempre acompanhados pela diminuição acentuada do nível de norepinefrina (NE) (BRZEZINSKI e WYSOCKA-PARUSZEWSKA, 1980).

Segundo SILVA (1989) e SILVA *et al.* (1993), após 96 horas da administração, por via intra peritoneal, do organofosforado formulado Folidol 600, no peixe *Callichthys callichthys*, observou-se necrose focal e

degeneração nuclear no fígado; após 120 horas as lesões se mantinham, sendo observadas, ainda, degeneração nuclear, vacuolização celular e necrose focal intensas, bem como acentuada redução do glicogênio hepático.

Em estudos com o organofosforado Paration metílico, comparando-se diferentes espécies de peixes, verificou-se que alguns sintomas se repetiam em todas elas, mas que há grandes diferenças específicas quanto à sensibilidade, à velocidade de reação e à capacidade de recuperação (FANTA *et. al.*, 1988).

Brachydanio rerio, exposto à concentração de 0,9 mg/l do organofosforado Malation, demonstrou significativas alterações no número de células hepáticas e no índice núcleo-citoplasma, mesmo quando exposto à dose subletal por 4 meses. Dois meses não foram suficientes para a recuperação dos peixes, concluindo-se que o produto fica acumulado no fígado do animal, como resultado de sua metabolização a uma forma mais tóxica, o malaxon, retardando-se assim o seu efeito (ANSARI e KUMAR, 1987a). Também chegou-se à conclusão de que o Malation não inibe somente a AchE, mas também altera os parâmetros bioquímicos do fígado, sendo que a intoxicação, bem como a recuperação, é diretamente proporcional à concentração do produto (KUMAR e ANSARI, 1986).

Os organofosforados são utilizados amplamente em todas as fases do controle de pragas agrícolas e em ectoparasitas animais, sendo que estas substâncias freqüentemente alcançam o meio ambiente aquático. Foi estudada a captação e retenção do malation em *Cyprinus carpio*, e observada a distribuição dos resíduos nos diferentes tecidos, em peixes expostos a 5 mg/l por 4 dias (BENDER, 1969):

Tecido	Resíduo ($\mu\text{g/g.}$)
Cérebro-----	2,58 \pm 1,94
Sangue-----	4,97 \pm 4,30
Brânquias-----	3,23 \pm 2,82
Fígado-----	66,59 \pm 25,0
Músculo-----	28,43 \pm 5,11

Verifica-se, portanto, que o fígado é um órgão intensamente afetado, acumulando grande quantidade do produto.

Estudando o impacto tóxico de organofosforados sobre o metabolismo de carboidratos em *Clarias batrachus*, GHOSH (1987) observou um decréscimo na taxa de glicogênio a nível hepático e muscular, sendo que a glicose circulante tornou-se elevada, como também o ácido láctico. Já o metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos no fígado de *Brachydanio rerio*, foi reduzido significativamente, enquanto que os aminoácidos foram significativamente aumentados (ANSARI e KUMAR, 1988).

Foram observados efeitos da ação de organofosforados em dose subletal, como deformação esquelética em *Ictalurus punctatus* e *Brachydanio rerio*, indícios de redução do índice gonadossomático; eritropenia; necrose, hiperplasia e edema de brânquias, bem como vacuolização e necrose do fígado (AREECHON e PLUMB, 1990; KUMAR e ANSARI, 1984).

Em estudos no peixe de água doce *Puntius conchoniis*, exposto cronicamente a uma concentração subletal (109,5 ppm) do organofosforado Phosphamidon, verificou-se hiperglicemia, hiperlactemia,

hipercolesterolemia, hiperlipemia, hiperproteinemia e aumento de ácidos graxos no sangue, manifestados em peixes expostos por mais de 4 semanas. Houve aumento do índice hepatossomático, hepatite moderada, sinais de lipólise e quebra de proteínas nos músculos esqueléticos (GILL, PANDE e TEWARI, 1990).

Os efeitos de dose subletal de organofosforado sobre os níveis hematológicos de *Channa punctatus* demonstraram um decréscimo de eritrócitos e concentração de hemoglobina e que, nas primeiras 24 horas, houve um aumento de diâmetro nuclear. Após 96 horas de exposição, um decréscimo no diâmetro nuclear do eritrócito (LONE e JAVAID, 1976).

A nível reprodutivo, quando *Brachydanio rerio* esteve exposto a 0,9 mg/l de malation durante 7 dias, mostrou-se alterado, devido a modificação no ovário: os folículos maduros tornaram-se atrésicos com perda da característica forma esférica. Quando expostos a dose de 0,5 mg/l por 4 meses, observou-se redução de folículos maduros e os peixes não desovaram, sendo que, mesmo após o retorno por dois meses à água descontaminada, não foi suficiente para sua recuperação (ANSARI, SRIVASTAVA e KUMAR, 1986). Além disso, o ácido nucleico (DNA e RNA), proteínas e atividade de fosfatase alcalina foram significativamente diminuídos no ovário do *B. rerio*, após exposição ao organofosforado. Estudos histopatológicos revelaram interrupção no desenvolvimento das oogônias. Depois de transferidos para água descontaminada, houve uma tendência à recuperação de todos os parâmetros estudados (ANSARI e KUMAR, 1987b).

Outro fator que merece consideração é o das alterações histopatológicas provocadas em peixes, conseqüentes dos efeitos dos pesticidas, permitindo um diagnóstico das lesões produzidas e seu

mecanismo de atuação, principalmente aqueles provocados por doses subletais e por bioacumulação.

ADENEY e MATTHIESSEN (1979) estudaram os efeitos do organofosforado Abate (temephos) usado no controle de moscas negras, nos rios da África, em dose subletal com *Sarotherodon mossambicus*. Observaram que não ocorreram efeitos sérios durante o tempo de exposição empregado: os limitados efeitos detectados não seriam danosos para uma população selvagem. Esta opinião é sustentada por outros trabalhos que mostraram que peixes podem tolerar algumas aplicações do organofosforado, sugerindo baixa toxicidade. Contudo, é de se acreditar que qualquer alteração que possa aparecer na população de peixes tem como causa principal a capacidade de atuação do produto sobre os insetos aquáticos que formam a dieta de muitos peixes dos rios da África.

Entre os derivados fosforados, encontra-se o Dimetoato, 0,0-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato (IUPAC), organofosforado solúvel em água 25 g/l a 21° C (BRASIL, 1988), sendo que o seu metabolismo, nos vertebrados, ocorre quase que exclusivamente no fígado.

O sistema nervoso periférico autônomo, com suas ramificações simpáticas e parassimpáticas, demonstram sinais do envenenamento como resultado da inibição da acetilcolinesterase. Assim, temos os sintomas de intoxicação de organofosforado nas diversas partes do sistema nervoso (LARINI, 1979).

Em mamíferos, quando expostos a doses agudas e letais, a morte se dá por asfixia, provocando anóxia cerebral, causada por bronquioconstrição, presença de secreção no aparelho respiratório, queda de pressão arterial, bloqueio neuromuscular respiratório, com falhas no centro respiratório do cérebro (ITAL, 1989).

Como parte de um programa de avaliação histopatológica para detectar poluição por inseticidas no meio aquático, foram estudados em *Channa punctatus* os efeitos da exposição subletal e crônica dos organofosforados Diazinon, Metil Paration e Dimetoato sobre o fígado, observando-se: vacuolização, diminuição do volume hepático, prejuízo do suprimento de sangue, granulações citoplasmáticas e aspecto espumoso do tecido do fígado. Verificou-se que o dimetoato comportou-se como o de menor toxicidade, quando comparado aos outros três, mas em 24 h de exposição produziu elevado grau de granulações citoplasmáticas (ANEES, 1978).

Resultados e controles laboratoriais de exposição de peixes a pesticidas têm demonstrado que o fígado é o órgão que se altera com maior freqüência. O dimetoato, reconhecido pelos seus efeitos sistêmicos por contato, quando comparado a outros inseticidas, é considerado moderado. Assim sendo, foram analisadas lesões nas brânquias, fígado e rim de *Puntius conchonius*, frente a carbaril e dimetoato. Os resultados revelaram hipertrofia do fígado, vacuolização dos hepatócitos, núcleos picnóticos, cordões hepáticos desorganizados, com ausência de núcleos e sinais de necrose. Ainda como achados patológicos, presença de células mitóticas, células pleomórficas, acidófilas, células pigmentadas e focos inflamatórios intrazonais e periportal (GILL, PANT e PANT, 1988).

LINGARAJA e VENUGOPALAN (1978) analisaram alterações na respiração, metabolismo, natação, bem como a determinação do CL 50 para o organofosforado Dimetoato, organoclorado DDT e pelo carbamato Carbaril em peixes *Therapon jarbua*.

Bioensaios têm revelado que o Dimetoato é um organofosforado de média toxicidade, pois seu CL 50 encontra-se a nível mediano, quando

comparado a outros organofosforados, e até mesmo a outros grupos de pesticidas (VERMA *et al*, 1982).

ALABASTER (1969), utilizando o peixe *Rasbora heteromorpha*, determinou pelo teste de fluxo contínuo os valores de CL 50 em ppm/48 horas, para diversos organofosforados, obtendo os seguintes resultados: Azinfosmetil - 0,38; Clorfenvinfos - 0,27; Formotion - 1,2; Etion - 0,52; Bromofos - 0,62; Fosalone - 2,4; Stirofos - 4,3; Diclorvos 7,8; Demeton-metílico - 13,0; Malation - 13,0; Mevinfos - 11,5; Dimetoato - 27,0; Manazon - 220 e Dicrotofós - 1000.

A crescente demanda para um aumento de informações sobre os efeitos da potencialidade dos agrotóxicos que poluem as águas tem evidenciado a necessidade de um animal experimental padrão e que poderia ser aceito internacionalmente. O *Brachydanio rerio* vem sendo utilizado como tal padrão, pois é relativamente fácil sua manutenção e reprodução em laboratório, considerando-se ainda a sua sensibilidade para efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos, frente a tóxicos. É utilizado em inúmeras investigações, envolvendo um espectro de diversidade de disciplinas em vários países (LAALE, 1977).

No presente trabalho, optou-se pelo estudo das alterações morfológicas nas células hepáticas do peixe paulistinha ou peixe-zebra (*Brachydanio rerio*), quando submetido a um tratamento agudo com o organofosforado Dimetoato, em dose que é subletal, ou seja, segura, do ponto de vista ambiental, já que não causa a morte de nenhum indivíduo, neste tempo de observação.

1.1 - OBJETIVOS

1. Determinação do CL 50 do organofosforado Dimetoato 500, através de teste agudo de 96 horas para a espécie *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822, 1823).
2. Descrição da morfologia normal do tecido hepático do *Brachydanio rerio* mantido em condições ambientais normais, baseada na microscopia óptica e eletrônica de transmissão.
3. Descrição das alterações provocadas a nível das células hepáticas em seqüência temporal, quando *Brachydanio rerio* é submetido a dose subletal do organofosforado Dimetoato 500 por 24 horas e observado até 72 horas após a contaminação.

MATERIAIS E MÉTODOS

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1 - Espécie estudada

Para a realização deste trabalho, foi utilizado o *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822, 1823), Pisces, Teleostei da família *Cyprinidae*, vulgarmente chamado de Peixe Zebra ou Paulistinha.

Originário do continente asiático, possui o corpo revestido de escamas e coloração prateada com listas horizontais preto-azuladas, alternadas com outras amarelas; atinge entre 4 e 5 cm de comprimento; tem hábitos diurnos; apresenta barbilhões sensoriais na região bucal.

Foram utilizados, nos bioensaios, exemplares de *Brachydanio rerio*, medindo entre 2,5 e 3,5 cm (Fig. 01 a,b), com peso médio de 0,17 g, todos eles adultos do mesmo lote, provenientes de Estação de Piscicultura do Estado do Rio de Janeiro, o que garante serem os animais homogêneos, isentos de contato prévio com agrotóxicos.

Dos 250 exemplares utilizados, 100 foram destinados à determinação do CL 50, e 150 aos testes com dose subletal. Os testes e processamento das amostras para estudos celulares e análise dos resultados foram realizados no Laboratório de Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

2.1.2 - Aclimação

Os exemplares usados no presente trabalho foram transportados até Curitiba por via aérea, acondicionados em sacos plásticos atóxicos, inflados com O₂, garantindo a concentração de oxigênio durante a viagem, embalados em caixa de isopor para manutenção da temperatura, obtendo-se assim 100% de sobrevivência.

Ao chegarem ao laboratório, os peixes foram estocados em caixa de cimento amianto com capacidade de 250 litros, para aclimação, contendo água previamente purificada por filtração em filtros de celulose e carvão ativado (Aqualar), aerada continuamente com ajuda de um compressor (Vigo Ar) e aquecida até 25° C por aquecedor controlado por termostato (Vigo Ar). O pH da água foi $7 \pm 0,2$ e o fotoperíodo acompanhou o ciclo natural de aproximadamente 10/14 horas dia/noite. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com Ração para Pescados "WEG Crescimento", triturada para melhor aproveitamento pelos animais, contendo os seguintes componentes básicos: farinha de peixe, farinha de carne, farelo de soja desengordurado, proteinase de milho, farinha de casca de camarão, farelo de trigo, óleo de peixe, vitaminas e minerais, sendo o nível de proteína 46,00%. Os indivíduos permaneceram em aclimação por duas semanas, antes do início dos bioensaios.

2.2 - SUBSTÂNCIA TESTADA E SUAS CARACTERÍSTICAS

Optou-se por um Organofosforado (OP) como substância-teste, por ser conhecida sua ação sobre as células hepáticas (KUMAR E ANSARI, 1986; FANTA *et. al.* 1988). Sendo assim, buscou-se um produto que

apresentasse solubilidade em água, para facilitar sua absorção pelos organismos.

O organofosforado eleito foi o DIMETOATO, de amplo uso na agricultura do Estado do Paraná que, segundo BRASIL (1988), apresenta as seguintes características:

a) Princípio ativo: DIMETOATO

b) Nome comum: DIMETOATO

c) Classe: Inseticida e Acaricida

d) Nome químico (IUPAC):

0,0-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato

e) Nome químico (C.A.):

0,0-dimetil S- | 2-(metilamino)-2-oxoetil | fosforoditioato

f) Nome químico (CE Nortox)

Ditiofosfato de 0,0,-Dimetil S-(N-metil-carbomoil-metil).

g) Fórmula estrutural:



h) Fórmula bruta: $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{PS}_2$

i) Massa molecular: 229,20

j) Solubilidade em água: a 21° C é de 25 g/l

l) DL 50 oral (ratos): 320 - 380 mg/Kg.

m) Concentração do produto comercial: 500 g/l

2.3 - DETERMINAÇÃO DO CL 50 E DOSE SUBLETAL

Foi determinada a concentração letal (CL 50), ou seja, aquela que causa a mortalidade para 50% da população da espécie *Brachydanio rerio*, com o organofosforado Dimetoato 500, através de bioensaio semi-estático, conforme as normas de testes de agrotóxicos contidos no Treinamento Prático (L5-019-2) da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (SP) de 1991.

O teste para determinação do CL 50 foi realizado em duas etapas: 1) a preliminar estabeleceu o intervalo entre a concentração maior com 0% de mortalidade e a menor concentração com 100% de mortalidade; 2) a definitiva, em concentrações crescentes entre os extremos obtidos na preliminar, forneceu dados para o cálculo do CL 50. Foi estabelecida a relação de 1 g de peixe para 1 litro de solução, sendo os testes realizados em cubas de vidro com capacidade para 2 litros, contendo cada uma 10 indivíduos, formando uma bateria com cinco cubas: um controle e quatro contaminados (Fig. 03). Foram realizadas trocas diárias da solução para garantir uma relativa constância do nível de oxigênio e da concentração da substância, perfazendo um total de 96 h. de observação. As soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque e diluídas na água de manutenção dos animais.

A cada tempo estabelecido ou seja, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h. após o tempo inicial ou T_0 , foi anotado o número de indivíduos mortos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo Método " TRIMMED SPEARMAN KARBER ", devido à obtenção de apenas uma porcentagem intermediária do efeito observado, conforme procedimento de análise estatística de resultados de testes de toxicidade aguda (L5.017) da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (SP) 1990.

Uma vez estabelecido o CL 50, decidiu-se pelo uso de uma dose subletal aleatória inferior, correspondendo a $\pm 50\%$ do CL 50 do produto comercial.

2.4 - BIOENSAIO

Uma vez que as condições ambientais podem afetar marcadamente a sensibilidade ao agente tóxico, o teste toxicológico foi conduzido sob condições pré-determinadas e constantes, ou seja: temperatura 25°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$); pH 7 ($\pm 0,2$); aeração constante; fotoperíodo de 10/14 h. dia/noite acompanhando o ciclo natural; alimentação duas vezes ao dia com ração WEG no início e fim do período iluminado. Os parâmetros temperatura e oxigênio dissolvido foram monitorados pelo Oxímetro Digital Analion Modelo OX.901, o pH pelo pH-Metro de Bolso Corning Modelo PS-15 e a condutividade pelo Condutivímetro Digimed CD-20.

O experimento foi realizado em três aquários, cada um com capacidade de 37,5 litros (50x30x20 cm), tendo as faces laterais e a posterior revestidas por papel "contact" verde escuro, para melhor adaptação dos animais, os quais foram distribuídos da seguinte maneira: um aquário para as primeiras 24 horas; um aquário para descontaminação dos animais após 24 horas até 72 horas, e um sem contaminação para controle do experimento.

O primeiro aquário foi contaminado com a concentração de $0,025\ \mu\text{l/l}$ do produto comercial, correspondendo a $0,0125\ \text{mg}$ do princípio ativo, durante as 24 horas iniciais, sendo que o volume total da solução foi de 20 litros, recebendo cinquenta exemplares de *Brachydanio rerio*. Após a coleta em T_{24} (24 horas após o tempo inicial T_0), os exemplares foram

transferidos para o segundo aquário com água descontaminada, ali permanecendo até o final do experimento. O aquário-controle manteve-se com a qualidade ideal para os animais, durante todo o experimento.

Os tempos para coleta de amostras de fígado foram: T_0 (momento da exposição ao produto); T_2 (duas horas após a contaminação, quando foram sacrificados os primeiros quatro indivíduos experimentais) e controle, procedimento para todos os demais horários subseqüentes, ou seja T_4 , T_8 , T_{24} e T_{72} .

2.5 - COLETA DO MATERIAL E PRÉ-FIXAÇÃO

Após os tempos de experimentação, os peixes foram sacrificados, submetidos a secção medular, seguida de incisão ventral, quando foram expostos os órgãos abdominais. Com o auxílio de um contagotas, foi gotejado o fixador na cavidade abdominal para uma pré-fixação, passando-se à dissecção, exposição e coleta do fígado.

A coleta foi realizada ao microscópio estereoscópio, em placa de Petri, com ajuda de pinças e tesoura, sendo o corpo do animal mantido em solução fixadora, durante o processamento.

2.6 - PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O tecido hepático foi estudado através de técnicas histológicas de microscopia óptica (M.O.), para identificação da morfologia normal e da morfologia alterada pelos efeitos sub-letais do organofosforado, ao longo do tempo de exposição; e também por microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T.), para avaliação da ultraestrutura dos hepatócitos.

2.6.1 - Técnicas para Microscopia Óptica

Uma vez isolados, os fígados foram colocados em frascos pequenos de vidro, com \pm 3 ml do fixador de Bouin (Bücherl, 1962), por 6 horas, passando em seguida por sucessivas lavagens em álcool 70%, para retirada do excesso de ácido pícrico. O material foi desidratado em série alcoólica (Etanol) crescente, diafanizado em Xilol (Xileno P.A.), impregnado e incluído em "Paraplast Plus" (Sigma®), sendo solidificado em temperatura ambiente (Bücherl, 1962 modificado). Para facilitar o corte em micrótomo, os blocos foram trimados em forma de pirâmide e cortados com navalha de aço, com 3 a 4 micrômetros de espessura. Para isso foi utilizado um aparelho de microtomia Leitz, Wetzlar. Os cortes foram aderidos à lâmina de vidro com Albumina de Meyer (Culling *et al*, 1985) e esticados em placa aquecedora, secos ao ambiente antes da coloração.

Os cortes do fígado foram corados com Hematoxilina de Harris-Eosina (HE) (Bücherl, 1962), e a montagem de lâminas permanentes foi feita com resina Poly-Mount (Polysciences, Inc), seguida da secagem em temperatura ambiente.

As lâminas foram estudadas e fotografadas em Fotomicroscópio Olympus BH-2, sendo utilizado o filme Kodakcolor, Gold Plus 35 mm, de Asa 100.

2.6.2 - Técnica para Microscopia Eletrônica

Os fígados foram fixados em Glutaraldeído a 2,5%, diluído em tampão de Cacodilato a 0,2 M e pH 7,2, a 4° C, por 2 horas. O material foi lavado em solução de sacarose a 4° C, pós-fixado em Ósmio a 1%, diluído em solução de sacarose, contrastado com Acetato de Uranila em bloco, desidratado em série crescente de acetona, impregnado e incluído com resina Polylite®, usando-se, como suporte do material, cápsulas de gelatina. Estas permaneceram em estufa a 60° C por 72 horas (FRANCO, 1994). Submetidos os blocos ao corte do Ultramicrótomo Sorvall MT-2. Cortes ultrafinos foram coletados em tela de cobre, e contrastados com Acetato de Uranila (WATSON,1958) e Reynolds (REYNOLDS,1963), sendo observados e fotografados em Microscópio Eletrônico de transmissão Philips EM 300 do Centro de Microscopia Eletrônica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

-
1. As soluções estão descritas no Apêndice I.
 2. Os roteiros para processamento histológico de M.O. e M.E.T. estão descritos no Apêndice II.
 3. Os roteiros para coloração em M.O. e contrastação em M.E.T. estão no Apêndice III.

RESULTADOS

3 - RESULTADOS

3.1 - DETERMINAÇÃO DA DOSE SUBLETAL DO DIMETOATO 500 PARA *Brachydanio rerio*

3.1.1 - Resultados do Teste Preliminar para CL 50

Colocando-se *Brachydanio rerio* em Dimetoato 500 diluído em água de manutenção, em cinco cubas de bioensaio, por um período de 96 horas, foram obtidos os seguintes resultados:

Concentração de Dimetoato 500 em ml/l	Nº inicial de peixes	Nº de peixes 24	peixes período 48	mortos de obs. 72	por (h.) 96
0,5	10	10	10	10	10
0,1	10	10	10	10	10
0,01	10	10	10	10	10
0,001	10	10	10	10	10
0,0001	10	0	0	1	3
0,00001	10	0	0	0	0
Controle	10	0	0	0	0

3.1.2 - Resultado Definitivo para CL 50

Utilizando-se o intervalo de concentrações entre 0% e 100% de mortalidade, o Dimetoato 500 foi diluído em água filtrada e os organismos teste foram expostos ao produto durante 96 h, obtendo-se os seguintes resultados:

Concentração da Substância teste	Observações	Período de		Observações (h)		
		0	24	48	72	96
FRASCO 1 0,00001ml/l (0,01µl/l)	1.Nº de peixes mortos		0	0	0	0
	2.Conductividade (µS/cm)	154,9	168,3	174,8		
	3.Temperatura (°C)	25,0	25,0	24,6		
	4.pH	7,1	7,0	7,0		
	5.Oxi.Dissolvido (mg/l)	7,3	7,2	7,2		
FRASCO 2 0,00010ml/l (0,10µl/l)	1.Nº de peixes mortos		0	0	3	13
	2.Conductividade (µS/cm)	159,2	169,5	180,1		
	3.Temperatura (°C)	25,0	24,6	25,1		
	4.pH	7,0	6,9	6,9		
	5.Oxi.Dissolvido (mg/l)	7,8	7,4	7,3		
FRASCO 3 0,00012ml/l (0,12µl/l)	1.Nº de peixes mortos		8	16	20	20
	2.Conductividade (µS/cm)	163,3	165,8	180,1		
	3.Temperatura (°C)	24,5	24,8	24,8		
	4.pH	7,1	7,0	7,0		
	5.Oxi.Dissolvido (mg/l)	7,8	7,5	7,4		
FRASCO 4 0,00014ml/l (0,14µl/l)	1.Nº de peixes mortos		19	20	20	20
	2.Conductividade (µS/cm)	165,6	180,8	190,2		
	3.Temperatura (°C)	24,9	25,0	25,0		
	4.pH	7,1	6,9	7,1		
	5.Oxi.Dissolvido (mg/l)	7,3	6,9	7,0		
FRASCO CONTROLE	1.Nº de peixes mortos		0	0	0	0
	2.Conductividade (µS/cm)	155,1	167,4	174,0		
	3.Temperatura (°C)	24,8	25,0	24,9		
	4.pH	7,0	7,1	7,1		
	5.Oxi.Dissolvido (mg/l)	7,3	7,2	7,2		

3.1.3 - Análise Estatística dos Resultados do Teste de Toxicidade Aguda

O tratamento estatístico dos resultados dos testes de toxicidade aguda, utilizado na determinação da concentração do agente tóxico, letal ou efetiva, a 50% da população de organismos-teste, num determinado período de exposição foi:

Método "TRIMMED SPEARMAN KARBER"

Fazendo-se uso de programa estatístico " TSK ", foram encontrados os seguintes resultados:

Concentração ($\mu\text{l/l}$)	0,01	0,10	0,12	0,14
Nº Indiv. Expostos	20	20	20	20
Mortalidade	0	13	20	20
ESTIMATIVA SPERMAN KARBER	CL 50	0,0488491		
95% Limite inferior de confiança				0,04
95% Limite Superior de confiança				0,06

Com base neste resultado foi escolhida a dose subletal de $0,025\mu\text{l/l}$ do produto Dimetoato 500, correspondendo a $0,0125\text{ mg}$ do princípio ativo, sendo a mesma igual a aproximadamente 50% da CL 50.

3.2 - MORFOLOGIA HEPÁTICA NORMAL (Controle) de *Brachydanio rerio*

Através de observação macroscópica, verifica-se que o fígado de *Brachydanio rerio* ocupa considerável volume, quando comparado ao restante do corpo, apresentando uma coloração amarelada e consistência macia. Está situado na porção anterior do abdômen, recobrimdo parte da porção dorsal e ventral do estômago. O fígado é composto por três lóbulos, sendo que na posição ventral do estômago encontramos os dois maiores. O terceiro lóbo está situado em relação ao estômago dorsalmente, conferindo assim uma forma circular, que contorna o estômago. Encontramos ainda a presença de uma vesícula biliar, inúmeros vasos sangüíneos e uma estreita ligação com o baço.

Em *Brachydanio rerio*, normais, as células hepáticas possuem forma arredondada poligonal(Fig.5a), arranjando-se em cordões(Fig. 4), que se limitam por um lado dos sinusóides (Fig. 5b), revestidos por célula de núcleos achatados. Possuem membrana plasmática bem definida (Fig.5b), grandes núcleos arredondados com cromatina dispersa na periferia e nucléolos proeminentes (Fig.5b,7a,b). O citoplasma apresenta granulosidade e aspecto vacuolizado(Fig.5a,b). Os agregados de partículas de glicogênio, bem como gotículas de lipídios, são parcialmente removidos pela técnica de preparação para M.O., deixando, portanto, áreas intracelulares não coradas e irregulares. No citoplasma verifica-se a presença de mitocôndrias em quantidade significativa, sendo a maioria de formato arredondado, muito próximas aos núcleos(Fig.9a). O retículo endoplasmático pode ser granular ou rugoso, devido à presença de ribossomos aderidos à face externa de suas membranas (face voltada para o

citósol) (Fig. 8,10 a,b). Apresentam também ribossomos livres (Fig. 8). Verifica-se a presença de estruturas semelhantes a lisossomos ou lisossomos secundários (Fig.09). Estas estruturas parecem também ocorrer próximo aos núcleos (Fig. 10).

Os canalículos biliares apresentam-se como finos canais localizados na adjacência dos hepatócitos (Fig. 12).

Entre os cordões de hepatócitos encontramos os sinusóides (capilares), apresentando um endotélio descontínuo, com células geralmente de contorno irregular (Fig.5b,6b). Entre as células de revestimento dos sinusóides e a superfície dos hepatócitos, temos o espaço perissinusoidal ou espaço de Disse, que é contínuo com a luz do sinusóide (Fig.6a,b). Numerosas microvilosidades irregulares estendem-se da superfície do hepatócito para o espaço de Disse (Fig.6b). Entre as bases das microvilosidades, notam-se depressões envolvidas em endocitose (Fig.13a).

Observa-se ainda a presença de células sangüíneas, que possuem núcleo redondo e cromatina moderadamente condensada, a qual tende a agrupar-se ao redor da periferia dos sinusóides (Fig.13a,b; 14;15).

3.3. - EFEITOS DO DIMETOATO 500 SOBRE A MORFOLOGIA HEPÁTICA DO *Brachydanio rerio*

3.3.1 - Tempo de exposição 2 horas

As células hepáticas apresentaram diferenças estruturais, quando comparadas ao o controle. A forma celular foi descaracterizada, sofrendo os hepatócitos um certo achatamento, perdendo-se em alguns locais a visualização dos limites celulares (Fig.16,17). Os núcleos apresentam-se lateralizados em maior quantidade do que no controle, caracterizando-se por apresentar tamanhos e formas diferentes, tendo início uma condensação da cromatina (Fig.18). Os vacúolos citoplasmáticos, observados normalmente nas células, tiveram maior incidência, provocando áreas não coradas pela eosina em algumas regiões do fígado (Fig.19).

Em outras áreas algumas células apresentaram início do aparecimento de granulação nos hepatócitos (Fig.18).

3.3.2 - Tempo de exposição 4 horas

As células apresentaram-se inchadas e o citoplasma com granulações finas e grossas, mais eosinofílico que o controle (Fig.20). A membrana plasmática em muitas células não ficou visível. Alguns núcleos mantiveram forma relativamente regular, com a cromatina condensada na região central (Fig.21). Outros apresentaram-se bastante pequenos e picnóticos(Fig.21). Houve perda de conteúdo celular, caracterizando pontos de necrose (Fig.22). Observou-se ainda a presença de algumas

células normais(Fig.22). A vacuolização persistiu em algumas regiões e em outras não (Fig.22).

3.3.3 - Tempo de exposição 8 horas

As células, em muitas regiões, tornaram-se indistingüíveis, podendo ou não apresentar vacuolização(Fig. 23,24). Este tempo de observação é caracterizado pela acentuada presença de grânulos densos e positivos à eosina, nas células ainda íntegras(Fig.25,26). Canálculos e sinusóides inchados podem ser observados (Fig.27). Os núcleos dos hepatócitos mostraram diversos diâmetros e graus de densidade: alguns apresentam cromatina condensada na região central e outros extremamente picnóticos, progredindo para uma cariólise, formando focos de necrose (Fig.26,27).

3.3.4 - Tempo de exposição 24 horas

Após 24 h de exposição, foram encontradas regiões totalmente necrosadas, inclusive com hemorragia a partir de capilares, não sendo mais possível a visualização dos limites dos vasos e células do tecido hepático adjacente (Fig.30,31). Foram observadas células hepáticas com lateralização nuclear, com e sem granulações, vacuolização intensa e moderada, tecido totalmente necrosado ou em início de necrose. Vacúolos e núcleos apresentaram deformação, aparecendo núcleos normais, picnóticos e em degeneração (Fig.28,29). Devido à presença de focos de necrose, há restos celulares, o que sugere a presença de células do

sistema imunológico, como linfócitos e histiócitos em maior quantidade (Fig. 30,31).

3.5 - Tempo de exposição 72 horas

O T₇₂ foi marcado pela permanência dos animais em ambiente descontaminado durante 48 horas. Alterações significativas foram visíveis, entretanto, no fígado quando comparado o T₇₂ ao controle e demais tempos. Ficou caracterizado o estado de necrose em certos planos, pela presença de restos de materiais celulares e núcleos (Fig.32,34). A lateralização nuclear se manteve, em muitos casos(Fig.35). Os vacúolos continuaram irregulares e demonstrando degenerações(Fig.34). Algumas células, porém, já se apresentaram com tendência para a normalidade, sendo possível delimitar a membrana celular, apesar da irregularidade em seu formato (Fig.33,35).

Regionalmente, verificou-se a reorganização dos hepatócitos, ductos biliares e sinusóides (Fig. 32,33,35).

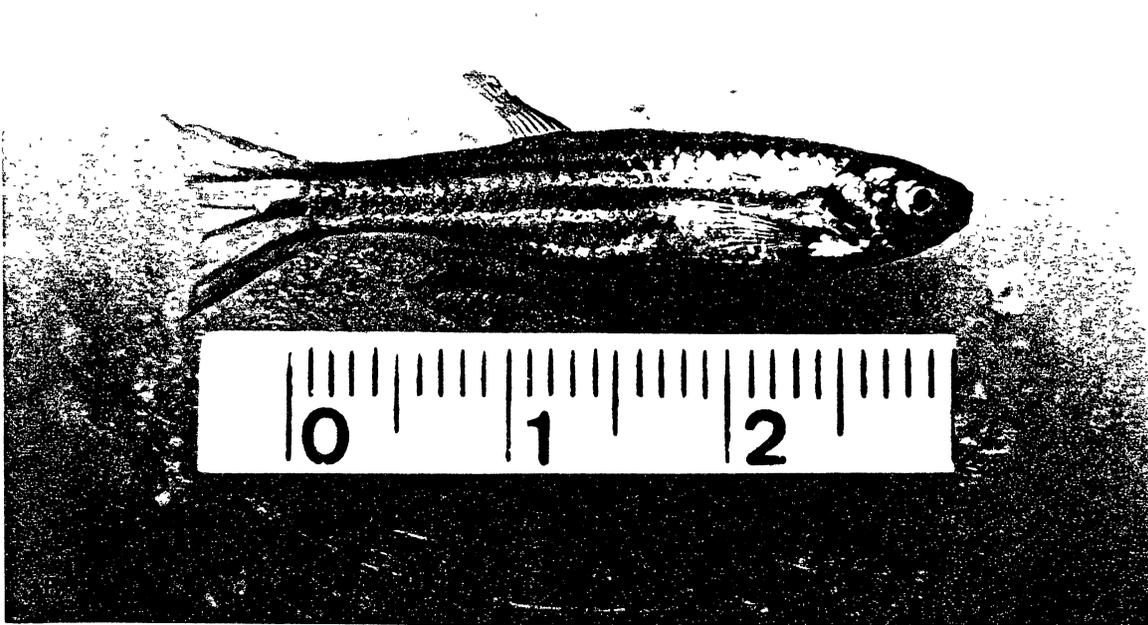
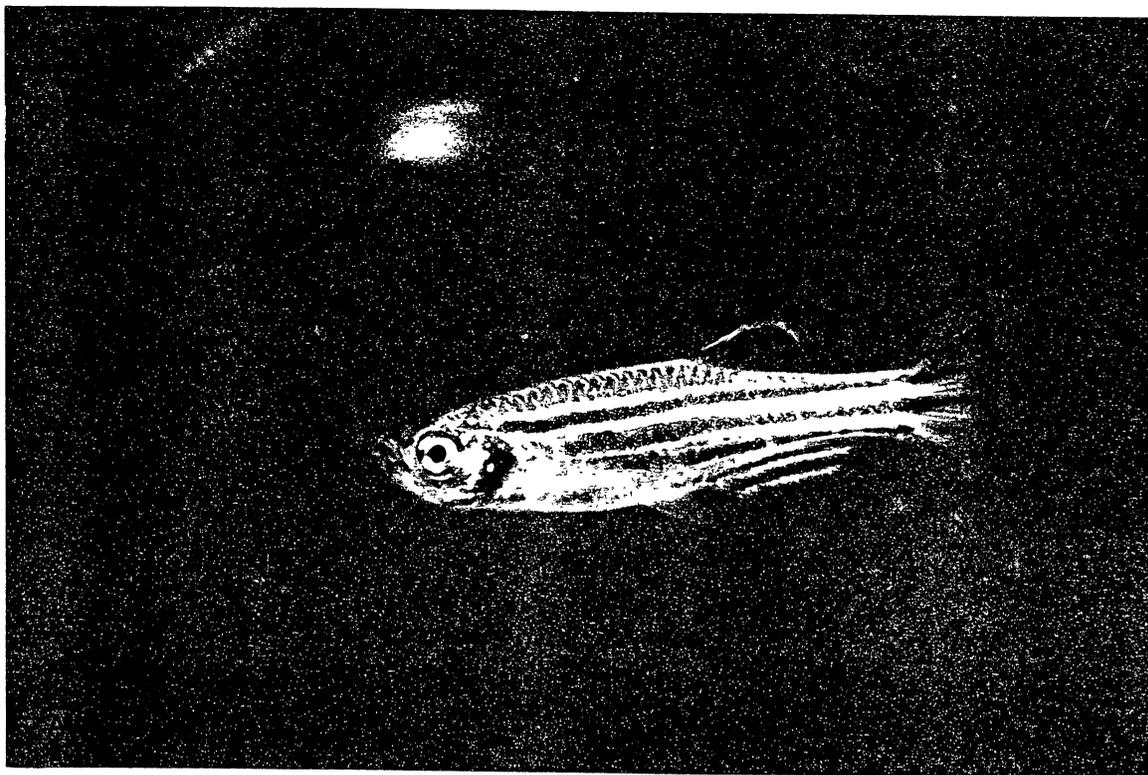


Fig. 01 (a,b) - Exemplos de *Brachydanio rerio*



Fig. 02 - Laboratório de Impacto Ambiental, UFPR.

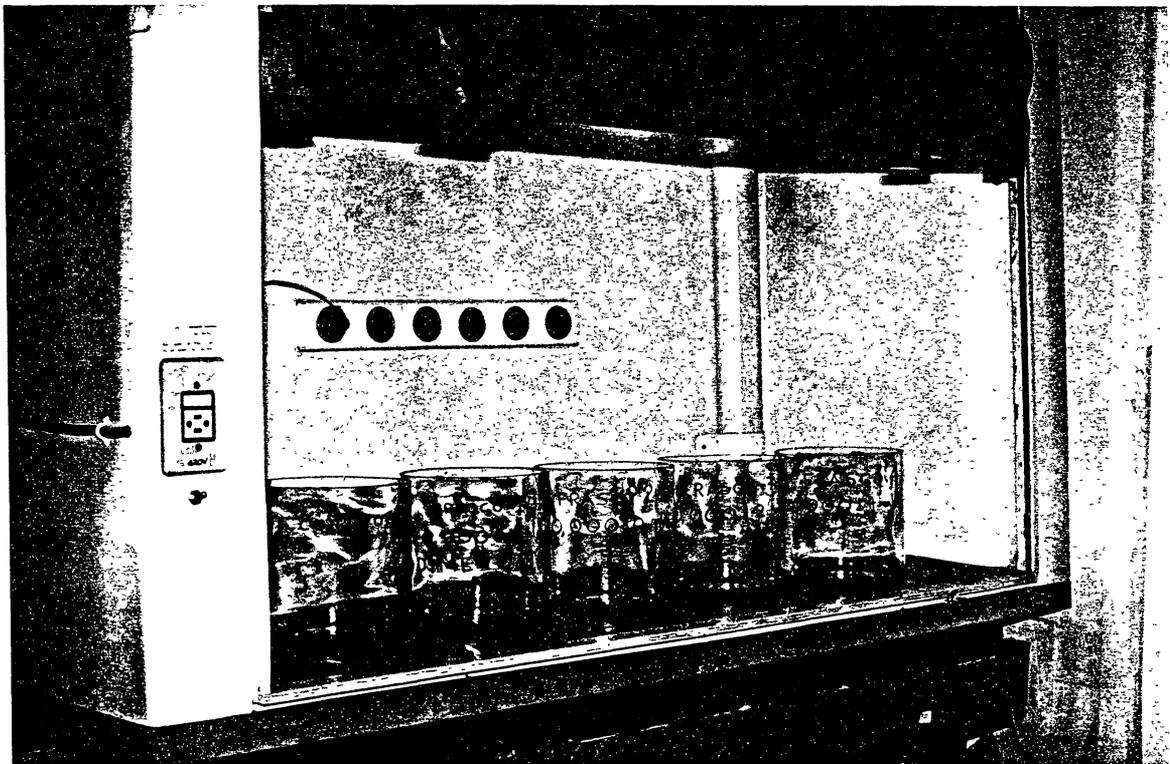


Fig. 03 - Bateria de cubas de vidro utilizadas para determinação do CL 50.

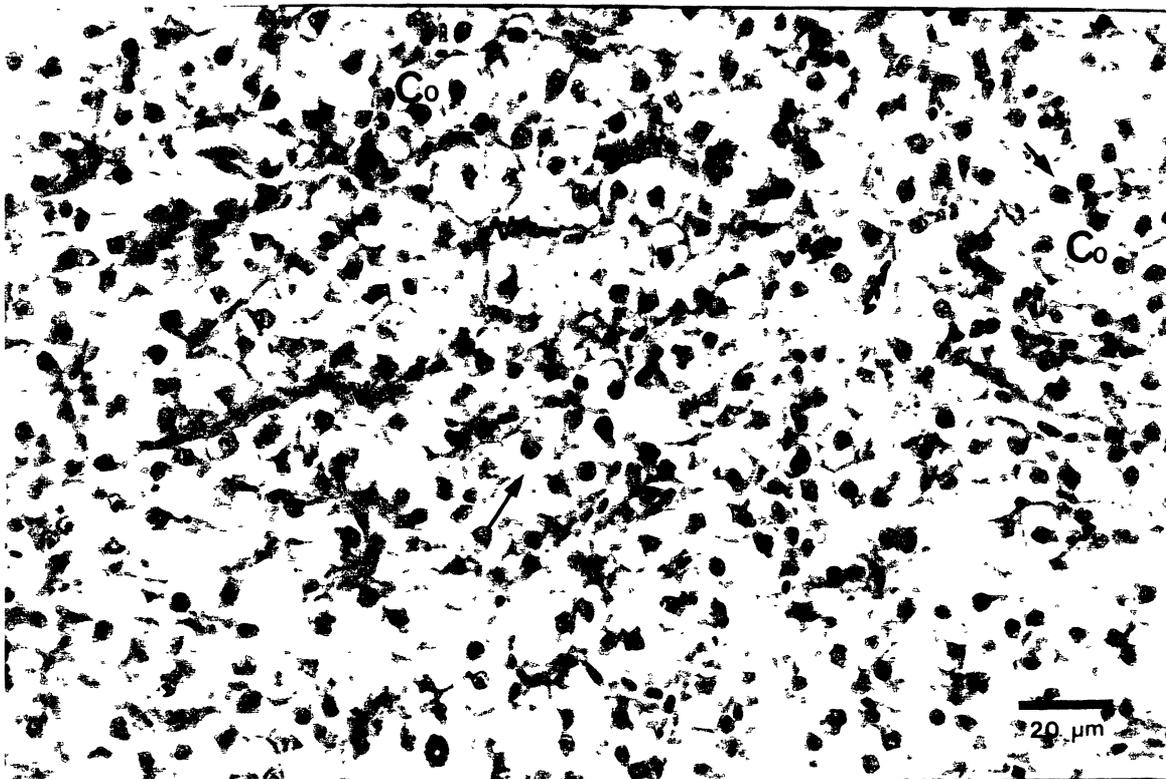


Fig. 04 - Secção de fígado de indivíduo controle com cordões hepáticos (Co) presença de vacúolos (→) vasos sangüíneos (V) (H.E. 400X)

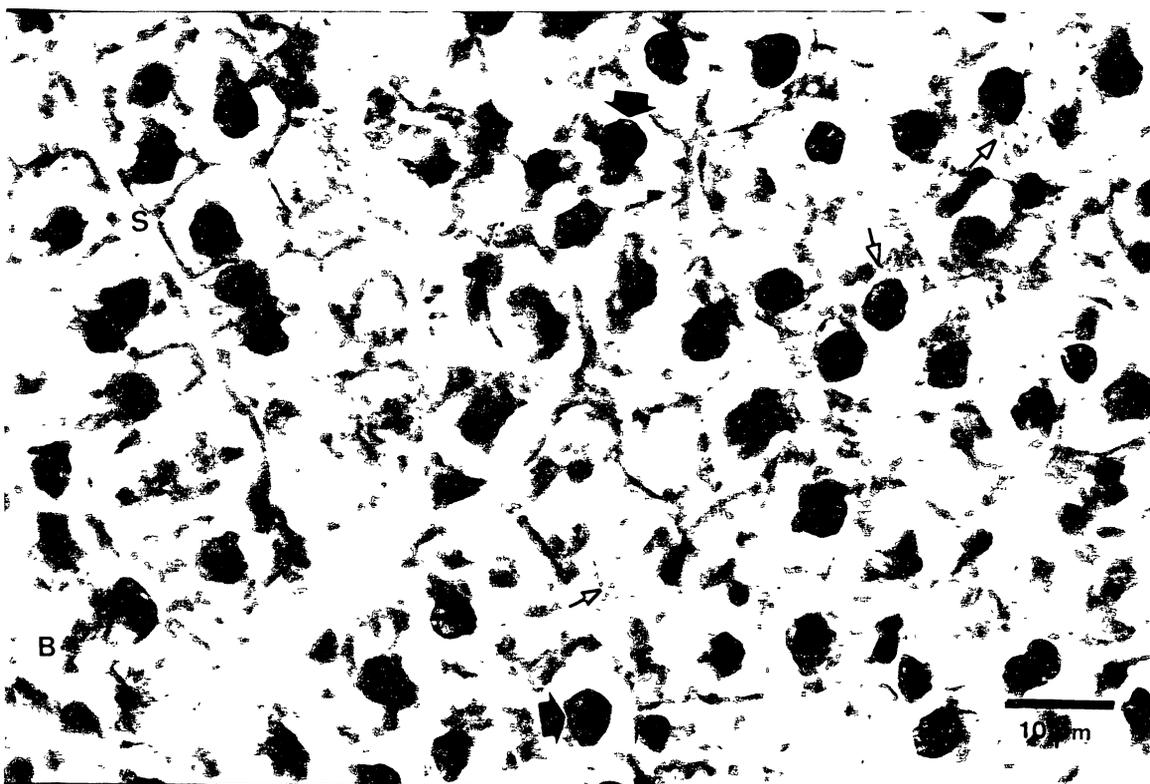
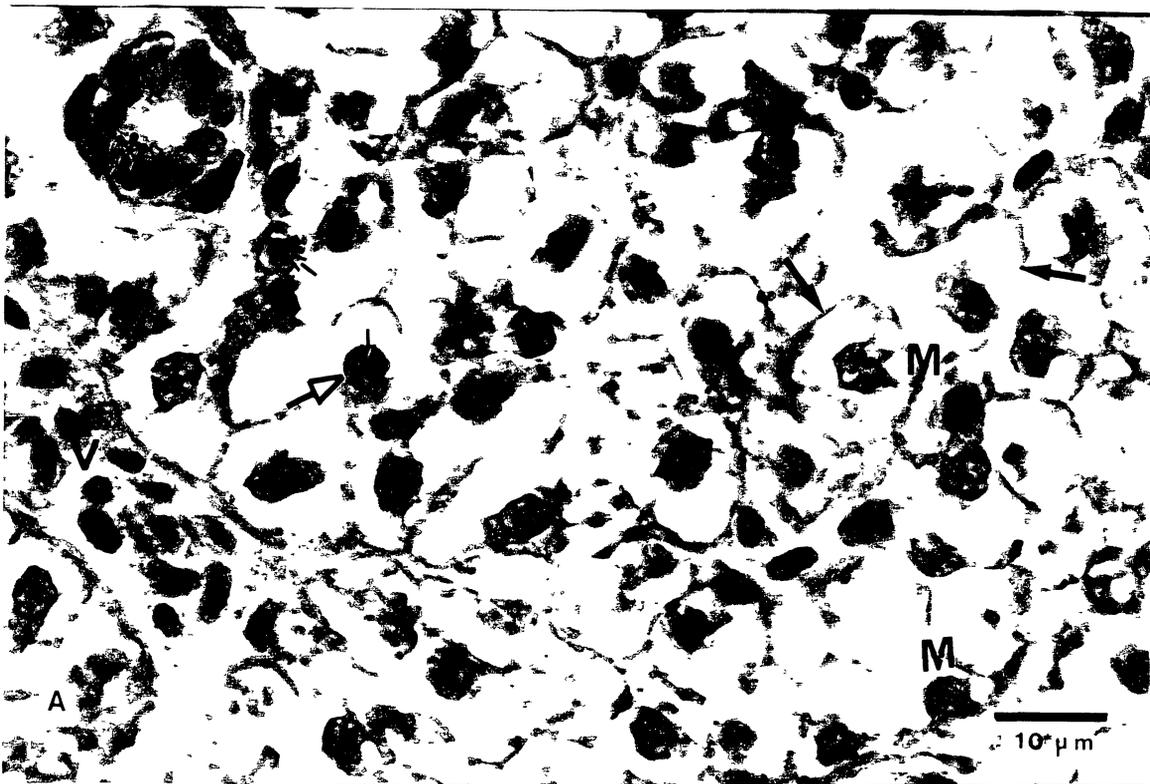


Fig. 05 (a) - Detalhe de fígado de indivíduo controle. Nota-se a presença de células poligonais (→); núcleos (→) arredondados com nucléolo (→) presente; membrana plasmática (M); vaso sanguíneo (V) e ducto biliar (*). (H.E. 1000X)

(b) - Formação de cordões hepáticos e presença de sinusóide (S), citoplasma com granulações (→), núcleos com nucléolos (→). Controle (H.E. 1000X)

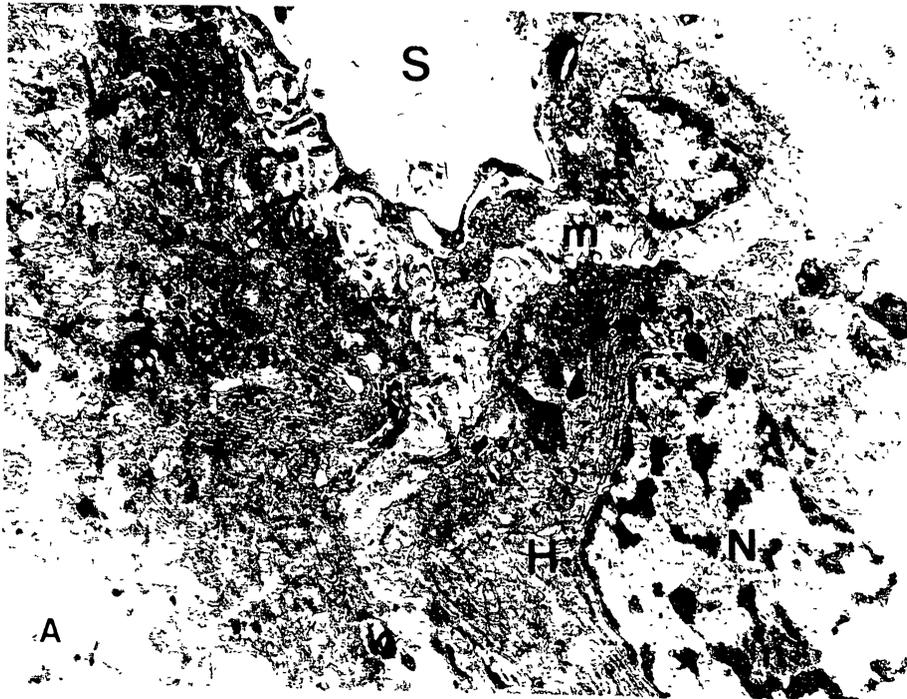


Fig. 06 (a,b) - Sinusóide (S); espaço de Disse(→▷); os hepatócitos (H) microvilos (m); núcleos (N); nucléolo (n) M.E.T. a - 12.312X; b - 22.572X.



Fig. 07 (a,b) - Sinusóide (S); núcleo (N) e nucléolo (n) de um hepatócito.
MET. a - 13.753X; b - 20.225X

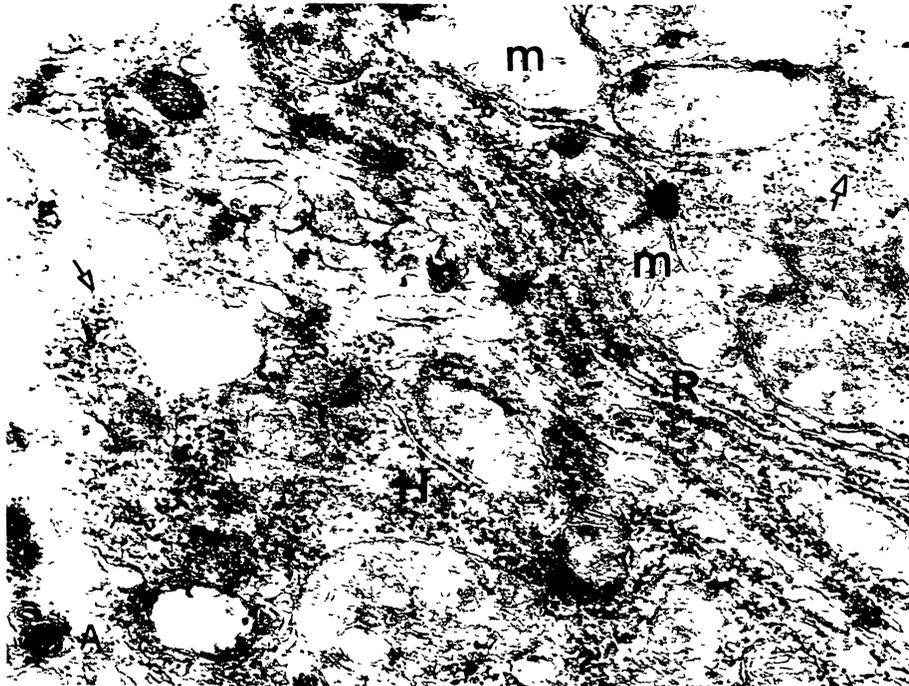


Fig. 08 (a,b,c) - Hepatócito (H); mitocôndrias (**m**), retículo endoplasmático granular (**R**), ribossomos livres (**→**); glicogênio (**▶**); autofagia (**▲**) MET. a - 41.040X; b,c - 71.820X.

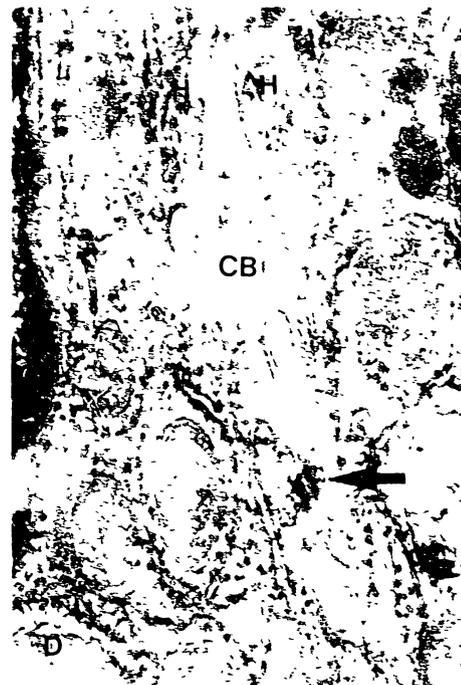
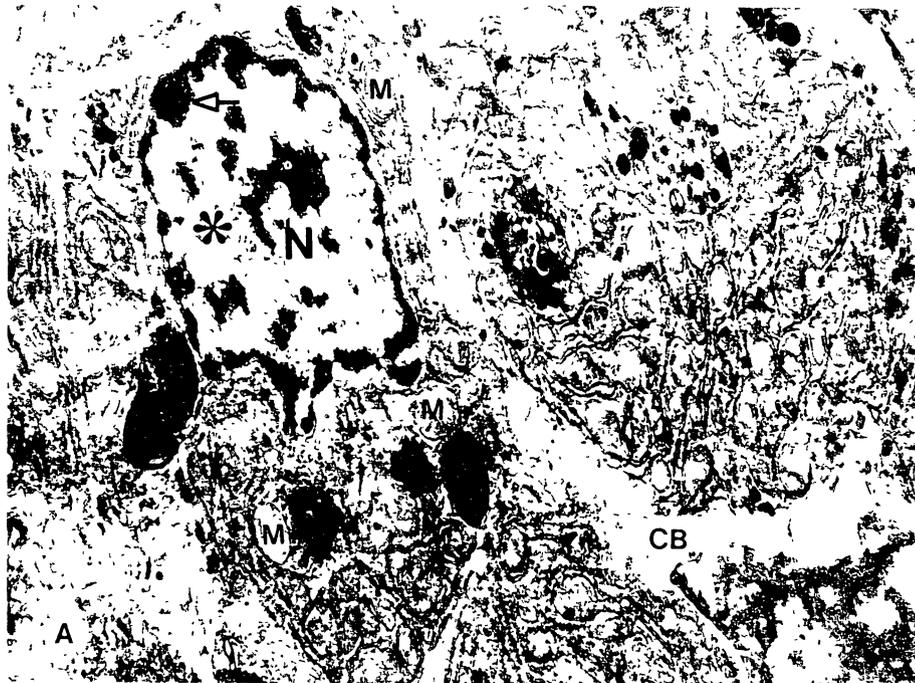


Fig. 09 (a) - Vista geral de hepatócito. Núcleo (N); eucromatina (*); heterocromatina (→); mitocôndrias (M); canalículo biliar (CB) MET. 13.753X.
 Fig. 09 (b,c) - Estrutura semelhante a lisossomo (Li) MET. 24.270X 41.382X.
 Fig. 09 (d) - Hepatócitos adjacentes (H); canalículo biliar (CB); desmosoma (→). MET. 56.430X.

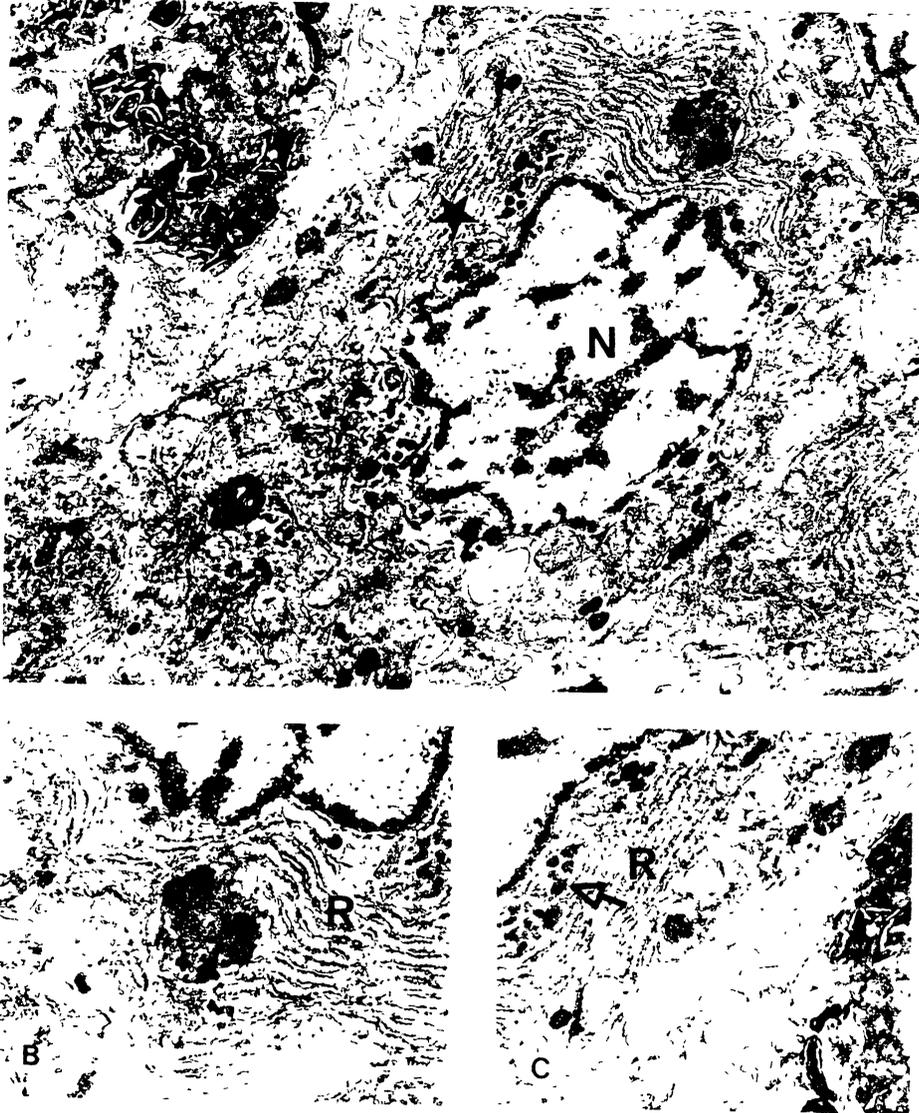


Fig. 10 (a) - Vista geral de hepatócito com retículo endoplasmático granular (★); núcleo(N). MET. 13.753X.

Fig. 10 (b,c) - Visualização do REr. (R); estruturas semelhantes a lisossomos (→). MET. b - 19.416X; c - 18.607X.



Fig. 11 (a,b) - Fígado de animal normal. Hepatócitos (H); núcleos (N) eucromatina (—>); heterocromatina (←>); Sinusóides (S); canaliculos biliares (★); união das membranas do hepatócitos (—). MET. a - 11.160X; b - 19.530X.

Fig. 12 - Detalhe de um canaliculo biliar (▲); luz do canaliculo (L); membranas plasmáticas dos hepatócitos (MB); microvilosidades (→) RE.rugoso (r); RE.liso (*). MET. 31.920X.

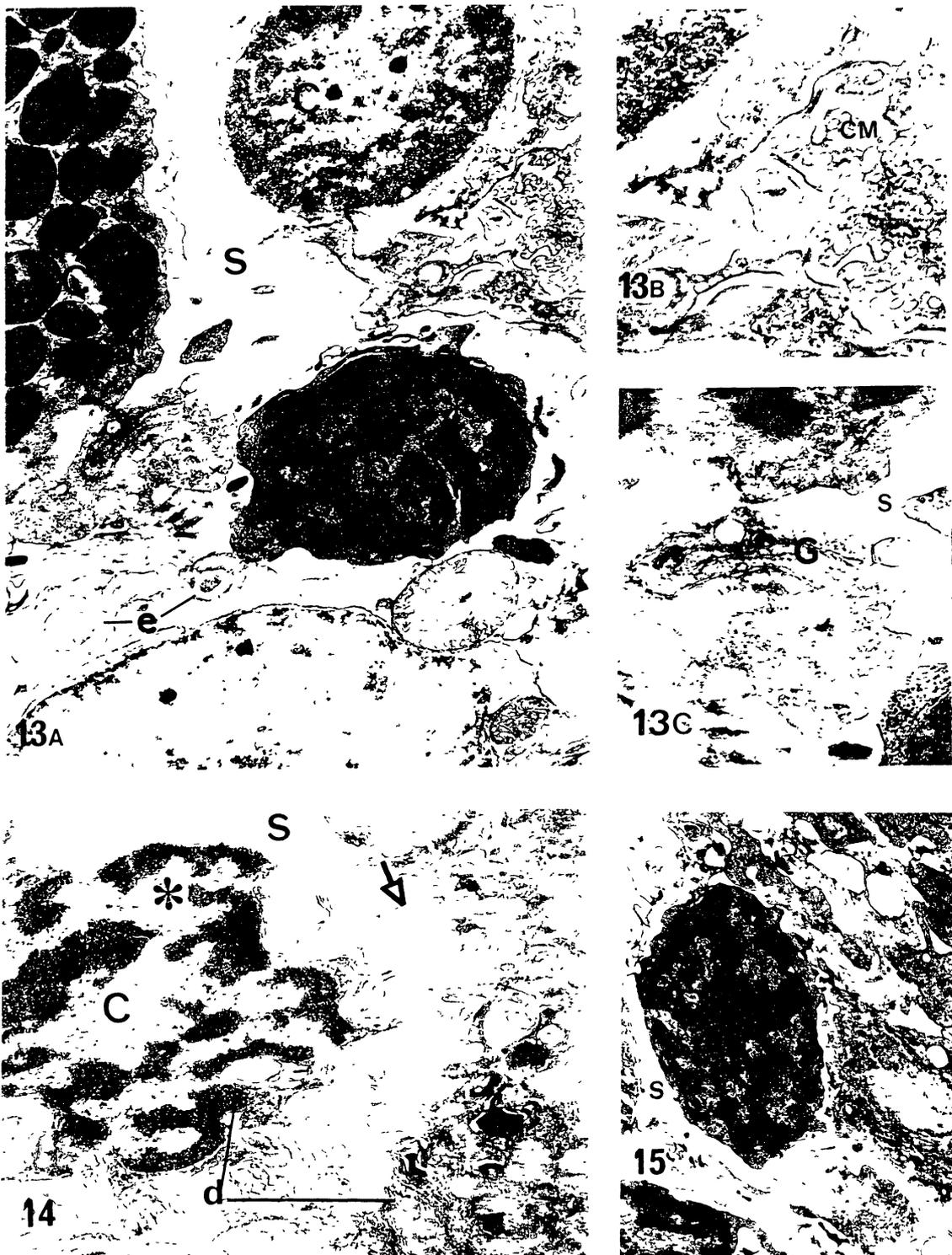


Fig. 13 (a,b,c); 14; 15 - Células do sangüneas (C); sinusóides(S); espaço de Disse(d); microvilosidades (→); eucromatina (*); heterocromatina (★); Retículo granular (G); vesículas pinocíticas (CM); endocitose(e). MET. a - 16.416X; b,c - 32.832X; F.15 - 23.590X; F.16 - 10.260X.

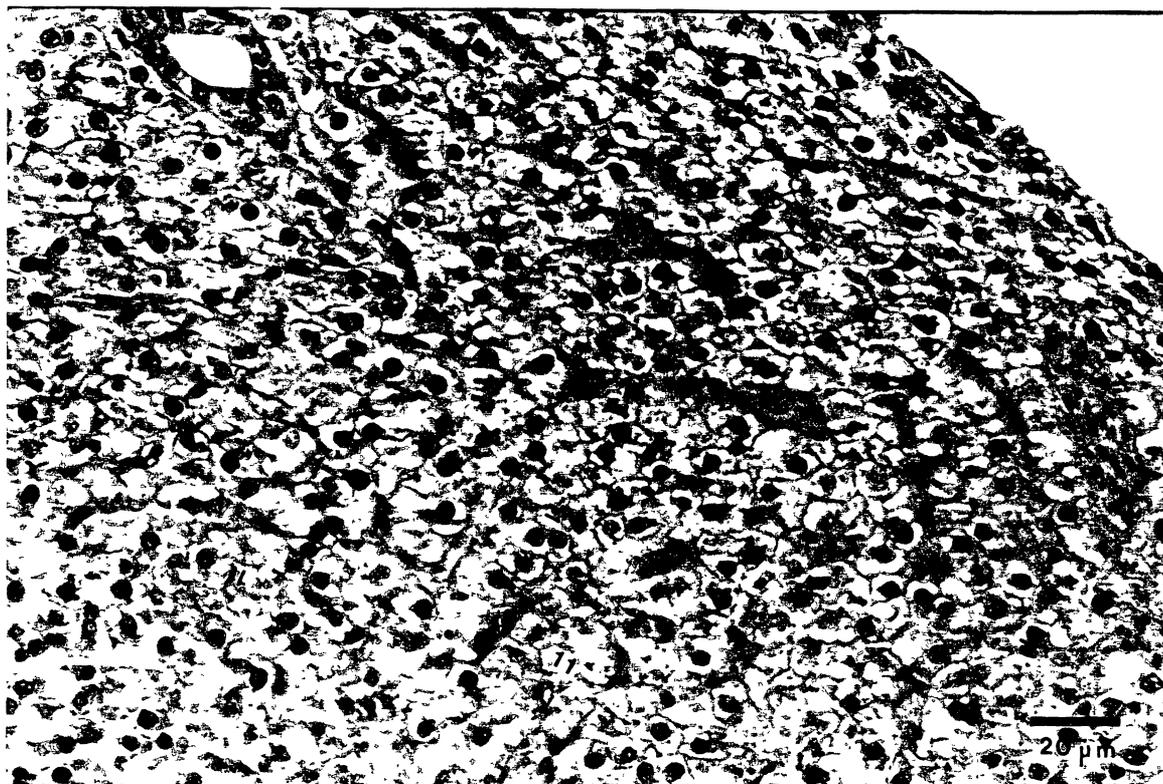


Fig. 16 - Fígado de animal contaminado com Dimetoato após 2 h. de exposição, apresentando desorganização do arranjo celular (\neq) e início de granulações citoplasmáticas focais (\rightarrow). (H.E. 400X)

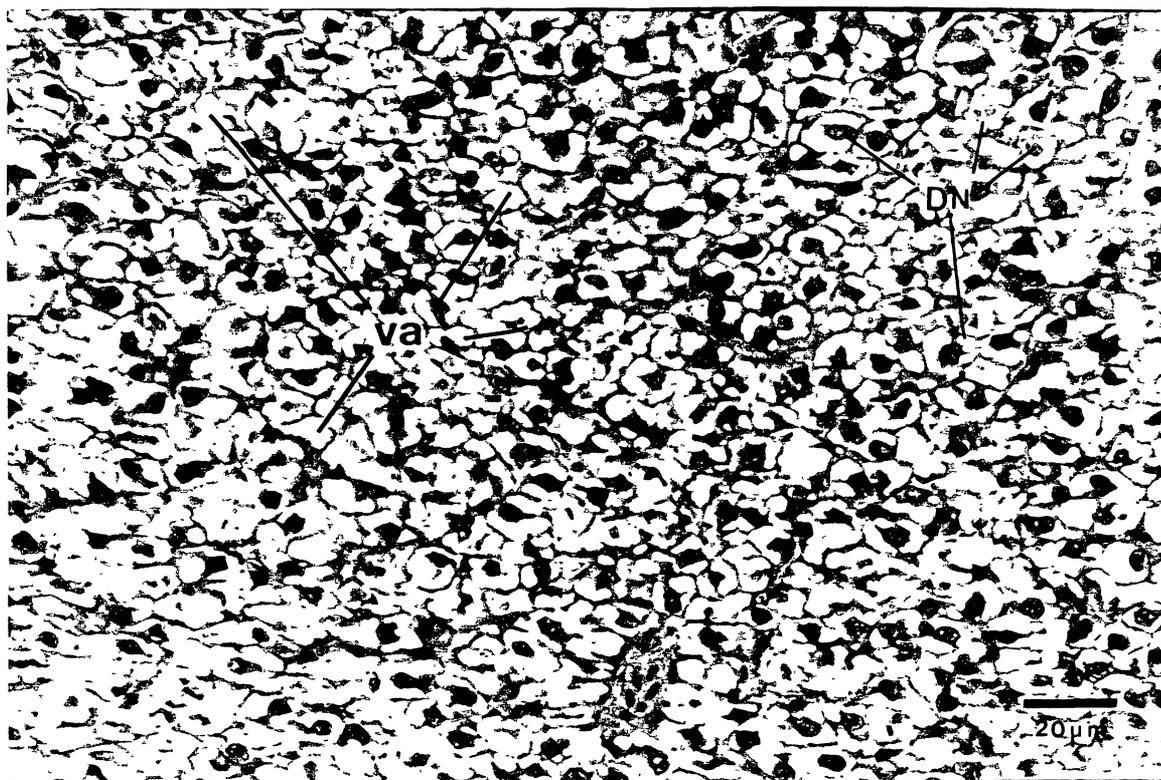


Fig. 17 - Área do mesmo fígado altamente vacuolizada (va) com desorganização celular, início de degeneração nuclear (DN) em animais contaminados após 2 h. de exposição ao Dimetoato 500. (H.E. 400X)

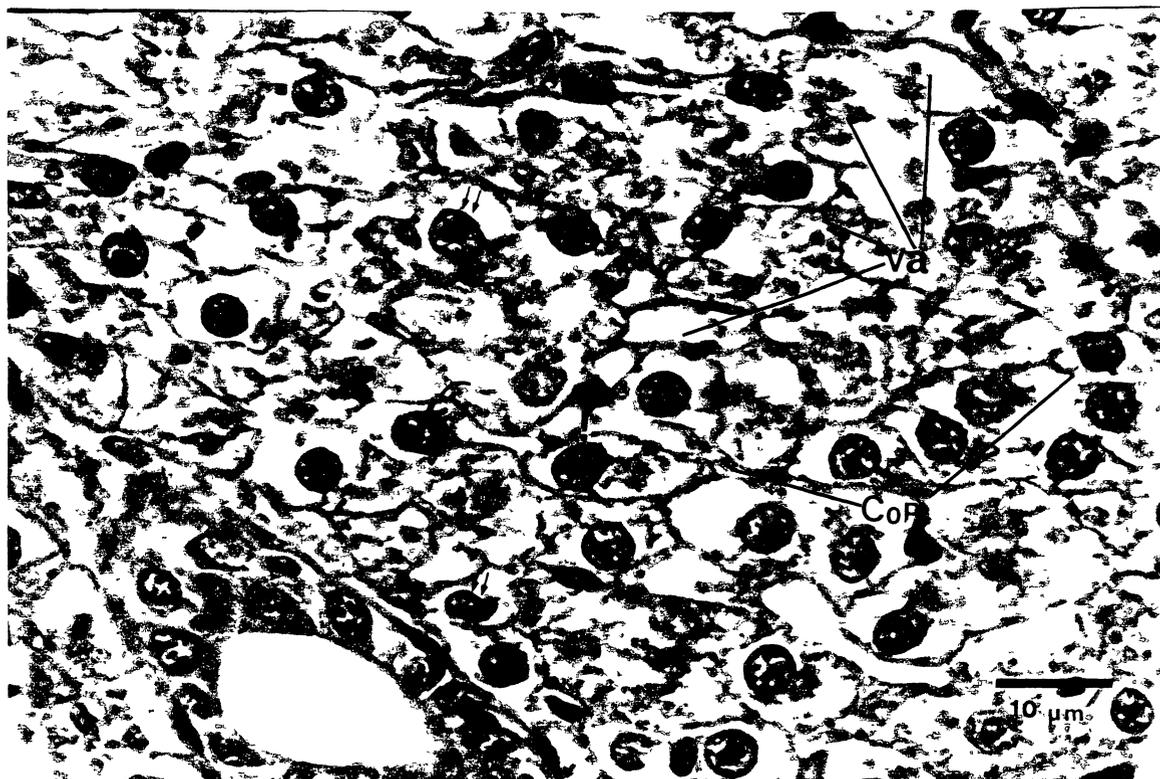


Fig. 18 - Fígado de animal contaminado 2 h. com Dimetoato. Núcleos (!) iniciam uma lateralização, apresentam tamanhos e formas diferentes (||), início de condensação da cromatina (↓). Perda da organização dos cordões hepáticos (CoP) e alterações na vacuolização e granulações citoplasmáticas (Va). (H.E. 1000X)

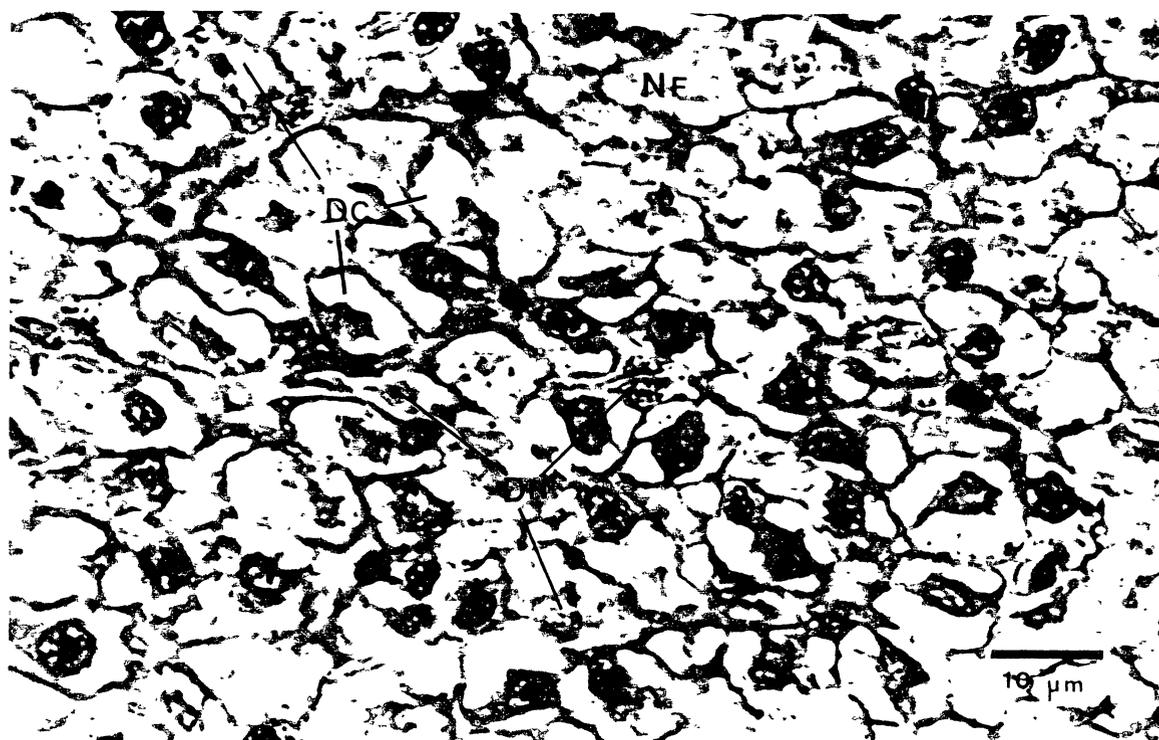


Fig. 19 - Detalhe demonstrando degeneração celular (DC) e nuclear (DN) e desarranjo dos cordões. Início do processo de necrose focal (NF) 2 h. após contaminação com Dimetoato 500. (H.E. 1000X)

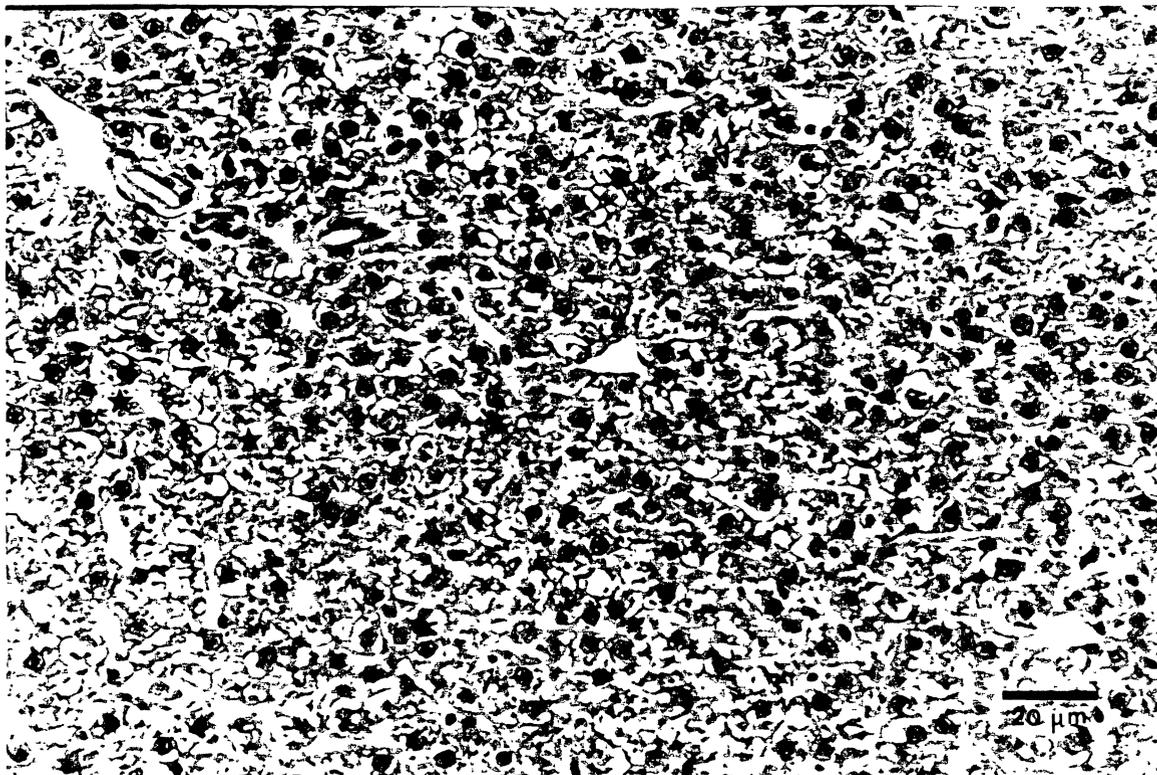


Fig. 20 - Citoplasma com granulações finas (→) e grossas (★) um tanto eosinófilo. Contaminado 4 h. com Dimetoato 500. (H.E. 400X)



Fig. 21 - A membrana plasmática em muitas células já não é visível, núcleos (N) relativamente regulares, cromatina condensada no centro (↓). Contaminado 4 h.. (H.E. 1000X)

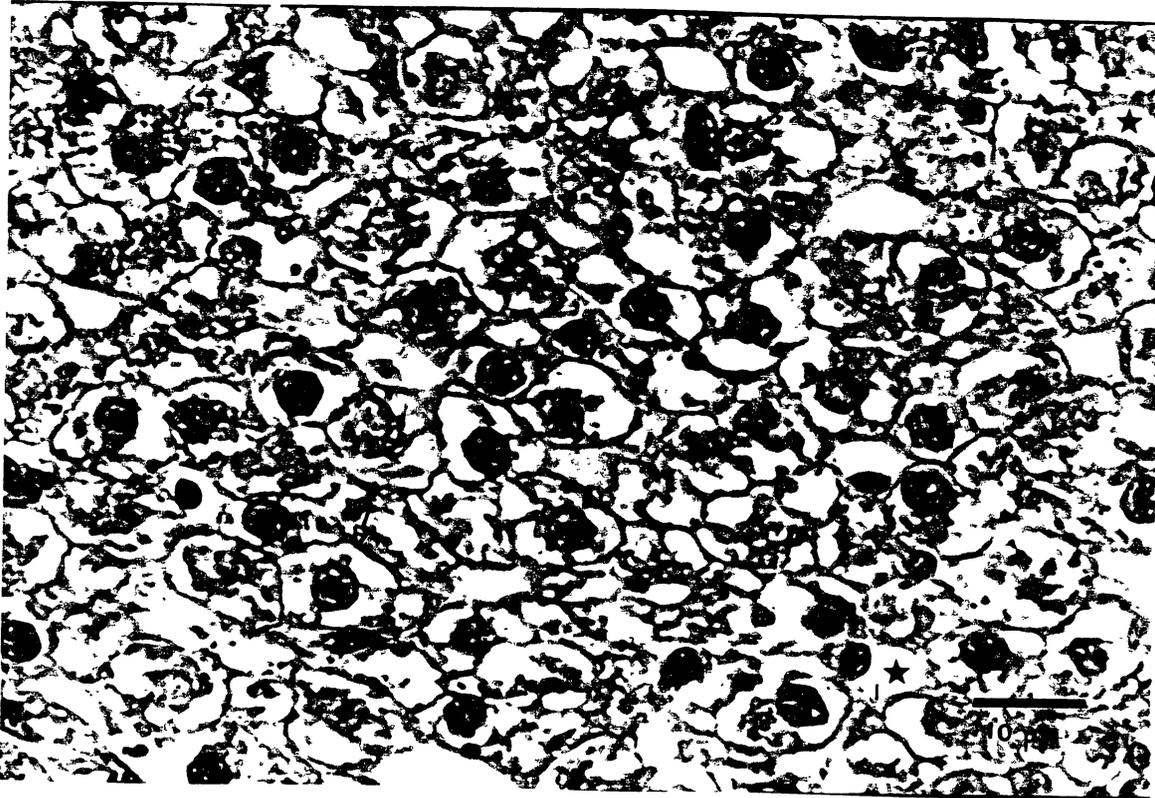


Fig. 22 - Observamos ainda presença de células normais (-▷). Vacuolização persiste em algumas regiões(★). Contaminado 4 h. (H.E. 1000X)

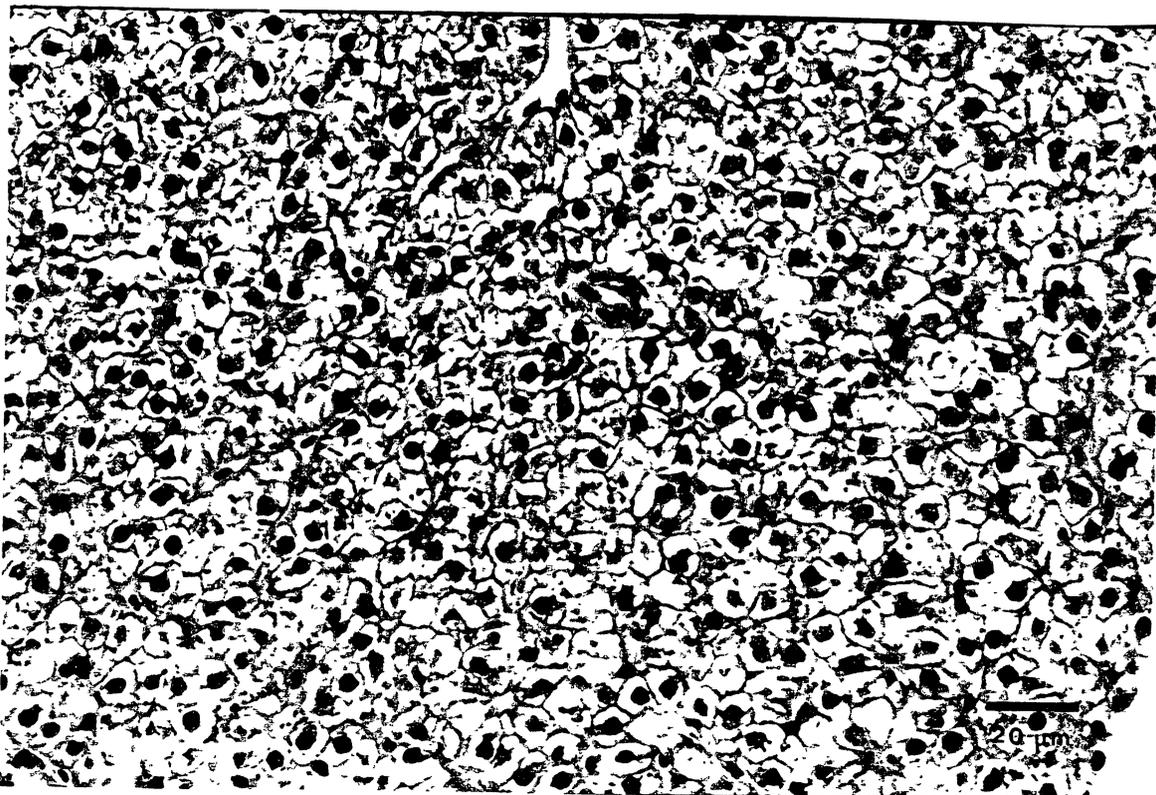


Fig. 23 - Presença de grânulos densos, regiões vacuolizadas outras não. Contaminado com Dimetoato 500 por 8 h. (H.E. 400X)

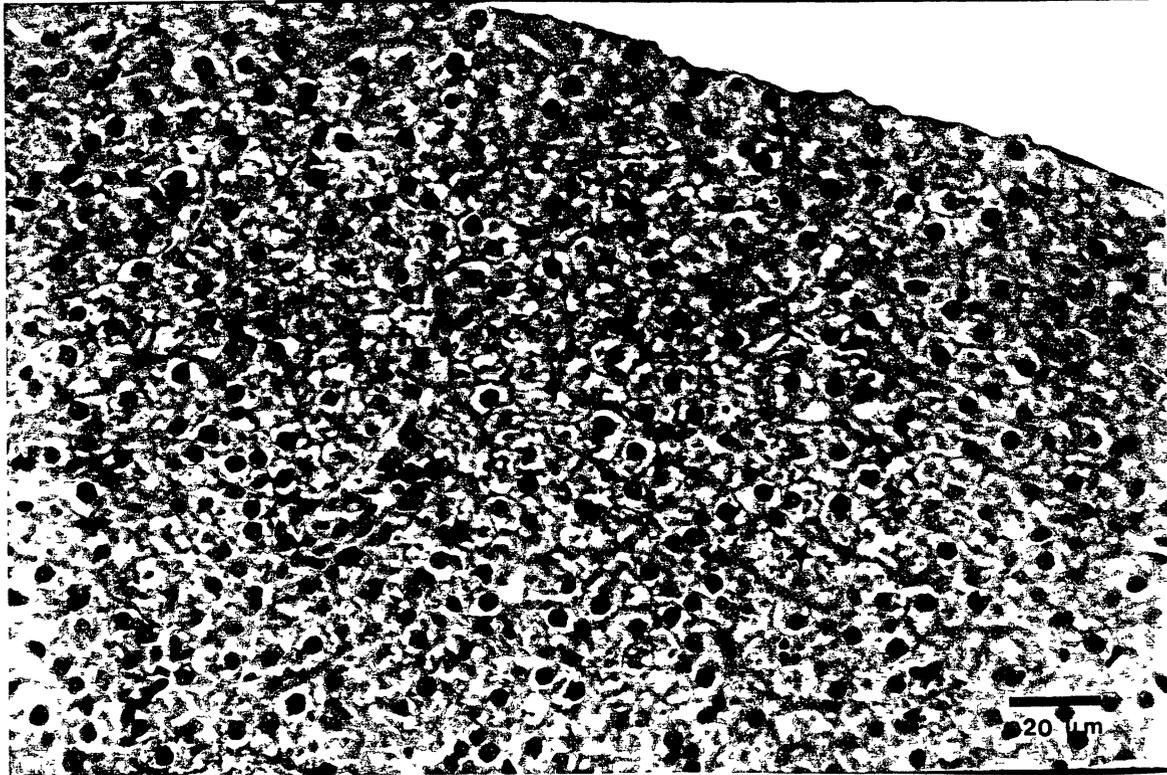


Fig. 24 - Em muitas regiões as células tornam-se quase indistingüíveis com citoplasma intensamente granular (★), diminuição significativa dos vacúolos. Contaminado 8 h. (H.E. 400X)

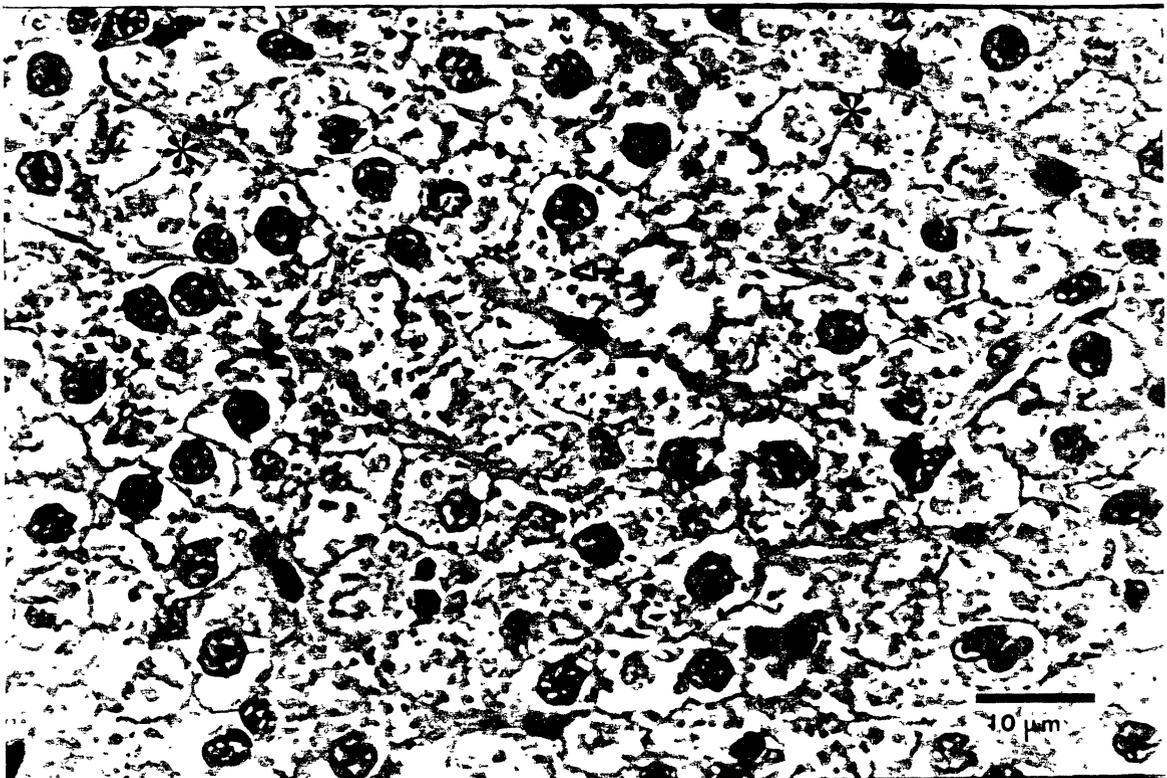


Fig. 25 - Tempo caracterizado pela acentuada presença de grânulos densos (→) e positivos a eosina corados em rosa. Podemos observar áreas onde a perda celular é total (*). Contaminado 8 h. (H.E. 1000X)

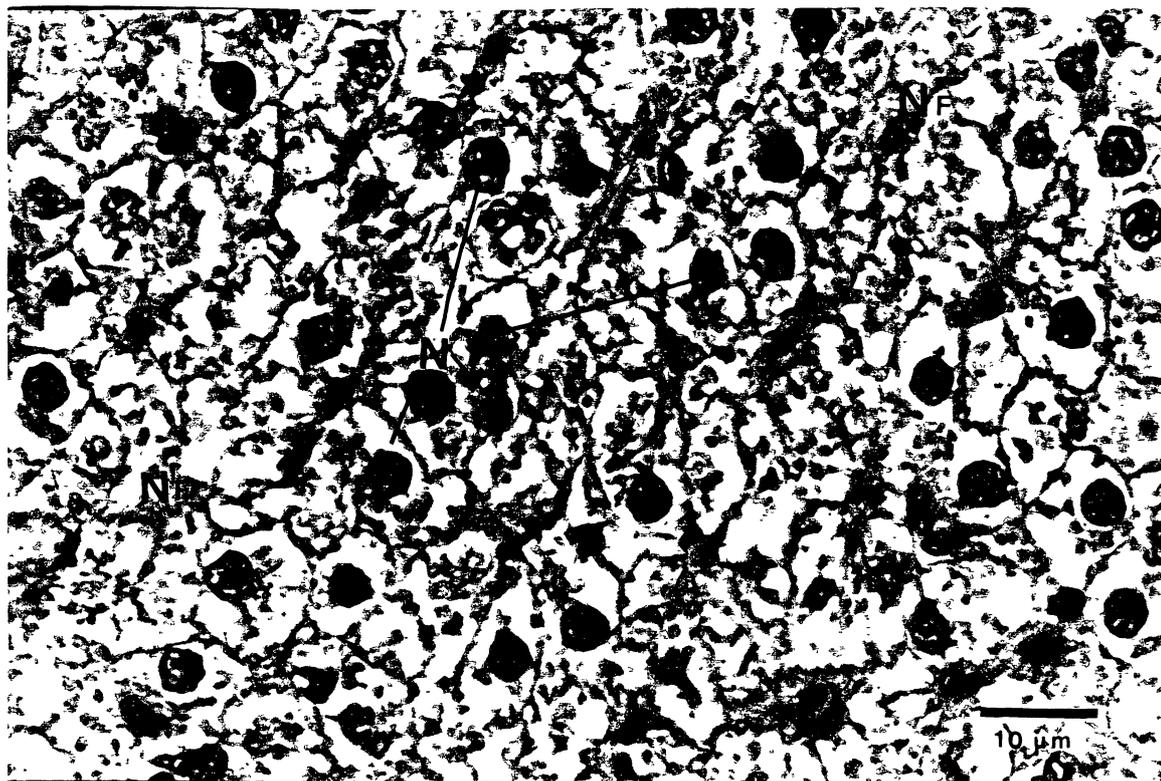


Fig. 26 - Núcleos dos hepatócitos ocorrem em diversos diâmetros e graus de densidade (N), formação de focos de necrose (NF). Contaminado 8 h. (H.E. 1000X)

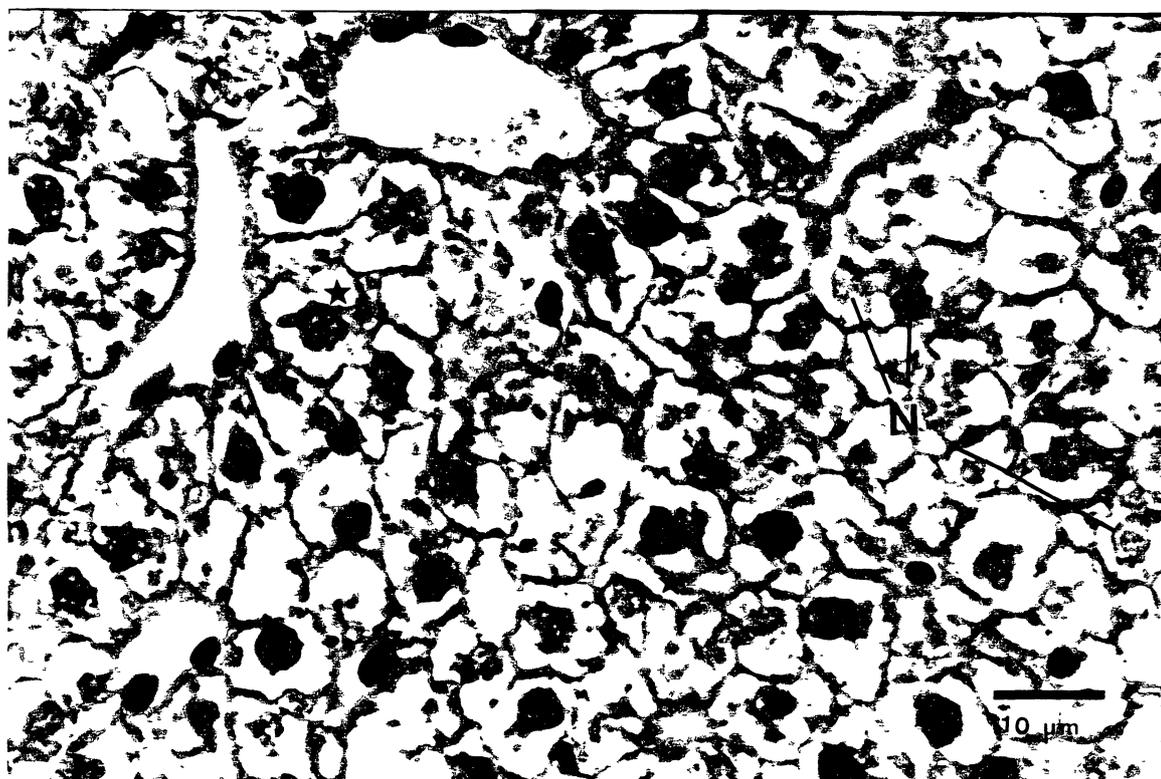


Fig. 27 - Desorganização das células hepáticas (★), ducto e sinusóide hepático descaracterizado degeneração nuclear (N). Contaminado 8 h. (H.E. 1000X)

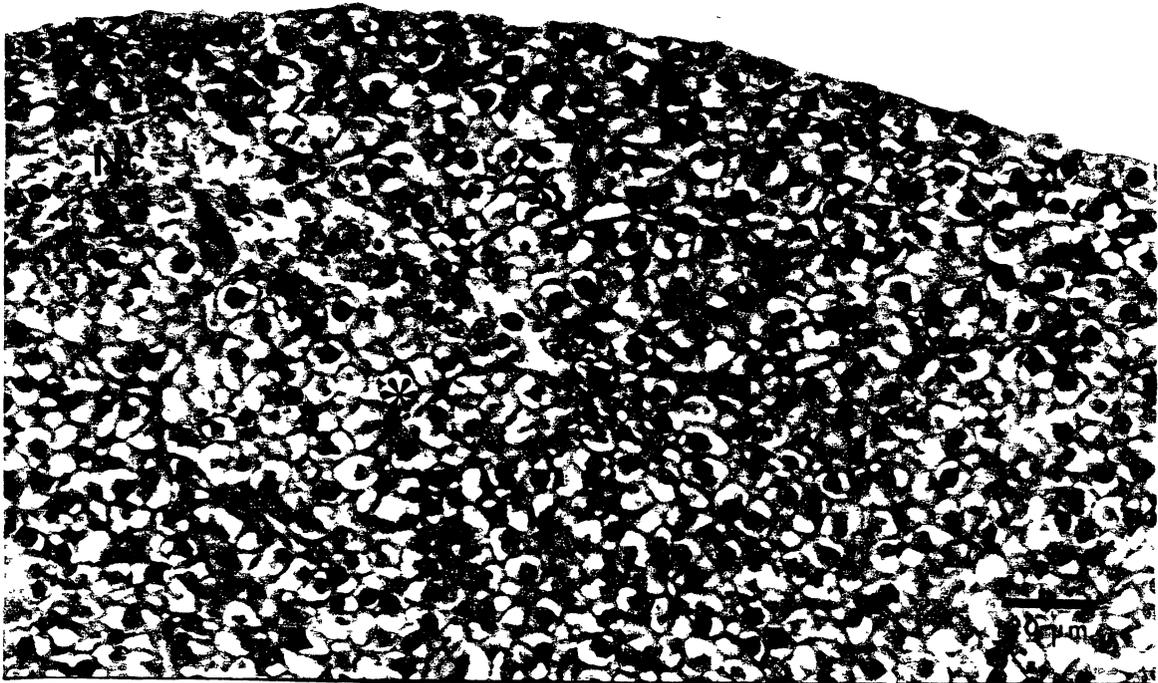


Fig. 28 - Tecido totalmente necrosado (N_C) e em início de necrose (*), sugere presença de células do sistema imune. Contaminado com Dimetoato 500 por 24 h. (H.E. 400X)

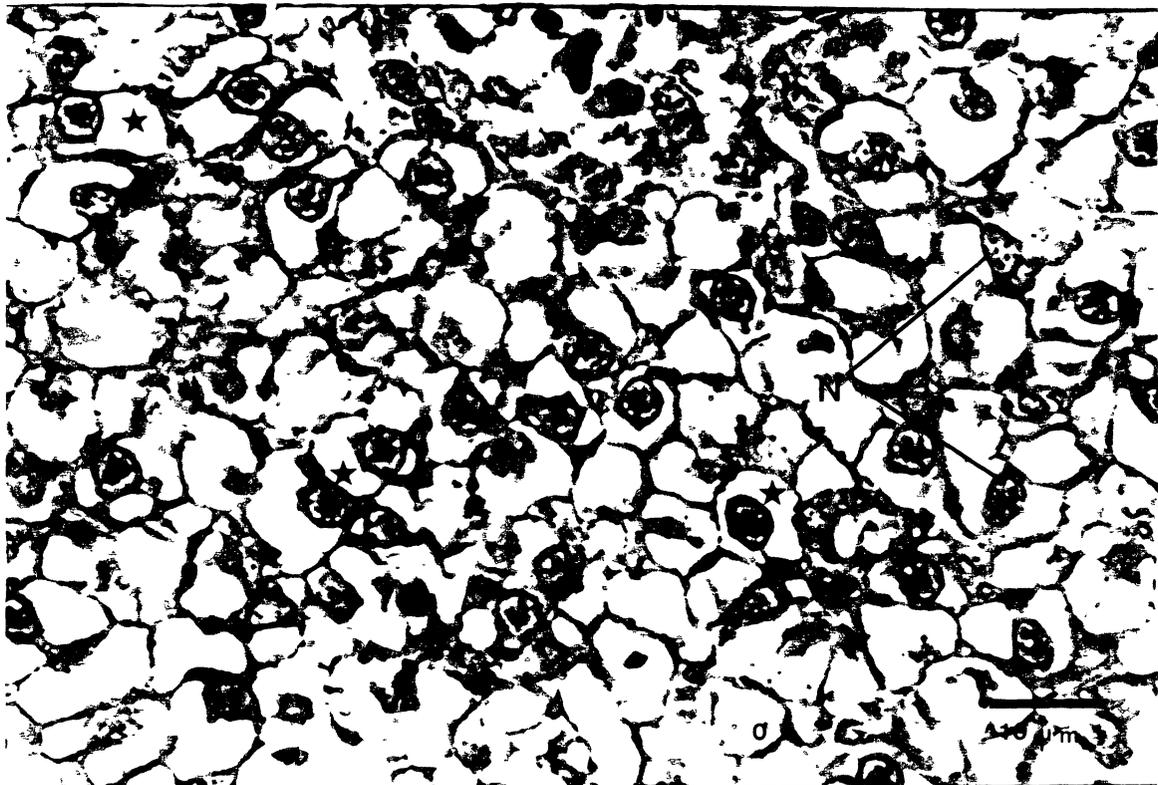


Fig. 29 - Células com lateralização nuclear (★), com e sem granulações, núcleos em degeneração (N) e vacuolização intensa e moderada. Contaminado 24 h. (H.E. 1000X)

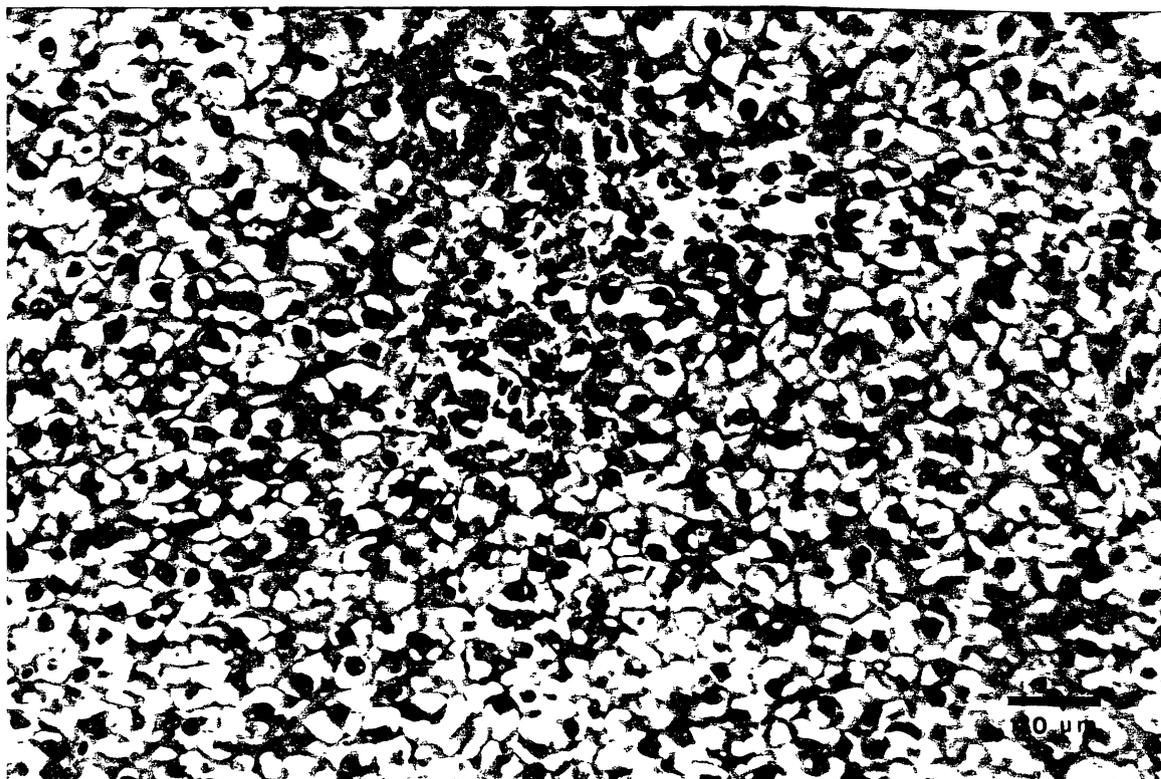


Fig. 30 - Áreas bem vacuolizadas e necrose (Nc). Contaminado 24 h. (H.E. 400X)

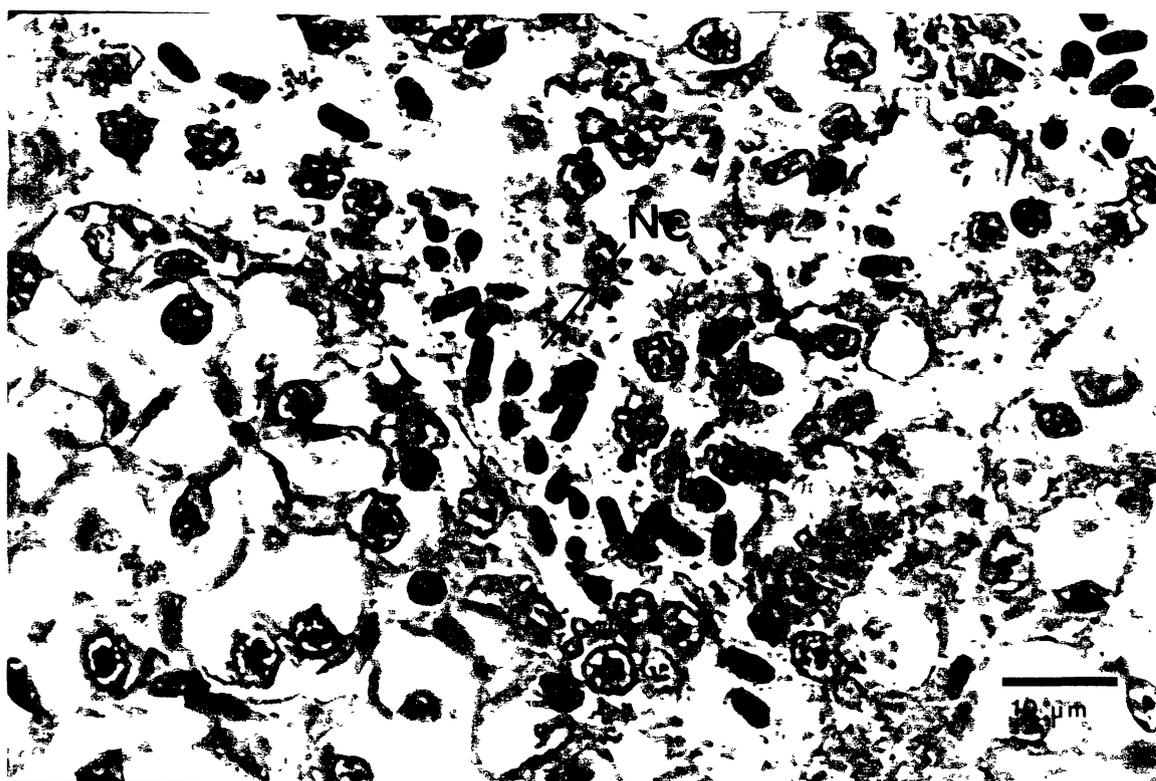


Fig. 31 - Necrose com extravasamento sangüíneo a partir de capilares(NC), não sendo possível visualizar limites dos vasos e células hepáticas. Contaminado 24 h. (H.E. 1000X)

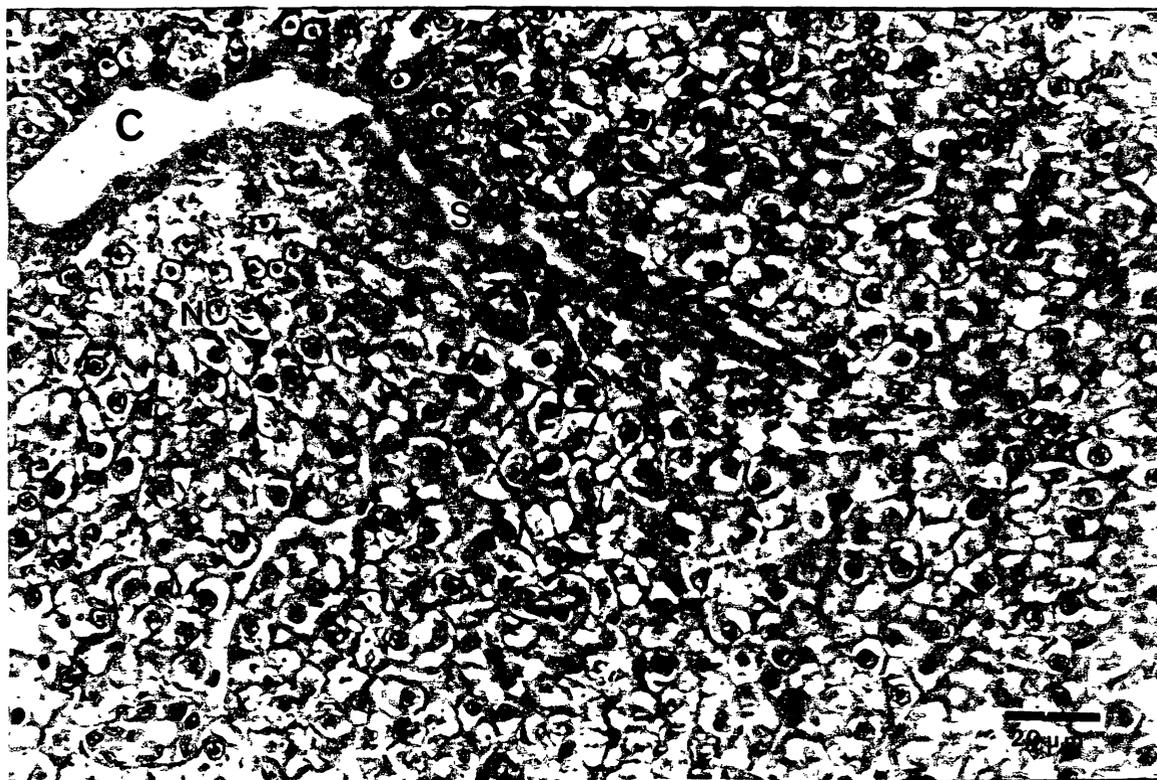


Fig. 32 - Pontos de necrose (NC), capilares (C) e sinusóides (S). Detalhes do fígado de animal após 72 h. da contaminação e 48 h. após estar em ambiente descontaminado. (H.E. 400X)

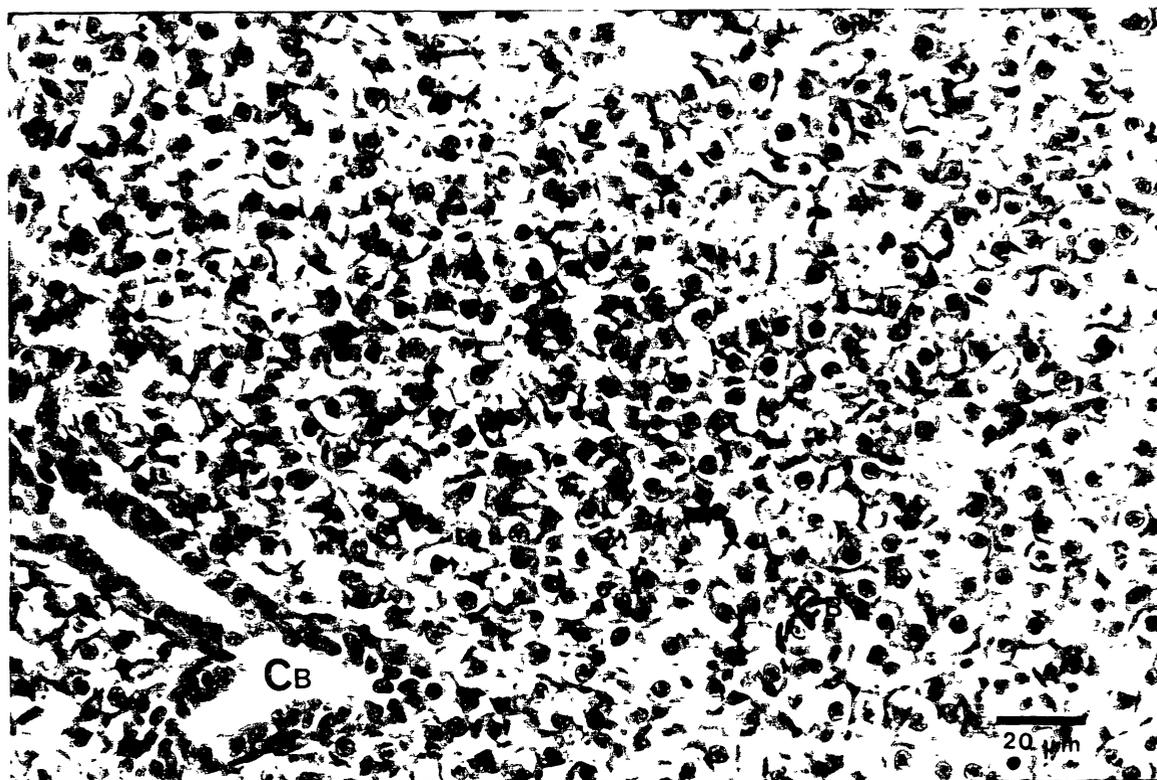


Fig. 33 - Retomada da reorganização dos cordões, com presença de ducto biliar (CB). Contaminado 72 h. (H.E. 400X)

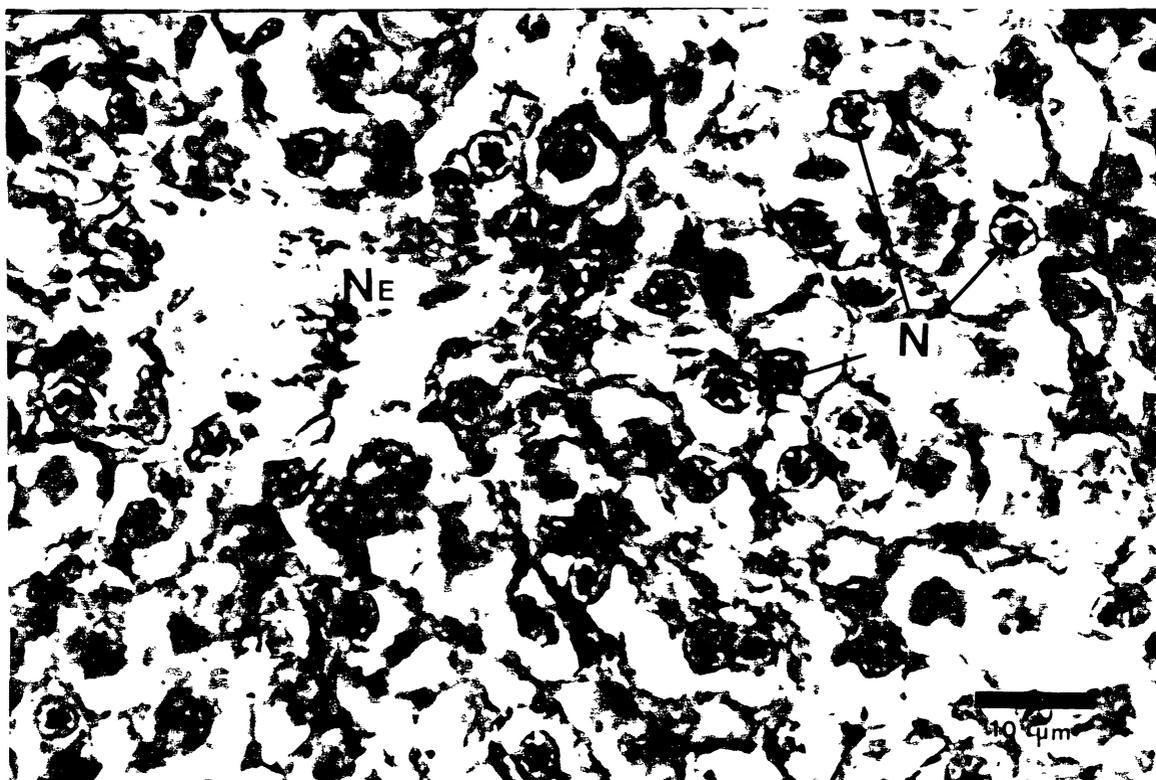


Fig. 34 - Grande área de necrose (NE) observando células com núcleos normais (N), vacúolos irregulares. Contaminado 72 h. (H.E. 1000X)

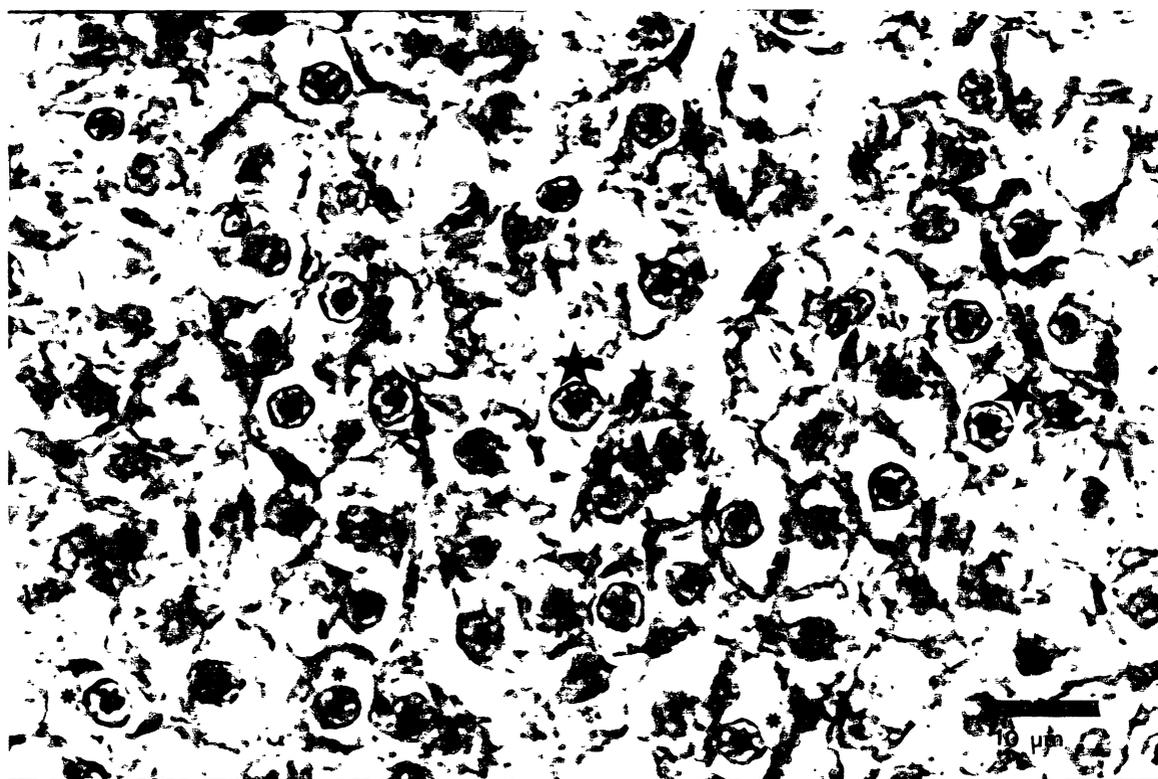


Fig. 35 - Núcleos normais(★), outros ainda picnóticos (★) mantendo ainda em muitos casos lateralização nuclear (*). Contaminado 72 h. (H.E. 1000X)

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Quando forem avaliados os agentes causadores de impacto ambiental, obrigatoriamente devem ser incluídos os pesticidas. Destes, os organofosforados devem fazer parte da lista. A necessidade da aplicação de pesticidas nos dias de hoje é um fato inegável. Já nos primórdios da era cristã temos relatos da utilização de arsênico como eliminador de insetos, e extratos de plantas, como o pyrethrum e as sulfas, que também foram usados nos impérios grego e romano (ITAL, 1989). Mais tarde, o homem passou a interferir no meio ambiente, causando transformações como inundações, desmatamento e queimadas, de modo a diminuir as condições de desenvolvimento de pragas. Com o aumento da população, houve necessidade da expansão da agricultura, para viabilizar a crescente demanda de alimentos. Assim, as grandes áreas de monoculturas uniformes vieram favorecer o aparecimento de pragas, devido à abundância de provisões.

Após a Segunda Guerra Mundial, é que se descobriu o alto poder e abrangência dos pesticidas, norteando um grande desenvolvimento tecnológico na indústria de tais produtos. Estes produtos permitiram a produção das grandes lavouras. Mas o conhecimento superficial da sua toxicidade levou ao uso exagerado, resultando em contaminação do meio ambiente, conseqüentemente da cadeia alimentar, atingindo o homem, não só pelos alimentos, mas também pela falta de técnicas adequadas para aplicação de tais produtos. Assim sendo, o organofosforado Dimetoato, largamente utilizado na agricultura do Estado do Paraná, teve avaliada a sua toxicidade aguda e seus efeitos, a nível de células hepáticas.

ALABASTER, 1969, avaliou uma série de pesticidas. Com base na determinação do CL 50 do produto Rogor 40 (Dimetoato), no valor de 58 p.p.m, para a espécie *Salmo gairdnerii*, classificou o organofosforado Dimetoato como produto de média toxicidade, quando comparado a outros pesticidas. *Therapon jarbua*, quando exposto a Dimetoato (Rogor), resultou em um CL 50 de 0,70 p.p.m., em bioensaio estático (LINGARAJA, VÉNUGOPALAN, 1978). Em *Saccobranthus fossilis*, bioensaio de 96 h. apresentou um CL 50 de 4,57 mg/l (VERMA *et al.*, 1982), ao passo que, no presente trabalho, com Dimetoato 500 encontrou-se o valor de 0,0488491 µl para a espécie *Brachydanio rerio*. Isto sugere que os diferentes resultados são atribuídos às diferentes formulações industriais, onde veículos são adicionados para solubilizar o princípio ativo e a diferença de resistência das espécies frente aos produtos, e que diferentes espécies reagem de maneira diversa ao poluente.

De maneira geral, os organofosforados mais utilizados são relativamente bem excretados ou mesmo metabolizados, não fosse o acúmulo da droga no organismo ou o fato de que a própria acetilcolinesterase retém mais firmemente o inibidor. Nesta situação, os sinais e a sintomatologia de envenenamento se assemelham, quanto à intensidade e à gravidade produzida por uma única dose ou pela sucessão de pequenas doses, todas atingindo um acúmulo crítico, deixando seqüelas crônicas e severas (SILVA,1989; SILVA *et al.* 1993).

A tabela a seguir (LARINI,1979) resume a sintomatologia apresentada pelo homem quando exposto a organofosforados.

TABELA - SINAIS E SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS

LOCAL		PRECOCES	TARDIOS
1. Sistema Nervoso Central	Alterações neuropsiquiátricas	Tensão, ansiedade, inquietude	Alterações do sono e pesadelos; dificuldade de concentração; comprometimento de memória
	Alterações neurológicas puras	Cefaléia, tonteira e vertigens	Convulsões; atonia; tremores; confusão; torpor e coma; soluços e manifestações extrapiramidais; tremores involuntários, marcha atáxia e incoordenação dos movimentos.
2. Sistema Nervoso Autônomo	2.1. Efeitos Muscarínicos		
	Sistema Respiratório	Aumento do ritmo respiratório	Rinorréia; secreção bronquiolar excessiva; edema pulmonar; dispnéia; opressão torácica.
	Aparelho digestivo	Perda do apetite	Náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, defecação involuntária.
	Sistema Circulatório	Pulso diminuído	Braquicardia, bloqueio auriculoventricular; parada cardíaca
	Oculares	Visão enfraquecida; discreta miose	Miose; pupilas panctiformes sem reação.
	Geniturinário		Diurese freqüente e involuntária.
	Glândulas exócrinas	Lacrimejamento; aumento das secreções salivar e nasal	Transpiração excessiva
	2.2. Efeitos Nicotínicos		
	Fadiga; fraqueza muscular; contrações involuntárias	Cãimbras, fasciculações, enfraquecimento muscular generalizado	

SILVA (1989), estudando os efeitos subletais do organofosforado Folidol 600 em *Callichthys callichthys*, descreveu a sintomatologia observada. Primeiramente agitação, perda do equilíbrio, representada por natação lateral, algumas vezes posição de ventre para cima, com incoordenação de movimentos para retornar à posição normal. Apresentaram alguns trismas de nadadeiras peitorais, coloração esbranquiçada das nadadeiras e da parte ventral do corpo. A respiração mostrou-se superficial, com maior amplitude dos opérculos. Os animais não reagiram à presença de alimento. Após o período de agitação, permaneceram no fundo do aquário, com movimentos descoordenados, na tentativa de deslocamento, com certa ansiedade, sem conseguirem-se locomover, permanecendo, assim, até o estágio de morte. Apesar da sintomatologia muscarínica e da nicotínica ser tão pronunciada em mamíferos LARINE (1979), SILVA (1989) argumentam que alguns compostos organofosforados são relativamente menos tóxicos para mamíferos do que para peixes e vice-versa, não sendo possível manter uma nítida correlação de efeitos sintomatológicos entre peixes e mamíferos.

A absorção dos pesticidas solúveis em água por peixes se processa principalmente pelas brânquias, e é consideravelmente aumentada com a elevação da temperatura e a diminuição do oxigênio dissolvido na água, pois ocorre um aumento de velocidade dos movimentos respiratórios (JONSSON, 1991). Exames de microscopia eletrônica demonstraram que, em hepatócitos de *Salmo gairdneri*, a temperatura induziu a alterações estruturais como resultado de adaptação do organismo (BERLIN, DEAN, 1967). Baseado nestas considerações, o bioensaio foi mantido em condições físicoquímicas estáveis (BRASIL, 1988), para que não apresentasse interferência nos resultados.

A espécie estudada, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822, 1823), apresentou-se como um ótimo organismo experimental, devido não só à facilidade de se manterem os indivíduos em aquários, como ainda pelo seu tamanho e peso, que facilitam o estabelecimento da relação gramas de peixe por litro de água, sendo possível assim a realização do bioensaio e um maior número de indivíduos expostos ao mesmo tempo, qualidades estas também observadas e descritas por LAALE (1977).

A morfologia normal e alterada do fígado e de outros órgãos de peixes expostos a produtos tóxicos tem sido pesquisada e descrita, tais como: determinação da toxicidade de organofosforado para diferentes espécies de peixes (PICKERING, HENDERSON, LEMKE, 1962), intoxicação oral crônica por DDT em salmão (BUHLER, RASMUSSEN, SHANKS, 1969), níveis de inibição de acetilcolina cerebral de *Cyprinodon variegatus* exposto a organofosforado (COPPAGE, 1972), efeitos hematológicos devido a dose subletal de três organofosforados em *Channa punctatus* (LONE, JAVAID, 1976), efeitos subletais do inseticida mirex em ecossistema de estuário experimental (TAGATZ, 1976), *Carassius auratus*, exposto a concentração subaguda de paration (RAND, 1977), efeitos subletais de inseticida organofosforado em *Sarotherodon mossambicus* (ADENEY, MATTHIESSEN, 1979), alterações histopatológicas em brânquias de *Salmo gairdinerii* expostas a permethrin (NRDC-143) (KUMARAGURU, BEAMISH, FERGUSON, 1982), acúmulo de resíduos de endosulfan em peixes predadores após pulverização (MATTHIESSEN *et al.*, 1982), deformações no esqueleto de *Brachydanio rerio* exposto a organofosforado malation (KUMAR, ANSARI, 1984). *Brachydanio rerio* exposto a malation durante 7 dias mostrou notáveis mudanças no ovário (ANSARI, SRIVASTAVA, KUMAR, 1986). A atividade da fosfatase alcalina, ácidos nucleicos e ocorrência de proteínas

foram significativamente diminuídas no ovário de *Brachydanio rerio*, depois da exposição de organofosforado malation, e histologicamente foi observada a paralisação do desenvolvimento dos ovócitos (ASARI, KUMAR, 1987b). Estudos do estresse frente a tóxicos como DDT, malation e mercúrio foram avaliados em sangue de *Sarotherodon mossambicus* (RAMALINGAM, 1988). Efeitos do malation ainda foram estudados em *Ictalurus punctatus* (AREECHON, PLUMB, 1990). Diferentes testes foram realizados para avaliar o potencial de riscos de xenobióticos antropogênicos em peixes (BRESCH, 1991), reunindo um conjunto de reações e alterações que justificam o interesse pelo estudo do assunto em pauta.

Em várias espécies de peixes, alterações estruturais frente a produtos diferentes vêm sendo estudadas. Assim, investigações foram feitas em *Cyprinus carpio*, buscando-se a relativa concentração de organofosforado malation em vários tecidos, bem como o tempo de retenção do resíduo do pesticida (BENDER, 1969), *Salmo clarki* foi exposto cronicamente a uma dose subletal do inseticida endrin, onde as células do fígado caracterizaram-se por inchaço, desorientação dos cordões hepáticos, células em mitose dispersas no interior do parênquima do fígado, núcleos deformados, focos de necrose e inflamação e núcleos excêntricos (ELLER, 1971), sendo confirmadas neste trabalho algumas destas alterações, como: células edemaciadas, desorientação dos cordões hepáticos, núcleos deformados, focos de necrose e núcleos excêntricos, não sendo observada a presença de células em mitose. Quando *Brachydanio rerio* foi exposto a DDT, ocorreram alterações ultraestruturais no fígado: proliferação do R.E. liso e rugoso, apresentando gotículas de lipídios e decréscimo no tamanho das células (WEIS, 1974). Efeitos agudos de metil mercúrio em *Ictalurus punctatus* demonstraram focos necróticos e severa vacuolização (KENDALL, 1977),

que no *Brachydanio rerio* também ocorreram. Na M.O. foram observadas regiões com vacuolização intensa, moderada e até mesmo sem vacuolização, sugerindo regiões com maior acúmulo de lipídios ou glicogênio. Avaliando a acumulação hepática de cobre em *Morone americana*, comprovou-se progressiva acumulação em células do fígado, associando uma fibrose peribiliar e inflamação, hiperplasia do ducto biliar e desarranjo da arquitetura celular (BUNTON et al., 1987),

Ácidos nucleicos e proteínas apresentaram uma redução significativa, enquanto aminoácidos livres aumentaram no fígado de *Brachydanio rerio* exposto a diazenon por 168 h (ANSARI, KUMAR, 1988). Alterações morfológicas ultraestruturais do fígado de *Brachydanio rerio* após prolongada exposição subletal de 4-nitrofenol evidenciaram um aumento do número de lisossomos, hepatócitos inchados, invasão de macrófagos no espaço intracelular, presença de células binucleadas (BRAUNBECK, STORCH, NAGEL, 1989). Neste trabalho foram observadas células supostamente do sistema imune, que também foram observadas em indivíduo normal em M.E.T.

Mesmo com todas estas informações já conhecidas, verifica-se de fundamental importância avaliar-se animais de uma espécie considerada ideal para testes de toxicidade, sofreriam ou não as conseqüências de uma contaminação curta e de baixa concentração de organofosforado comercial Dimetoato 500, em um nível considerado seguro. Visto como, ao ser exposto em dose subletal de 0,5 mg/l por quatro meses, *Brachydanio rerio* continuou apresentando alterações significativas (ANSARI, KUMAR, 1987a). Surpreendentemente, este nível de malation (0,5 mg/l) é recomendado para o controle do mosquito pela Administração de Alimentos

e Drogas dos E.U.A., considerando-se que sob estas condições normais, não ocorreriam problemas residuais (BENDER, 1969).

As células normais do fígado de *Brachydanio rerio* foram estudadas e em M.O. apresentaram forma poligonal com membrana plasmática bem definida, sendo também em M.E.T. observada a mesma característica, apenas não sendo possível descrever, a nível M.E., a presença de grande quantidade de lipídio e glicogênio encontrado por WEIS, (1972) e descrito por CROSS e MERCER, (1993).

BYCZKOWSKA-SMYK (1968), estudando células hepáticas de *Lota lota l.*, encontrou as células também com forma poligonal, mas com núcleos localizados mais lateralmente e citoplasma com grandes quantidades de lipídios, sendo muitas vezes observada deformação do núcleo, devido estar este entre uma grande massa de lipídios. Tal fato não foi encontrado em *Brachydanio rerio*, cujo o núcleo apresenta-se arredondado, com cromatina dispersa na periferia, havendo presença de nucléolo proeminente, apesar de também serem observados agregados de glicogênio e lipídios, embora dispersos pelo citoplasma, sem interferirem na forma nuclear, de conformidade com WEIS, (1972) e HIBIYA, (1982). Ainda BYCZKOWSKA-SMYK (1968), observou que o acúmulo de glicogênio e lipídio ocorria em determinadas regiões com mais frequência do que em outras. No presente trabalho, observamos regiões muito vacuolizadas permanecendo outras regiões com pouca vacuolização, sugerem que ocorreu acúmulo de material como lipídio e glicogênio, que são removidos durante o processo histológico. A importância desta observação merece posterior investigação para que se verifique até que ponto a vacuolização ocorre dentro de uma normalidade, quais as razões do regionalismo, e ainda que conseqüências acarretariam para os indivíduos e de que forma ocorreriam.

Com relação à presença de mitocôndrias, BYCZKOWSKA-SMYK (1968) descreve-as como estruturas distribuídas pelo citoplasma celular, pequenas e de formato arredondado, algumas alongadas e irregulares, fato encontrado também neste trabalho e confirmado por WEIS (1972) e TANIKAWA (1968) (Fig.08a). Lisossomos foram descritos por BYCZKOWSKA-SMYK (1968) e WEIS (1972), como presentes no tecido hepático, fato igualmente registrado neste estudo.

WEIS (1972) descreveu para *Brachydanio rerio* a presença de sinusóides revestidos por células endoteliais próprias, espaço perissinusoidal geralmente reduzido em relação a outros vertebrados, sinusóides com endotélio fenestrado e muitas microvilosidades procedentes dos hepatócitos direcionadas para o espaço de Disse (Fig.06a,b), também vistas por BYCZKOWSKA-SMYK (1968) e nesta descrição.

Em conformidade com WEIS (1972, 1974), foi descrito em *Brachydanio rerio* a presença de retículo endoplasmático granular com ribossomos aderidos a suas membranas, formando poliribossomos, estendendo-se muitas vezes do núcleo até a periferia da célula, e ainda, a presença de células do sistema imune nos sinusóides e espaço perissinusoidal.

Quando as alterações em *Brachydanio rerio* expostos a dose subletal 0,025 µl de Dimetoato 500 foram comparadas às da exposição de *Tilapia rendalli* frente ao organofosforado Folidol 600 (FANTA *et al.*, 1988), houve semelhanças histopatológicas nas células hepáticas, tais como: hepatócitos tumefatos, células descaracterizadas, perdendo a visualização da membrana plasmática, lateralização nuclear, vacuolização, aumento da basofilia e, em tempos maiores, necrose focal.

GILL, PANDE, TEWARI (1990), expuseram *Puntius conchoni* a dose subletal do organofosforado phosphamidon, encontrando inicialmente um aumento significativo de lipídios no fígado e ovário. Verificou-se no presente estudo semelhante aumento, sem que fosse possível caracterizar com precisão sua causa. Entretanto, SILVA (1989) admite a possibilidade de que os compostos organofosforados, a partir da propriedade que possuem de combinar-se com a serina do sítio ativo da colinesterase, experimentem propriedade semelhante com resíduos de serina de outras proteínas, podendo chegar a comprometer o processo normal de atividade de órgãos como o fígado.

KUMAR, ANSARI (1986) e ANSARI, KUMAR (1988) estudaram os efeitos tóxicos e patológicos do organofosforado malation em fígado de *Brachydanio rerio*, primeiro através de análises das alterações bioquímicas como proteínas, aminoácidos e fosfatase alcalina no fígado, obtendo um decréscimo de proteína e inibição do DNA e RNA, com uma elevação de aminoácidos livres. Apesar de não terem sido feitas análises bioquímicas e citoquímicas no presente estudo, esta redução é diretamente correlacionada com as desordens hepáticas observadas e descritas. Em segunda análise, foi demonstrado que o tratamento com dieldrin, lindane, endrin e dimecron em *Channa punctatus* exibiram quase que as mesmas anormalidades histopatológicas para malation em *Brachydanio rerio*, como acréscimo do diâmetro da célula, mas o grande número de vacúolos foram notados durante a fase de recuperação. Isto prova que o produto permaneceu acumulado no fígado e sua ação foi retardada, demonstrando que o organofosforado não se degrada necessariamente com rapidez.

ANES (1978) descreveu as alterações em *Channa punctatus*, exposto a organofosforado dimetoato em dose subletal de 8 p.p.m.. Comparado seu estudo a este trabalho, observam-se as mesmas alterações como: vacuolização citoplasmática e presença de granulações citoplasmáticas, que ele descreve após 24 h., enquanto aqui foram evidenciadas granulações após 4 h., com maior intensidade 8 h. após a exposição.

GILL, PANT, PANT (1988), usando dimetoato em *Puntius conchoni* obtiveram resultados que se assemelham aos do presente estudo: vacuolização aumentada, núcleos picnóticos, desorganização dos cordões hepáticos, ausência de muitos núcleos e sinais de necrose focal.

Os resultados obtidos reforçam, portanto, a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a ação de pesticidas de largo uso, já que, mesmo em doses consideradas seguras, têm amplo efeito sobre os organismos.

As alterações hepáticas observadas incidem diretamente sobre o metabolismo do animal, comprometendo sua competência para viver. Com a saúde diminuída, o animal poderá vir a ser presa fácil, não se reproduzir, ou ser derrotado na competição por alimento e por espaço.

Assim, do ponto de vista ecológico, haverá um conseqüente desequilíbrio nas populações.

Vale alertar, ainda, para a importância dos efeitos produzidos na cadeia alimentar, trazendo conseqüências para animais e homens que porventura fizerem parte dela.

Assim, o estudo das relações da sintomatologia, alterações histopatológicas agudas e crônicas e comportamento das espécies torna-se vital para a proteção e prevenção de futuros acidentes.

Devido às alterações, principalmente nucleares e à degeneração dos hepatócitos observadas em casos de neoplasias provocadas por toxinas em

fígado de peixe (ROBERTS, 1981), parece possível que, em casos crônicos ocorra desenvolvimento de neoplasias motivadas pelo organofosforado aqui testado. Para que isso seja confirmado serão necessários estudos adicionais sobre a toxicidade do Dimetoato 500 a longo prazo. Portanto, a atuação do produto sobre o meio biótico poderia ser considerado grave desde que este fato se confirmasse.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1 - A dose de 0,0488491 µl/l de Dimetoato 500 corresponde a 0,0244 mg do princípio ativo dimetoato, mostrando-se letal para 50% da população de *Brachydanio rerio*.

2 - As células hepáticas normais de *Brachydanio rerio* apresentam: forma poligonal, presença de vacúolos citoplasmáticos, núcleo com cromatina dispersa, quantidade significativa de retículo endoplasmático rugoso, grande quantidade de mitocôndrias e gotículas de lipídios e glicogênio.

3 - Fígado de *Brachydanio rerio* é alvo de ação tóxica do Dimetoato 500, e as alterações tornam-se evidentes a partir de 2 horas de exposição, mesmo a dose subletal.

4 - Apartir de 2 horas de exposição inicia-se o aparecimento de granulações citoplasmáticas e desarranjo celular.

5 - O tempo de 4 horas de exposição é caracterizado por núcleos picnóticos e perda de conteúdo celular, com pontos de necrose.

6 - Tempo de exposição 8 horas é caracterizado pelo grande acúmulo de grânulos densos e positivos a eosina, além de focos de necrose.

7 - Em 24 horas de exposição observam-se regiões totalmente necrosadas com extravasamento sangüíneo, não sendo possível delimitar muitos vasos sangüíneos.

8 - A partir de 72 horas de exposição a Dimetoato 500, ocorre tendência para recuperação, apesar de ainda se apresentarem alterações significativas como necrose.

9 - O peixe *Brachydanio rerio* apresentou uma adaptação satisfatória a condições laboratoriais, permitindo o seu emprego em estudos de impacto ambiental agudo ou crônico.

10 - Mesmo em doses subletais, consideradas seguras, o organofosforado dimetoato causa visível prejuízo morfo-funcional no fígado de *Brachydanio rerio*.

APÊNDICES

APÊNDICE I

SOLUÇÕES FIXADORAS E CORANTES PARA M.O.

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

2. Albumina de Mayer (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 utilização: passe esta solução com algodão acrílico sobre as lâminas de vidro, formando uma película fina, acrescente 2 gotas de água destilada e deposite o corte, leve para esticar em placa aquecedora.

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 g
H ₂ O 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.

4. Eosina (CLARK, 1981)

Solução estoque: eosina a 1%

Reagentes:

Eosina YCl 45380.....	1,0 g
H ₂ O destilada.....	20,0 ml
Álcool 95% PA.....	80,0 ml

Preparo: misture os reagentes até obter uma solução homogênea.

Solução para uso:

Fórmula:

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

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

SOLUÇÕES FIXADORAS PARA M.E.T.

1. Fixadores

Glutaraldeído 2,5% diluído em Tampão Cacodilato 0,2 Molar, em pH 7,2.
Tetróxido de Ósmio a 4%, (0,5 ml), diluído em 1,5 ml de Solução Lavagem.

2. Tampão

Tampão Cacodilato 0,2 Molar em pH 7,2.

3. Solução de Lavagem

Utilizamos solução de Sacarose com a seguinte concentração:

NaCl.....	1,2 g
Sacarose.....	14,6 g
H ₂ O destilada.....	200,0 ml

4. Resina

A resina empregada foi Polylyte com as seguintes concentrações:

T 208.....	90,0 ml
T 202.....	10,0 ml
Peróxido de benzoíla (anidro).....	0,5 g

Preparo: misture os três reagentes em uma proveta, durante no mínimo 1 hora e trabalhe com segurança pois a resina é altamente tóxica. Conserve-a sob refrigeração até o momento do uso. Sendo esta concentração para um total de 100 ml de Resina.

APÊNDICE II

ROTEIRO DE PROCESSAMENTOS HISTOLÓGICOS

1. Processamento Histológico para microscopia Óptica (CULLING *et al*, 1985 modificado)

a. Fixação em Fluido de Bouin6 horas

b. Lavagens sucessivas em álcool a 70%

c. Desidratação em:

 álcool a 80%.....1 hora

 álcool a 85%.....1 hora

 álcool a 90%.....1 hora

 álcool a 95%.....1 hora

 álcool a 100% (1º banho).....1 hora

 álcool a 100% (2º banho).....1 hora

 álcool a 100% (3º banho).....1 hora

 álcool a 100% com xilol (1:1).....1 hora

d. Diafanização em:

 xilol.....30 min

e. Impregnação na estufa a 56° C com:

 xilol com Paraplast Plus (1:1).....1 hora

 Paraplast Plus (1º banho).....1 hora

 Paraplast Plus (2º banho).....1 hora

f. Emblocagem:

 Emblocagem em moldes cúbicos de papel com paraplast plus solidificado a temperatura ambiente.

g. Microtomia:

Trimagem dos blocos em forma de pirâmide para serem seccionados de 3 a 4 micrômetros em micrótomo de parafina Leitz, Wetzlar.

h. Lâminas:

Montagem de lâminas, com os cortes obtidos na microtomia, através da aderência com Albumina de Mayer, sendo os cortes esticados em placa aquecedora e secos em temperatura ambiente antes de serem corados.

2. Processamento Histológico para Microscopia Eletrônica de Transmissão (FRANCO, 1994)

- Fixar em Glutaraldeído a 2,5% por duas horas a temperatura de 4° C.
- Lavar com solução de Sacarose 3 vezes durante 1 minuto cada, a 4° C.
- Pós-fixação com Tetróxido de Ósmio diluído em solução de Sacarose por 1 hora a 4° C, cobrindo os frascos previamente com papel alumínio.
- Lavar com solução de Sacarose 3 vezes durante 1 minuto cada, a 4° C.
- Contrastação em bloco com Acetato de Uranila 2% (Overnight).
- Lavar com solução de Sacarose 3 vezes durante 1 minuto cada, a 4° C.
- Desidratar com Acetona 30%, 50%, 70%, 90%, duas vezes 100% durante 10 minutos.
- Incluir em resina PolyLite e polimerizar na estufa a 60° C durante 72 horas.
- Cortar em Ultramicrótomo.
- Coletar os cortes ultrafinos em tela de cobre.

APÊNDICE III

ROTEIRO DE PROCEDIMENTOS PARA COLORAÇÃO EM M.O.

1. Hematoxilina e Eosina (BÜCHERL, 1962)

- a. desparafinizar com 2 banhos de xilol, 3 minutos cada
- b. hidratar em série gradual de alcoóis (100%, 90% e 70%), 3 minutos cada
- c. lavar em água corrente e destilada
- d. corar com Hematoxilina de Harris, 3 minutos
- e. lavar com água corrente e destilada
- f. contracorar com Eosina solução corante, 3 minutos
- g. desidratar em série gradual de alcoóis (95%, 100% e 100%), 3 minutos
- h. tratar em 1 parte de álcool 100% e 1 parte de xilol, 3 minutos
- i. diafanizar em dois banhos de xilol, 3 minutos
- j. montagem das lâminas com resina Polymount

ROTEIRO PARA CONTRASTAÇÃO EM M.E.T.

Soluções:

a) Reynolds

Nitrato de Chumbo $Pb(NO_3)_2$	1,33 g
Citrato de Sódio $Na_3(C_6H_5O_7) 2H_2O$	1,76 g
H ₂ O destilada	30,0 ml

Preparo:

- aquecer a água destilada e deixar esfriar.

- diluir as substâncias em 30 ml de água destilada, agitando até obter a diluição.
- acrescentar NaOH 1 N. gota a gota até obter uma solução translúcida.
- antes do uso, centrifugar.

b) Uranila

0,2 g de Acetato de Uranila para 10 ml de H₂O destilada

Preparo:

- 1) pesar a uranila (pó)
- 2) diluir em H₂O destilada por 20 minutos no escuro
- 3) filtrar em vidro coberto por papel alumínio.

Procedimento da Contrastação

- 1) colocar um pouco de KOH em recipiente plástico.
- 2) colocar em parafilme, gotas da solução de Reynolds.
- 3) pinçar grades com os cortes, e mergulhar estas com os cortes voltados para baixo, sob as gotas de Reynolds, esperar 3 minutos.
- 4) retirar e mergulhar rapidamente na água destilada, lavar umas dez vezes em cada frasco contendo água destilada (4 frascos).
- 5) secar com papel filtro as grades após lavagem.
- 6) observar em microscópio eletrônico de transmissão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENEY, R. J.; MATTHIESSEN, P. Sub-lethal effects of the organophosphate blackfly larvicide, ABATE(Temephos) on *Sarotherodon mossambicus* (Peters). J. Fish Biol., London, v.15, p. 545-553, 1979.

ALABASTER, J. S. Survival of fish in 164 herbicides, insecticides, fungicides, wetting agents and miscellaneous substances. International Pest. Control., London, p. 29-35, march/april, 1969.

ALMEIDA, N.F.; PIEDADE, J.R. Análise dos inseticidas fosforados. Arq. Ins. Biológico., São Paulo, v.25, p. 95-107, 1958.

ANEES, M. A. Hepatic pathology in a freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) exposed to sublethal and chronic levels of three organophosphorus insecticides. Bull. Environ. Contam. Toxicol., New York, v.19, p.525-527, 1978.

ANSARI, B. A.;SRIVASTAVA, R.; KUMAR, K. Malathion toxicity: Pathological Changes in the Ovary Zebrafish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). Bol. Fisiol. Anim., São Paulo, v.10, p.95-101, 1986.

ANSARI, B. A.; KUMAR, K. Malathion Toxicity: Pathological Changes in the Liver of Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). Bol. Fisiol. Anim., São Paulo, v.11, p.27-34, 1987 a.

- ANSARI, B. A.; KUMAR, K. Malathion Toxicity: effect on the ovary of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). Int. Rev. Gesamten Hydrobiol., Berlin, v.72, n.4, p.517-528, 1987 b.
- ANSARI, B. A.; KUMAR, K. Diazinon toxicity: effect on protein and nucleic acid metabolism in the liver of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). Sci Total Environ., Amsterdam, v.76, n.1, p.63-68, 1988.
- AREECHON, N.; PLUMB, J. A. Sublethal effects of malathion on channel cat fish *Ictalurus punctatus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., New York, v.44, n.3, p.435-442, 1990.
- BENDER, M. E. Uptake and retention of malathion by the carp. Fish-cult., Washington,DC, v.31, p.155-159, 1969.
- BERLIN, J. D.; DEAN, J. M. Temperature-induced alterations in hepatocyte structure of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Exp. Zool., v.164, p.117-132, 1967.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Pesticidas: métodos de análise & informações técnicas. Curitiba, v.1, p.91-93, 1988
- BRAUNBECK, T.; STORCH, V.; NAGEL, R. Sex-specific reaction of liver ultrastructure in Zebrafish, *Brachydanio rerio* after prolonged sublethal exposure to 4-nitrophenol. Aquat. Toxicol., Amsterdam, v.14, n.3, p.185-202, 1989.

BRESCH, H. Early life-stage test in zebrafish versus a growth test in rainbow trout to evaluate toxic effects. Bull. Environ. Contam. Toxicol., New York, v.46, n.5, p.641-648, 1991.

BRZEZINSKI, J.; WYSOCKA-PARUSZEWSKA, B. Neurochemical Alterations in Rat Brain as a Test for Studying the Neurotoxicity of Organophosphorus Insecticides. Arch. Toxicol., v.4, p.479-481, 1988.

BÜCHERL, W. Técnicas microscópicas. São Paulo, Polígono, 1962.

BUHLER, D. R.; RASMUSSEN, M. E.; SHANKS, W. E. Chronic oral DDT toxicity in juvenile coho and chinook salmon. Toxicol. Appl. Pharmacol., Duluth, v.14, p.535-, 1969.

BUTON, T. E.; BAKSI, S. M.; GEORGE, S. M.; FRAZIER, J. M. Abnormal hepatic copper storage in a teleost fish (*Morone americana*). Vet. Pathol., Washington, DC, v.24, n.6, p.515-525, 1987.

BYCZKOWSKA-SMYK, W. Observation of the ultrastructure of the hepatic cell of the Burbot (*Lota lota l.*). Z. Pol. (Zoologica Poloniae), v.18, p.287-297, 1968.

CLARK, G. (ed) Staining procedures. 4. ed. Baltimore: The Willian & Wilkins Company, 1981.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (SP). Análise estatística de resultados de testes de toxicidade aguda. São Paulo, p.1-29, 1990.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (SP). Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos: treinamento prático especializado. São Paulo, 355 p. , 1991.

COPPAGE, D. L. Organophosphate pesticides: specific level of brain ache inhibition related to death in sheepshead minnows. Trans. Am. Fish. Soc., v.101, p.534-, 1972.

CROSS, P. C.; MERCER, K.L. Cell and tissue ultrastructure a functional perspective. New York, W.H. Freeman and Company, 1993.

CULLING, C. F. A.; ALLISON, R. T.; BARR, W. T. Cellular pathology technique. London: Butterworth & Co., 1985.

ELLER, L. L. Histopathological lesions in cutthroat trout *Salmotrout clarki* exposed chronically to the insecticide endrin. Am. J. Pathol., Hagerstown, v.64, p.321-, 1971.

FANTA, E. S. E.; SILVA, H. C.; CIRO, S. M.; POLAK, E. W.; MERLIN, E. Estudo preliminar do efeito de um organofosforado em *Tilapia rendalli* (Pisces, Teleostei). - VI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, Brasília, 1988.

- FRANCO, C. R. C. Estudos Ultraestrutural do Estômago de dois Teleósteos *Hypostomus commersonii* (REIS et al., 1990) e *Rhamdia branneri* (HASEMANN, 1911). Curitiba, 1994. 94p. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas, UFPR.
- GHOSH, T. K. Toxic impact of three organophosphate pesticides on carbohydrate metabolism in freshwater India catfish, *Clarias batrachus*. Proc. Indian Nat. Sci. Acad. Part. B. Biol. Sci., New Delhi, v.53, n.2, p.135-142, 1987.
- GILL, T. S.; PANT, J. C.; PANT, J. Gill, liver and kidney lesions associated with experimental exposures to Carbaryl and Dimethoate in the fish *Puntius conchonius* (Ham.). Bull. Environ. Contam. Toxicol., New York, v.41, n.1, p.71-78, 1988.
- GILL, T. S.; PANDE, J.; TEWARI, H. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide on certain metabolite levels in a freshwater fish, *Puntius conchonius* (Hamilton). Pestic. Biochem. Ohysiol., New York, v.36, n.3, p.290-299, 1990.
- HIBIYA, T. Digestive System - Liver. In: An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. Tokyo: Kodansha Ltd., 1982. p.82-90.
- INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (ITAL). I Seminário de Resíduos de Pesticidas. São Paulo, 1989. 89p.

- JONSSON, C. M. Estudos de toxicidade e acúmulo de Endosulfan nos peixes *Brachydanio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus*. Campinas, 1991, 100 p., Tese (Mestrado), Fac. Eng. de Alimentos, Unicampi-SP.
- KENDALL, M. W. Acute effects of methyl mercury toxicity in channel catfish *Ictalurus punctatus* kidney. Bull. Environ. Contam. Toxicol., New York, v.13, p.570- , 1975.
- KENDALL, M. W. Acute effects of methyl mercury toxicity in channel catfish *Ictalurus punctatus* liver . Bull. Environ. Contam. Toxicol., New York, v.18, p.143- , 1977.
- KOELLE, G. B.; GILMAN, A. Anticholinesterase drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther., Baltimore, v.95, p.166-216, 1949.
- KUMAR, K.; ANSARI, B. A. Malathion toxicity: skeletal deformities in zebrafish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). Pestic. Sci., London, v.15, p.107-111, 1984.
- KUMAR, K.; ANSARI, B. A. Malathion toxicity: effect on the liver of the fish, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). Ecotoxicol. Environ. Safety., Duluth, v.12, p. 199-205, 1986.
- 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., New York, v.20, p.87-91, 1982.

LAALE, H. W. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. J. Fish Biol., v.10, p.121-173, 1977.

LARINI, L. Toxicologia dos Inseticidas. São Paulo, Sarvier 172p., 1979.

LINGARAJA, T.; VENUGOPALAN, V. K. Pesticides induced physiological and behavioural changes in an estuarine teleost *Therapon jarbua* (Forsk). Fish Technol., Cochin, v.15, p.115-119, 1978.

LONE, K. P.; JAVAID, M. Y. Effect of sublethal doses of three organophosphorus insecticides on the haematology of *Channa punctatus* (Bloch). Pakistan J. Zool., Lahore, v.8, n.1, p.77-84, 1976.

MATTHIESSEN, P.; FOX, P. J.; DOUTHWAITE, R.J.; WOOD, A. B. Accumulation of Endosulfan residues in fish and their predators after aerial spraying for the control of Tsetse fly in Botswana. Pestic. Sci., v.13, p.39-48, 1982.

PICKERING, Q. H.; HENDERSON, C.; LEMKE, A. E. The toxicity of organicphosphorus insecticides to different species of warmwater fishes. Trans. Am. Fish Soc., v.91, n.2, p.175-184, 1962.

RAMALINGAM, K. Toxic effects of DDT, malathion and mercury on the tissue carbohydrate metabolism of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) Proc. Indian Acad. Sci. Anim. Sci., Bangalori, v.97, n.5, p.443-448, 1988.

RAND, G. M. The effect of exposure to a subacute concentration of parathion on the general locomotor behavior of the goldfish. Bull. Environ. Contam. Toxicol., New York, v.18, n.2, p.259-266, 1977.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., v.17, p.208-212, 1963.

ROBERTS, R.J. Patologia De Los Peces. Madrid: Ed. Mundi-Prensa, 1981. 366p.

SILVA, H. C. Efeitos subletais do Folícol 600 em *Callichthys callichthys* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Teleostei). Curitiba, 1989. 123p. Tese (Mestrado em Ciências Veterinária) Fac. Medicina Veterinária, UFPR.

SILVA, H. C.; MEDINA, H. S. G.; FANTA, E.; BACILA, M. Sub-lethal effects of the organophosphate Folícol 600 (Methyl Parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei). Comp. Biochem. Physiol., v. 105 c, n.2, p.197-201, 1993.

TAGATZ, M. E. Effect of mirex on predator-prey interaction in an experimental estuarine ecosystem. Trans. Am. Fish Soc., v.105, p.546- , 1976.

TANIKAWA, K. Ultrastructural aspects of the liver and its disorders. Tokyo: Igaku Shoin Ltd., 1968. 238 p.

VERMA, S.R.; BANSAL, S. K.; GUPTA, A.K.; et al.. Bioassay trials with twenty three pesticides to a freshwater teleost. *Saccobranchnus fossilis*. Water Res., v.16, p.525-529, 1982.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol., New York, v.4, p.475-478, 1958.

WEIS, P. Hepatic ultrastructure in two species of normal, fasted and gravid teleost Fishes. Am. J. Anat., Philadelphia, v.133, p.317-332, 1972.

WEIS, P. Ultrastructural changes induced by low concentrations of DDT in the livers of the zebrafish and guppy. Chem. Biol. Interact., v.8, p.25-30, 1974.