

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar-UNESP

CAROLINA FERNANDES DE ANGELIS

EFEITOS DO SURFACTANTE NONILFENOL ETOXILADO EM PEIXES:
FUNÇÃO CARDIORRESPIRATÓRIA E HISTOPATOLOGIA EM
TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*, EM CONDIÇÕES DE
NORMÓXIA E HIPÓXIA AQUÁTICAS

São Carlos
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar-UNESP

CAROLINA FERNANDES DE ANGELIS

EFEITOS DO SURFACTANTE NONILFENOL ETOXILADO EM PEIXES:
FUNÇÃO CARDIORRESPIRATÓRIA E HISTOPATOLOGIA EM
TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*, EM CONDIÇÕES DE
NORMÓXIA E HIPÓXIA AQUÁTICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa Interinstitucional de Pós-graduação
em Ciências Fisiológicas Associação Ampla
UFSCar/UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, área de concentração em
Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin

São Carlos
2017

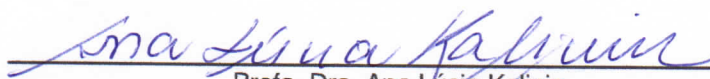


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

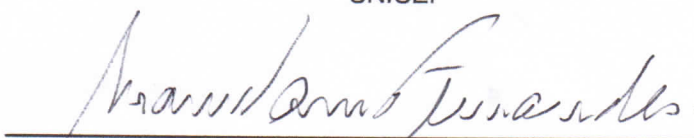
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Carolina Fernandes de Angelis, realizada em 26/01/2018:



Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin
UFSCar



Profa. Dra. Lucia Helena de Aguiar Vieira
UNICEP



Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
UFSCar

Dedico este trabalho especialmente aos meus pais e à minha irmã, por todo o apoio, cuidado e incentivo. E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma (no laboratório, no dia-a-dia ou simplesmente com uma palavra amiga de incentivo).

AGRADECIMENTOS

Ao Verzola e a Profa. Ana Lúcia Kalinin pela oportunidade, conselhos, confiança e apoio.

À Ana Lúcia Kalinin pela orientação, ensinamentos, paciência, compreensão e em especial pela amizade.

Aos meus pais, por todo o apoio, amor e exemplo de como a vida deve ser levada com tranquilidade e por me ensinarem o que é realmente importante.

Às minhas irmãs queridas, Gabi e Mini por todo o carinho, amizade, conselhos e sem as quais não teria feito esse trabalho.

Ao David Mckenzie pelo convívio e por todo o ensinamento e ajuda para o desenvolvimento do presente trabalho.

À Profa. Evelise Nunes Fragoso de Moura pela convivência, confiança e ajuda para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Cléo de Alcantara Leite pelo desenvolvimento de parte dos equipamentos utilizados e pela ajuda no decorrer dos experimentos de respirometria.

À Profa. Marisa Fernandes Narciso pela disponibilidade do uso de diversos equipamentos do seu laboratório.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), em especial ao Gustavo Oda por toda ajuda e amizade.

À Jurity e ao Claudinei do Departamento de Hidrobiologia (DhB) por toda ajuda, paciência e amizade.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) e do DCF, Rafael Z, Nathan, Raquel, Eliton, Rocco, Will, Cynthia, Karina, Nicolas, Polly, Lívia, Marcelo, Dri e Diana pela ajuda durante a rotina de trabalho e pelos agradáveis momentos de descontração.

A todos que apesar de não estarem citados aqui contribuíram para a produção desse trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

O nonilfenol etoxilato (NPE) é um componente tensoativo não iônico de muitas formulações químicas. As investigações sobre os efeitos da toxicidade do nonilfenol etoxilado e seus derivados em peixes enfocam, em sua maioria, a disrupção do sistema endócrino, genotoxicidade, estresse oxidativo, bioacumulação e mortalidade. Entretanto, a exposição a esses compostos pode causar outros danos, sendo o uso de biomarcadores fisiológicos e histológicos de grande relevância, visto que permitem identificar possíveis distúrbios homeostáticos que possam comprometer a sobrevivência desses organismos. O objetivo do presente estudo foi analisar as respostas cardiorrespiratórias e alterações histológicas em tilápia-do-Nilo em situação controle e após 12h de uma injeção intraperitoneal de NPE9 (500 ng.Kg⁻¹ de peso corpóreo) submetidos à hipóxia gradual. A exposição ao NPE9 aumentou significativamente a tensão crítica de O₂ (PcO₂), reduzindo a capacidade de manter a tomada de O₂ constante, o que pode estar relacionado à ação do composto no funcionamento e na estrutura dos eritrócitos. A ventilação branquial (\dot{V}_G) aumentou significativa e progressivamente em ambos os grupos experimentais a fim de manter a tomada de O₂ ($\dot{M}O_2$) durante a hipóxia. Os grupos apresentaram o mesmo padrão de resposta respiratória, sendo que os aumentos de \dot{V}_G foram caracterizados por aumentos no volume ventilatório (V_T), enquanto a frequência respiratória (f_R) se manteve constante. A concentração de NPE9 utilizada não alterou a capacidade de extração de O₂ (EO₂), nem a frequência cardíaca (f_H) nas tensões de O₂ estudada. Além disso, a exposição ao NPE9 induziu o aumento da frequência de centros melanomacrofágicos no fígado e baço e a presença desses no miocárdio ventricular. Em conjunto, os resultados do presente trabalho mostraram que a exposição ao NPE, mesmo de curta duração, pode comprometer a sobrevivência da espécie estudada em ambientes hipóxicos, como também apontam para a necessidade de sua inclusão na legislação que regulamenta limites máximos permitidos de substâncias em ambientes aquáticos para a manutenção da vida.

ABSTRACT

Nonylphenol ethoxylate (NPE) is a nonionic surfactant component of many chemical formulations. Investigations on the effects of nonylphenol ethoxylate toxicity and its derivatives on fish mostly focus on endocrine disruption, genotoxicity, oxidative stress, bioaccumulation and mortality. However, exposure to these compounds can cause further damage, and the use of physiological and histological biomarkers is of great relevance, since it allows the identification of possible homeostatic disorders that may compromise the survival of these organisms. The objective of the present study was to analyze the cardiorespiratory responses and histological changes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in a control situation and after 12h of an intraperitoneal injection of NPE9 (500 ng.kg⁻¹ of body weight) submitted to gradual hypoxia. The exposure to NPE9 significantly increased the critical O₂ tension (PcO₂), reducing the ability to keep the metabolic rate ($\dot{M}O_2$) constant, which may be related to the action of the compound on the functioning and structure of erythrocytes. Gill ventilation (\dot{V}_G) increased significantly and progressively in both experimental groups in order to maintain $\dot{M}O_2$ during graded hypoxia. The groups presented the same pattern of respiratory response, and increases in \dot{V}_G were characterized by increases in ventilatory volume (V_T), while respiratory rate (f_R) remained constant. Although NPE at the concentration used in the present study was not sufficient to change O₂ extraction from the ventilatory current (EO₂) and heart rate (f_H) during hypoxia. In addition, the exposure to NPE9 increased the frequency of melanomacrophagic centers in the liver and spleen, and it was possible to observe them in the ventricular myocardium. Together, the results of this study showed that exposure to NPE9 may compromise the survival of the species studied in hypoxic environments, but also indicate the need to include this compound in the legislation that regulates maximum permissible limits of substances in aquatic environments for the maintenance of life.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química do Nonilfenol.	5
FIGURA 2. Esquema do sistema respiratório de peixes teleósteos.	11
FIGURA 3. Exemplar de tilápia-do-nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	14
FIGURA 4. Localização do eletrodo negativo de ECG e da cânula intraperitonal em <i>Oreochromis niloticus</i>	18
FIGURA 5. Localização das cânulas de polietileno opercular e bucal e eletrodos de ECG em <i>Oreochromis niloticus</i>	19
FIGURA 6. Localização dos eletrodos de ECG na posição ventral em <i>Oreochromis niloticus</i>	19
FIGURA 7. Esquema do respirometro de fluxo intermitente.	19
Figura 8. Ciclo de medição completo de respirometria intermitente.	20
Figura 9. Mudanças no consumo de oxigênio durante um ciclo de medição completo na respirometria intermitente.	20
FIGURA 10. Respirometria de fluxo intermitente.	21
FIGURA 11. Representação de um traçado eletrocardiográfico típico de peixes teleósteos.	23
FIGURA 12. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água sobre o consumo de oxigênio de <i>Oreochromis niloticus</i> do grupo controle basal.	27
FIGURA 13. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água sobre o consumo de oxigênio de <i>Oreochromis niloticus</i> do grupo sham.	27
FIGURA 14. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água sobre o consumo de oxigênio de <i>Oreochromis niloticus</i> do grupo exposto ao NPE.	28
FIGURA 15. Valores médios do consumo de oxigênio de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle basal e exposto ao NPE.	28
FIGURA 16. Valores médios da ventilação branquial de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle basal e exposto ao NPE.	30
FIGURA 17. Valores médios da frequência respiratória de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle basal e exposto ao NPE.	31
FIGURA 18. Valores médios do volume ventilatório de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle basal e exposto ao NPE.	32
FIGURA 19. Valores médios da extração de oxigênio da corrente ventilatória de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle basal e exposto ao NPE.	34
FIGURA 20. Valores médios da frequência cardíaca de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle basal e exposto ao NPE.	35
FIGURA 21. Cortes histológicos de tecido hepático de <i>Oreochromis niloticus</i>	37
FIGURA 22. Análise quantitativa de centros melanomacrofágicos em tecido hepático de <i>Oreochromis niloticus</i>	38
FIGURA 23. Estágios de desenvolvimento dos centros melanomacrofágicos no tecido hepático de <i>Oreochromis niloticus</i> exposto ao NPE9.	39
FIGURA 24. Tecido hepático de <i>Oreochromis niloticus</i> exposto ao NPE9, mostrando centros melanomacrofágicos em diferentes estágios de desenvolvimento.	40
FIGURA 25. Cortes histológicos de tecido esplênico de <i>Oreochromis niloticus</i> experimentais.	41
FIGURA 26. Análise quantitativa de centros melanomacrofágicos em tecido esplênico de <i>Oreochromis niloticus</i>	42

FIGURA 27. Análise quantitativa de centros melanomacrofágicos no tecido renal de <i>Oreochromis niloticus</i>	43
FIGURA 28. Cortes histológicos de tecido renal de <i>Oreochromis niloticus</i> experimentais.....	44
FIGURA 29. Cortes histológicos de tecido cardíaco de <i>Oreochromis niloticus</i> experimentais.	46
FIGURA 30. Representação esquemática das fases de desenvolvimento de centros melanomacrofágicos (CM) em tecidos de peixes (rim, baço, fígado).....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Concentração de NPE e seus derivados em águas de diferentes localidades.	3
TABELA 2. Concentrações de NP e NPE em tecidos de peixes do rio Glatt.	4
TABELA 3. Parâmetros preestabelecidos para a realização das análises morfométricas.	24
TABELA 4. Valores médios do consumo de oxigênio dos grupos experimentais.	26
TABELA 5. Valores de ventilação branquial dos grupos experimentais.	29
TABELA 6. Valores da frequência respiratória dos grupos experimentais.	31
TABELA 7. Valores do volume ventilatório dos grupos controle experimentais.	32
TABELA 8. Valores da extração de O ₂ da corrente ventilatória dos grupos experimentais.	33
TABELA 9. Valores médios da frequência cardíaca dos grupos experimentais.	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Caracterização Química do Nonifenol (NP) e Nonifenol Etoxilado (NPE).....	4
1.2 Vias de Exposição e Metabolismo	5
1.3 Efeitos NPE e Derivados em Peixes	5
1.4 Função Cardiorrespiratória em Peixes	10
1.5 Análises Histológicas	12
1.6 A Espécie <i>Oreochromis niloticus</i>	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Reagentes e Drogas	16
3.2 Animais	16
3.3 Delineamento Experimental.....	16
3.4 Avaliação dos Parâmetros Cardiorrespiratórios	17
3.4.1 Respirometria de Fluxo Intermitente.....	20
3.4.2 Tomadas dos Parâmetros Cardiorrespiratórios.....	22
3.5 Análises Histológicas	23
3.6 Tratamentos Estatísticos dos Dados.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 Respostas Respiratórias de <i>Oreochromis niloticus</i> à Hipóxia Gradual.....	26
4.1.1 Consumo de oxigênio (MO₂) e tensão crítica de oxigênio (P _c O ₂).....	26
4.1.2 Ventilação branquial (VG), Frequência respiratória (f _R) e Volume ventilatório (V _T)	29
4.1.3 Extração de Oxigênio da Corrente Ventilatória (EO ₂).....	33
4.2 Frequência Cardíaca.....	34
4.3 Análises Histológicas	36
4.3.1 Fígado.....	36
4.3.2 Baço.....	40
4.3.3 Rim.....	42
4.3.4 Coração	45
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1 Respostas Respiratórias de <i>Oreochromis niloticus</i> Submetido à Hipóxia Gradual.....	47
5.1.1. Consumo de oxigênio (MO₂) e tensão crítica de O ₂ (P _c O ₂).....	47
5.1.2 Ventilação Branquial (VG), Frequência Respiratória (f _R) e Volume Ventilatório (V _T).	50
5.1.3 Extração de O ₂ da Corrente Ventilatória (EO ₂).....	52
5.2 Frequência Cardíaca de <i>Oreochromis niloticus</i> Submetido à Hipóxia Gradual	53
5.3 Análises Histológicas	54

5.3.1 Fígado.....	56
5.3.2 Baço.....	57
5.3.3 Rim.....	57
5.3.4 Coração	58
5.4 Considerações Finais.....	59
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos se caracterizam por apresentar uma menor capacitância de O₂ em relação ao ambiente aéreo. Nestes ambientes podem ocorrer grandes flutuações diárias ou sazonais de O₂ dissolvido e severas reduções do mesmo, o que é conhecido como hipóxia ambiental (RANDALL et al., 1997). A temperatura, a quantidade de matéria orgânica, e conseqüentemente os baixos níveis de O₂ são limitações frequentes impostas aos peixes. Além disso, a presença de xenobióticos no ambiente aquático contribui para essa redução da disponibilidade de O₂ do meio para os organismos aquáticos.

Os efeitos adversos das atividades humanas sobre o ambiente representam uma grande preocupação, particularmente sobre o ambiente aquático. Este é um dos recursos naturais mais importantes da Terra, que possui múltiplos usos como abastecimento urbano, irrigação agrícola, produção de energia, lazer e recreação, entre outros (FRANCO, 2013). Entretanto, atualmente os corpos hídricos estão passando por uma crescente contaminação, devido à expansão demográfica, o desenvolvimento industrial, agrícola e tecnológico e derrames acidentais. Estudos mostram a presença de diferentes compostos químicos nas águas, o que gera relevantes impactos adversos neste ambiente (LISBOA FILHO, 2012).

Hoje em dia, já se sabe que existem aproximadamente 11 milhões de compostos químicos conhecidos (SODRÉ, 2012). Dentre estes, 3.000 são produzidos em larga escala e usados livremente e apenas 45% foram avaliados toxicologicamente, sendo que menos de 10% foram submetidos a estudos sobre os seus efeitos tóxicos em organismos (SODRÉ, 2012). Os poluentes de origem antropogênica estão amplamente dispersos no ambiente, em águas superficiais e subterrâneas.

Contaminantes ou poluentes “emergentes” são substâncias potencialmente tóxicas das quais os efeitos ou a presença no ambiente são ainda pouco conhecidos. Desta forma, os contaminantes emergentes não estão incluídos em programas de monitoramento de rotina pelos órgãos de meio ambiente e saúde, e tampouco estão inseridos em normativas ou legislações de controle ambiental. Como pode ser observado por esta definição, o termo “emergente” se refere à preocupação que estas substâncias têm trazido à luz dos novos conhecimentos adquiridos sobre seus impactos reais e potenciais à saúde humana e ambiental. Ou seja, engloba tanto substâncias que já vêm sendo utilizadas há tempos, como também novas substâncias decorrentes dos avanços tecnológicos. Tais contaminantes atingem o ambiente devido a emissões industriais, eliminação de resíduos sólidos, derrames acidentais, aplicação controlada na agricultura e atividades industriais, entre outras formas (BRAVO,

2009). Diante disto, os contaminantes ambientais estão despertando, cada vez mais, o interesse da comunidade científica e regulatória (DA SILVA et al., 2007).

Dentre os contaminantes emergentes, destacam-se os agrotóxicos, drogas ilícitas, fármacos, produtos de higiene pessoal, protetores solares, estrogênios, alguns subprodutos provenientes de processos de desinfecção de água, retardantes de chama bromados, compostos perfluorados, siloxanos, benzotriazóis, ácidos naftênicos, perclorados, líquidos iônicos, dioxinas, antimônio, adoçantes e sucralose, nanomateriais, toxinas de algas e alquilfenóis e seus derivados. (RICHARDSON; TERNES, 2011).

De acordo com FRANCO (2013), dentre estes compostos, os alquilfenóis e seus derivados apresentam certa relevância, principalmente, o nonilfenol etoxilado (NPE), pois a sua utilização resulta em grande contaminação de corpos hídricos, em consequência da formação de produtos intermediários da sua biodegradação, como o nonilfenol (NP). Este último é considerado o mais persistente e crítico ao ambiente, visto que pode agir como um interferente endócrino e agente genotóxico, como também se bioacumular e biomagnificar nas cadeias tróficas.

Tanto o NPE quanto o NP já foram detectados em águas, solo, ar, sedimento e biota aquática. Alguns estudos já evidenciaram a ocorrência de NPE e seus intermediários em água e sedimentos nos Estados Unidos, Europa, Japão, Canadá (NAYLOR et al. 1996; AHEL; GIGER; SCHAFFNER, 1994; KANNAN et al., 2003; DI CORCIA et al., 2000; MARUYAMA et al., 2000; YING, 2006). A Tabela 1 mostra alguns valores de concentração de NP em águas superficiais de diferentes países.

No Brasil, há poucos estudos sobre a ocorrência de nonilfenol etoxilado e seus derivados no ambiente. MOURA (2009) estudou a bacia hidrográfica Tietê-Jacaré (UGRHI-13), SP, e detectou a presença de 267 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de NP em amostras de efluente da estação de tratamento de esgoto (ETE) e 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em amostras da estação de tratamento de águas (ETA). RAIMUNDO (2007) detectou NP na concentração de 218 ng.L^{-1} nas águas do rio Atibaia, região metropolitana de Campinas que recebe esgoto doméstico não tratado. FRANCO (2013) encontrou NP nas concentrações de 20 e 35,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em diferentes pontos de amostragem de águas superficiais no Ribeirão das Cruzes (UGRHI-13), Araraquara, SP. BERALDO (2012) relatou a presença de NP em águas próximas a indústrias na cidade de Americana, SP, em concentrações variando de 5,0 a 10,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em águas superficiais.

Além disto, não há restrição de uso tanto para o NPE quanto para o NP no Brasil. A resolução 357 do CONAMA, de 2005, classifica os corpos d'água e estabelece padrões de lançamento de efluentes, mas não recomenda concentrações limites para NPE e NP, visto que a toxicidade destes compostos não foi ainda discutida pelos órgãos fiscalizadores (SILVA et al.,

2008). De acordo com VINCENT e SNEDDON (2009), a Agência de Proteção Ambiental Americana (Environmental Protection Agency - EPA) considera que, para ambientes de água doce, a vida aquática não é afetada pelo nonilfenol se desde que numa concentração média que não exceda $28 \mu\text{g.L}^{-1}$.

TABELA 1. Concentração de NPE e seus derivados em águas de diferentes localidades.

Localidade	Concentração (ng.L^{-1})	Autor
China	10,2 - 162	(CAI et al., 2016)
	nd - 2200	
Índia	22,4 - 158	(SELVARAJ et al., 2014)
	nd - 1455	
China	280,19	(JIANG et al., 2011)
Portugal	4,90 - 19,2	(CARVALHO et al., 2015)
	469,4 \pm 73,4	
China	694 \pm 248,7	(SUN et al., 2014)
	244 \pm 230,8	
Espanha	938 - 1342,5	(ESTEBAN et al., 2014)
	734 - 926	
Alemanha	164	(HÖHNE; PÜTTMANN, 2008)
	155	
França	168	(CAILLEAUD et al., 2007)
Brasil	44 - 1918	(MOREIRA et al., 2011)

nd – não detectado

AHEL, MCEVOY & GIGER (1993) analisaram a concentração de NP e NPE nas águas do rio Glatt, localizado em um vale densamente povoado no norte da Suíça, bem como a concentração desses compostos em diversos tecidos de peixes. Na água, encontraram valores médios de $5,5 \pm 0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ de NP e $9,6 \pm 2,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de NPE. A tabela 2 apresenta as concentrações de NP e NPE encontradas em tecidos de peixes por estes autores. Com base nesses valores, os autores calcularam fatores de bioacumulação de 13-408 para o NP e de 3-300 para o NPE em peixes. Além disso, a ocorrência de bioacumulação indica que tais produtos podem atingir o ser humano.

TABELA 2. Concentrações de NP e NPE em tecidos de peixes do rio Glatt.

Espécie	Concentração – mg.Kg ⁻¹		
	Tecido	NP	NPE
<i>Squalius cephalus</i>	Músculo	0,18	0,18
	Intestino	1,2	0,87
	Fígado	1,0	1,8
	Brânquias	1,4	1,6
<i>Barbus barbus</i>	Músculo	0,38	3,1
	Intestino	0,05	0,17
	Fígado	0,98	0,88
	Brânquias	< 0,03	0,06
	Coração	0,30	0,15
	Ovário	0,09	0,15
<i>Salmo gairdneri</i>	Músculo	0,15	0,42
<i>(Oncorhynchus mykiss)</i>	Intestino	1,6	7,0

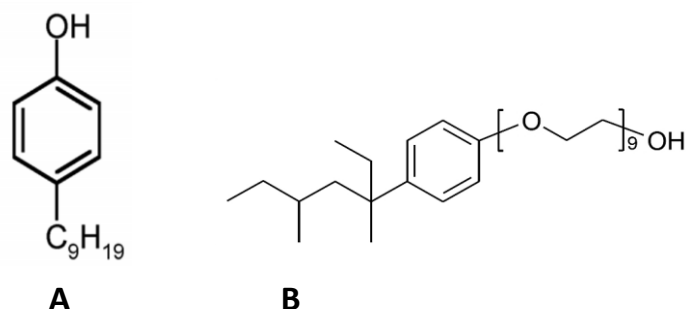
Fonte: AHEL, MCEVOY & GIGER (1993).

1.1 Caracterização Química do Nonifenol (NP) e Nonifenol Etoxilado (NPE)

O nonilfenol (Figura 1A) é um líquido amarelo claro para pálido, viscoso à temperatura ambiente, com moderada solubilidade em água e pressão de vapor. O nonilfenol etoxilado (NPE) pode ser um líquido oleoso de claro para alaranjado ou uma cera sólida, considerado quimicamente estável e não reativo (EPA, 2010).

O NPE (Figura 1B) é fabricado pela reação do NP com óxido de etileno (EO), sob condições básicas. O grau de etoxilação depende da relação molar entre o EO e o NP. O NPE é hidrófilo numa extremidade da molécula e hidrofóbico na extremidade oposta, atrai substâncias pouco solúveis, tais como óleos e graxas (EPA, 2010).

FIGURA 1. Estrutura química do Nonilfenol.



A. Nonilfenol; B. Nonilfenol com 9 cadeias etoxiladas. Fonte: WHO (2002); EPA (2010).

1.2 Vias de Exposição e Metabolismo

O nonilfenol pode entrar no organismo humano por inalação, ingestão de alimentos e água contaminados ou por via cutânea, pelo contato ou produtos que contenham-no (AWARD, 2011).

Quando os animais ingerem NP a absorção ocorre a partir do trato gastrointestinal, sendo inicialmente rápida. As principais vias metabólicas provavelmente envolvem a conjugação de glicuronídeo e sulfato. O NP é amplamente distribuído por todo o corpo, com a concentração mais elevada em gordura e as principais vias de excreção de NP são através das fezes e urina (WHO, 2002).

No ambiente, os NPEs de cadeia longa se biodegradam de forma relativamente rápida em relação aos de cadeia curta e NP, que são muito mais resistentes à degradação adicional. De acordo com MANN; BODDY (2000), a completa degradação em água ocorre após 33 dias.

Quando na água, o NPE também pode sofrer fotodegradação induzida. Na atmosfera, o NP é rapidamente degradado por radicais hidroxilas e não se espera que seja persistente no ar (WHO, 2002).

1.3 Efeitos NPE e Derivados em Peixes

Os estudos sobre alguns efeitos do NP e NPE em peixes ainda são escassos. Contudo, já foi demonstrado que estas substâncias podem atuar como disruptores endócrinos nesses animais.

LEWIS e LECH (1996) investigaram *in vivo* a atividade estrogênica, letalidade e persistência dos efeitos do NP em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), por meio da análise

da reação da transcrição reversa de RNAm de vitelogenina no fígado. Para tanto, os exemplares de truta arco-íris foram expostos a diferentes concentrações de NP (10 a 250 ppb) durante 72 horas. A análise de RT-PCR detectou baixos níveis de RNAm de vitelogenina induzido pelo NP no fígado. Em apenas um dia de exposição foi observado a indução da síntese de vitelogenina. Outro resultado observado, que pode estar relacionado com a depuração do NP, foi o decréscimo substancial do nível de vitelogenina, em apenas 48 horas, logo após a transferência dos exemplares expostos para um sistema de água limpa.

PEDERSEN et al. (1999) analisaram os efeitos do NP na síntese de vitelogenina, na estrutura testicular e citológica em machos de peixe-carneiro Europeu (*Zoarces viviparus*), por meio de injeções intraperitoneais de NP, sob concentrações baixas ($10 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{semana}^{-1}$) e altas ($100 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{semana}^{-1}$), administradas em meias doses, duas vezes por semana durante 25 dias. Nesse experimento foram realizadas análises da estrutura testicular, da cor e da quantidade de espermatozoides produzidos, como também do tamanho dos testículos (índice gonadossomático, IGS) e do fígado (índice hepatossomático, IHS). A partir disto, observaram o aumento da concentração de vitelogenina no plasma, concomitante à redução de IGS, enquanto que não foram verificadas mudanças significantes no IHS. Outro resultado foi à confirmação de que o NP mimetiza os efeitos de estradiol na síntese de vitelogenina, agindo como tal, isto suporta as observações previstas sobre o efeito de NP em outros teleósteos, como na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (JOBILING; SUMPTER, 1993), no salmão do Atlântico, *Salmo salar* (MADSEN et al. 1997) e no linguado, *Platichthys flesus* (CHRISTENSEN et al. 1995). Além disto, por meio de análises histológicas, observaram que altas concentrações de NP afetaram o crescimento e a estrutura testicular nos lóbulos seminíferos e nas células de Sertoli.

CIONNA et al. (2006) analisaram, por meio de RT-PCR, biomarcadores em tainha-garrento (*Liza aurata*) juvenis expostos a diferentes concentrações de NP (25, 100, 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) durante uma semana. Foram analisadas a expressão de vitelogenina (VTG) hepática, os níveis de proteínas plasmáticas assim como a transcrição do citocromo P4501A1 (CYP1A1) e a sua associação com a atividade de etoxiresorufina-O-desetilase (EROD). Além disto, investigaram a expressão de VTG e CYP1A1 em machos adultos expostos a concentração de 250 mg.Kg^{-1} por meio de injeções intraperitoneais. Em seguida, os indivíduos foram eutanasiados depois de 48 e 72 horas após as diferentes exposições e as fêmeas foram usadas como controle positivo. Os autores verificaram redução da atividade da EROD, que está diretamente relacionada com a dose de NP. Entretanto, não houve mudança significativa na expressão de vitelogenina em nenhum dos tratamentos. Diante da inibição de CYP1A1 e da redução da potência de desintoxicação celular por estrogênios, os autores sugeriram que a

sobrevivência dos organismos que vivem em áreas contaminadas pode ser seriamente comprometida por estrógenos ambientais, como NP.

RIVERO (2007) determinaram a CL_{50} de 72h (concentração letal para 50% dos indivíduos) e avaliaram, por meio de ensaios cometa, os efeitos na reprodução causados pelo NP e a genotoxicidade em eritrócitos periféricos de exemplares de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposto *in vivo*. Este estudo sobre o desenvolvimento reprodutivo foi realizado em gônadas de ambos os sexos expostas a diferentes concentrações (1,0, 10,0 e 16 $\mu\text{L.L}^{-1}$) de NP diluído em água. Os autores encontraram uma CL_{50} de 0.032 mL.L^{-1} de NP e observaram que nos tratamentos com 10 e 16 $\mu\text{L.L}^{-1}$ ocorreu um aumento significativo no número total de anomalias nucleares em relação à dose mais baixa (1 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e ao controle. Observaram, também, a maturação acelerada das gônadas, tanto de machos como de fêmeas, expostos nas concentrações 1 e 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$, em comparação ao grupo controle. Já o tratamento com 16 $\mu\text{L.L}^{-1}$ causou um nível mais expressivo de maturação, principalmente de oócitos no estágio V, maior indução de vitelogenina e desenvolvimento precoce de espermatozoides. Diante disto, este estudo demonstrou que o NP induz alterações nas gônadas, especialmente nas femininas, sugerindo assim que este composto atua mimetizando hormônios sexuais.

COLDHAM et al. (1998) administraram 0,375 mg.L^{-1} de 4-NP em exemplares de trutas arco-íris (*O. mykiss*), por meio de vasos caudais, e investigaram a influência da biotransformação, distribuição e da excreção de 4-NP em diferentes tecidos (fígado, rim, cérebro, ceco pilórico, intestino, pele, músculo, coração, baço, gônadas e brânquias), no sangue, na bile e nas excretas após 1, 2, 4, 24, 48, 72, e 144 horas. Por meio de cintilação líquida verificaram que as maiores concentrações de resíduos de 4-NP apareceram na bile, fezes e no ceco pilórico. Por meio de cromatografia líquida de alta pressão observaram perfis semelhantes de metabólitos de 4-NP na bile, nas fezes e no ceco pilórico, mas no músculo, só encontraram o composto de origem (4-NP). Dentre os resultados encontrados houve uma descoberta inesperada: o músculo fornece um depósito substancial para o 4-NP devido à facilidade de acumulação contínua nos músculos esqueléticos, o que pode estar associado à exposição crônica.

ALI e LEGLER (2011) analisaram os efeitos toxicológicos do NP em embriões de zebrafish (*Danio rerio*) expostos a diferentes concentrações (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 mM) durante os seis primeiros dias do desenvolvimento celular. A partir disto, observaram a sobrevivência, alterações morfológicas, desenvolvimento de anormalidades e *endpoints* toxicológicos/letais, como: coagulação, desaparecimento de somitos, descolamento caudal e movimentação espontânea. Não foram observados efeitos tóxicos/letais nos indivíduos expostos às concentrações de 0,1; 0,3 e 1 mM por 24 horas. Entretanto, efeitos tóxicos não

letais foram observados nas concentrações de 10 e 30 mM, como formação de edema cardíaco e no saco vitelínico. A concentração de 100 mM foi considerada tóxica, visto que nas primeiras 3 horas de exposição houve a suspensão do desenvolvimento embrionário no estágio da gastrulação. Após 6 dias de exposição, observaram que nas menores concentrações (0,1; 0,3 e 1 mM) as larvas quase completaram totalmente a morfogênese, mas alterações como descompasso no crescimento e na natação, saco vitelínico estendido para ambas as direções e claramente vazio, ação inflamatória na bexiga natatória e protuberância labial foram observadas. Já na concentração de 10 mM, observaram uma alteração na curvatura da notocorda, menor atividade cardíaca e um desenvolvimento tardio da nadadeira caudal. Nas concentrações de 30 e 100 mM, houve maior incidência de mortalidade para indivíduos expostos. Diante disto, este estudo confirma a ação do NP como composto tóxico causador de má formação morfológica interna e de mortalidade.

ABDULLA BIN-DOHAISH (2012) avaliou as alterações patológicas no tecido hepático, como também a bioacumulação no fígado e nos músculos de exemplares de tilápia Sabaki, *Oreochromis spilurs*, expostos por um longo período (durante o início da vida e no período de maturidade sexual) ao NP. O método utilizado dividiu os indivíduos em dois grupos de larvas, sendo o primeiro subdividido em três grupos: controle e expostos a $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $30 \mu\text{g.L}^{-1}$. Já o segundo grupo foi subdividido em dois grupos: expostos a $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $30 \mu\text{g.L}^{-1}$. Com os resultados observou que tanto as larvas quanto as mães expostas às diferentes concentrações de NP (15 e $30 \mu\text{g.L}^{-1}$) mostraram um aumento no acúmulo desta substância no fígado e nos músculos em comparação ao grupo controle, apresentando perturbação no tecido hepático, com lise, perda de núcleos, necrose, sendo mais marcantes estas características em tecidos expostos a $30 \mu\text{g.L}^{-1}$. Desta forma, o fígado foi considerado o principal órgão de bioacumulação, devido ao seu papel no armazenamento, detoxificação e regulamentação de todos os processos metabólicos. Já com a análise histológica dos indivíduos expostos a diferentes doses de NP, observaram alterações graves e variáveis, que estão diretamente relacionadas com o aumento da exposição.

BURKHARDT-HOLM et al. (2000) demonstraram os efeitos tóxicos na pele de truta arco-íris (*O. mykiss*) expostos a 10mg.L^{-1} de 4-NP durante 10 dias, sendo observado danos no padrão de granulação das células mucosas da pele, o que deve estar relacionado às propriedades bioquímicas do NP verificadas por PÄRT et al. (1985).

CARRASCHI et al. (2012) estimaram a CL_{50} (concentração letal para 50% dos indivíduos testados) para 96 h de exposição de guarus (*Phalloceros caudimaculatus*) ao surfactante Fixade® (à base de NPE), nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg.L^{-1} , para avaliar a qualidade da água, o risco ambiental e os sinais de intoxicação. A qualidade da água

não foi alterada pela presença do surfactante, permanecendo dentro dos parâmetros iniciais recomendados pela ABNT (2004) para testes de toxicidade. A CL_{50} 96h foi de 4,06 mg.L⁻¹. Os sinais de intoxicação analisados foram: batimento opercular, busca por oxigênio, natação errática e posição na coluna de água em 0, 4, 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição ao surfactante. Após o início da exposição, os animais apresentaram agitação, aumento do batimento opercular, natação errática e comportamento letárgico, como também mortalidade durante todo o período experimental.

De acordo com HOFER et al. (1995), surfactantes aniônicos como o Fixade[®] causam hiperplasia epitelial e aumentam a distância interlamelar, dificultando a difusão do oxigênio, o que resulta em estresse respiratório e falha osmorregulatória, elucidando assim a toxicidade do composto. Segundo LEWIS e LECH (1996), a alteração da frequência de batimentos operculares provoca acúmulo de muco na superfície do epitélio branquial, prejudicando a difusão dos gases.

MIDHILA e CHITRA (2015) analisaram a hepatotoxicidade do NP em tilápia-de-Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) expondo os animais a uma concentração sub-letal (0,15 mg.L⁻¹) durante 24 h, 96 h e 7 dias. Apenas no tratamento de 7 dias causou redução significativa nos pesos do fígado e no índice hepatossomático. Entretanto, diminuição nas atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) já aconteceram após 24 e 96h, enquanto que após sete dias houve um aumento das atividades dessas enzimas em relação ao grupo controle. Observaram também o aumento do nível de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica (LPO) nos tratamentos de 24h e 96h e redução da atividade da fosfatase alcalina após 96h de exposição, indicando assim a diminuição do estado de transporte inter e intracelular da membrana, o que está relacionado com a toxicidade de NP a exposição aguda. Além disso, houve redução do número de hepatócitos, necrose hepatocelular e aumento da vacuolização citoplasmática após sete dias de exposição, respostas histopatológicas comumente observadas em peixes expostos a poluentes aquáticos e ocasionadas pelo estresse químico, o que pode estar relacionado com o acúmulo de glicogênio nos hepatócitos. Em conjunto, esses resultados mostraram que a exposição aguda ao NP induz a geração de radicais livres (pela peroxidação lipídica nos tecidos do fígado) e o desequilíbrio pró-oxidante e antioxidante no tecido hepático.

Apesar dos trabalhos descritos demonstrarem que o nonilfenol (NP) e nonilfenol etoxilado (NPE) são substâncias tóxicas que causam efeitos adversos ou deletérios em peixes, tanto a partir da exposição aguda como crônica, sendo que a desregulação endócrina (incluindo indução da síntese de vitelogenina, redução do índice gonadossomático, mimetização dos efeitos de estradiol e interferência no crescimento e amadurecimento de

gônadas), genotoxicidade, bioacumulação em diferentes tecidos (principalmente no fígado e nos músculos) e estresse oxidativo foram os principais sinais de intoxicação aguda, como também induziu a formação de protuberância labial e alterações na natação. Além disso, concentrações relativamente baixas de 17-3000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de NPE e seus derivados podem causar a morte de peixes (VAZQUEZ-DUHALT et al., 2005).

Não há estudos avaliando os efeitos do NP e NPE sobre as funções respiratória (taxa metabólica, ventilação, frequência e volume respiratórios e extração de O_2 da corrente ventilatória) e cardíaca *in vivo* de peixes. Ademais, não há estudos sobre os efeitos de exposições de curta duração a esses compostos.

Por tudo o que foi anteriormente exposto, fica claro que o uso do nonilfenol etoxilado e seus derivados resultam em grande contaminação de corpos hídricos, ocasionando efeitos deletérios ao ambiente e aos organismos que ali vivem, e os estudos já mencionados evidenciam a toxicidade desses compostos sobre os peixes. Entretanto os estudos com esses bioindicadores em um curto período de intoxicação ainda são escassos.

Biomarcadores fisiológicos e histológicos compreendem as respostas biológicas correspondentes a uma exposição, efeito ou suscetibilidade dos indivíduos a agentes químicos e/ou estressores ambientais. Sendo assim, permitem a identificação de possíveis distúrbios homeostáticos que possam comprometer a sobrevivência dos organismos e os possíveis efeitos dos poluentes. Dessa forma, o uso desses biomarcadores no estudo da toxicidade do nonilfenol etoxilado em um curto período de intoxicação é de grande relevância, podendo contribuir para futuros programas regulatórios e de monitoramento, sendo essa uma ferramenta fundamental de avaliação do estado de preservação e do grau de degradação dos ecossistemas, visto que fornece subsídios para elucidar estratégias de conservação de áreas naturais e de recuperação dos ecossistemas degradados.

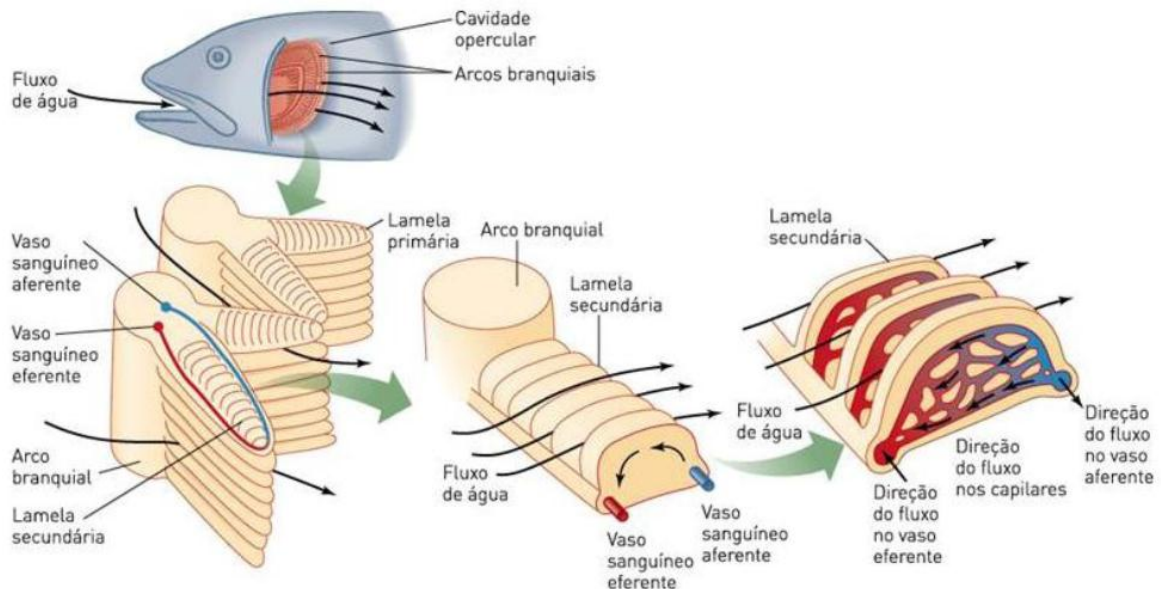
1.4 Função Cardiorrespiratória em Peixes

A respiração em peixes é limitada pelas propriedades físicas e químicas da água, principalmente a baixa solubilidade de O_2 e a alta viscosidade do meio (DEJOURS, 1981).

Os peixes apresentam um mecanismo de ventilação unidirecional do meio externo sobre as brânquias, principal órgão de trocas gasosas destes animais. As brânquias consistem geralmente de quatro arcos branquiais que se estendem em duas fileiras de filamentos, os quais possuem várias lamelas secundárias, estruturas enfileiradas responsáveis pelas trocas gasosas (NILSSON; SUNDIN, 1998). Além disso, há um sistema de difusão em contracorrente, em que a água flui de forma unidirecional, devido ao bombeamento ativo

realizado pela musculatura esquelética das cavidades bucal e operculares, entre as lamelas em uma direção, e o fluxo sanguíneo em direção oposta, como mostra a Figura 2.

FIGURA 2. Esquema do sistema respiratório de peixes teleósteos.



Fonte: MOYSES; SCHULTE (2010).

De acordo com HUGHES (1973), a tensão de O_2 decresce gradativamente desde o momento em que é captado pelas brânquias até sua utilização na célula, evento chamado “cascata de oxigênio”. As principais barreiras à difusão são as membranas branquiais, a circulação sanguínea e as membranas celulares dos tecidos que receberão de O_2 (GALIS; BAREL, 1980; FERNANDES; RANTIN, 1989). Diante disto, um aumento na resistência à difusão do O_2 relacionado à um desses pontos pode causar um efeito hipóxico, com isso qualquer substância que possa causar hipóxia ambiental pode reduzir a quantidade de O_2 disponível às mitocôndrias e, conseqüentemente, comprometer os processos aeróbicos (ANELLI Jr, 2010).

O coração de peixes teleósteos é composto por quatro câmaras em série: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso. O seio venoso recebe o sangue venoso vindo da circulação sistêmica e é responsável pelo início e controle dos batimentos cardíacos, visto que é o sítio do tecido marcapasso especializado, o nodo sinoatrial. O átrio é uma ampla câmara muscular de parede fina, geradora de uma pressão suficiente para encher apenas o ventrículo, sendo essa última a principal câmara geradora de pressão do coração. O bulbo arterioso é composto por tecido conjuntivo elástico, colágeno e uma pequena quantidade de células musculares

lisas, podendo assim garantir um fluxo contínuo de sangue para as lamelas secundárias branquiais durante o ciclo cardíaco.

O trabalho eficiente do coração dos peixes teleósteos depende da ativação sequencial das quatro câmaras que o constituem, impulsionando o sangue venoso desoxigenado para a circulação branquial, onde ocorrem as trocas gasosas e, posteriormente, para o leito vascular sistêmico (FERNANDES; MORON, 2014).

1.5 Análises Histológicas

A histologia e a histopatologia em estudos de toxicidade são ferramentas importantes de biomonitoramento (MEYERS; HENDRICKS, 1985).

As alterações histológicas são biomarcadores de efeito após a exposição a estressores ambientais, revelando alterações na função fisiológica e bioquímica (HINTON et al., 1992). De acordo com BERNET et al. (1999) a histopatologia é o estudo de lesões ou anormalidades nos níveis celular e tecidual, sendo assim considerada uma ferramenta útil para avaliar o grau de poluição, particularmente para efeitos subletais e crônicos. As técnicas histopatológicas são úteis na identificação dos órgãos-alvo e dos mecanismos de ação, sendo o conhecimento dos processos patológicos e toxicológicos importante no controle dos poluentes aquáticos (COOMBS et al., 2011).

Nos peixes, os estudos histopatológicos são direcionados para diferentes órgãos, destacando-se o fígado, responsável pelo metabolismo de substâncias tóxicas e que pode sofrer alterações estrutural e metabólica mediante a exposição de poluentes, alimentação, toxinas, parasitos e microrganismos (ARELLANO et al., 1999; GERNHÖFER et al., 2001; FANTA et al., 2003; AU, 2004; BOMBONATO et al., 2007). De acordo com WESTER e ROGHAIR (1994), alguns efeitos observados nos organismos podem alterar toda a dinâmica da população, particularmente aqueles que afetam o metabolismo energético, o crescimento e a reprodução, o que podem não ser revelados por estudos toxicológicos clássicos, que monitoram a mortalidade, o crescimento e a condição geral dos indivíduos (COOMBS et al., 2011).

Dentre as alterações histológicas em peixes, anfíbios e algumas espécies de répteis há um tipo celular peculiar que os distingue entre os demais vertebrados, as células melanomacrofágicas (AGIUS; ROBERTS, 2003; RIBEIRO et al., 2011; CRAWSHAW; WEINKLE, 2000). Estas células são macrófagos semelhantes aos encontrados em outros vertebrados, dotados de pigmentos (melanina, lipofuscina, ceróides e hemossiderina) (AGIUS; ROBERTS, 2003; CRAWSHAW; WEINKLE, 2000). As células

melanomacrofágicas apresentam como funções a destruição, desintoxicação e reciclagem de hemácias (PASSANTINO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2011), e podem ser encontrados em quantidade variável em diferentes órgãos como: fígado, baço e rim (MESSEGUER et al., 1994).

Estudos já relataram um aumento na frequência dos agregados melanomacrofágicos, conhecidos também como centros de melanomacrófagos (CM), após a exposição a contaminantes e a agentes infecciosos, tais como vírus, bactérias e parasitas (AGIUS; ROBERTS, 2003; PASSANTINO et al., 2014; RIBELIN et al., 1975; ROBERTS, 1972). A análise e quantificação de grânulos pode ser um ótimo indicador das principais atividades metabólicas por macrófagos desses centros (DIAZ-SATIZABAL; MAGOR, 2015; RIBEIRO et al., 2011). Além disso, a presença, o número e a área dos centros de melanomacrófagos foram utilizados como parâmetros biológicos em estudos de toxicologia e impacto ambiental (RABITTO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2011).

Estudos com nonilfenol (NP) e seus derivados têm demonstrado os efeitos histológicos em algumas espécies de peixes (AHEL; GIGER; SCHAFFNER, 1994; LEWIS; LECH, 1996; JOBLING et al., 1996; PEDERSEN et al., 1999; YOKOTA et al., 2001; KANG et al., 2003; SEKI et al., 2003; RAZIA et al., 2006).

Diante disso, a fauna íctica pode ser considerada um potente instrumento para a avaliação do risco toxicológico e, o uso de biomarcadores histopatológicos, como a quantificação da frequência dos centros de melanomacrófagos que pode fornecer dados fundamentais na avaliação do impacto do nonilfenol etoxilado a organismos e ao ambiente.

1.6 A Espécie *Oreochromis niloticus*

As tilápias são originárias da África, Israel e Jordânia, amplamente distribuídas a partir da década de 1960, sendo produzidas em climas tropical e subtropical (MORO et al., 2013).

O grupo das tilápias compreende várias espécies dos gêneros *Oreochromis* e *Tilapia*, entretanto, aproximadamente 80% das tilápias produzidas no mundo são da espécie *Oreochromis niloticus* (TREWAVAS, 1983; MORO et al., 2013).

A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Figura 3) apresenta hábito alimentar principalmente fitoplânctófago, mas aceita facilmente outros alimentos, sendo considerada apropriada à piscicultura.

Na década de 1970, *O. niloticus* foi introduzida no Brasil na região Nordeste pelo Departamento de Obras Contra a Seca – DNOCS/Fortaleza, CE, provenientes da Costa do Marfim (DELAVECHIA, 1994). A partir disso, e devido a excelente qualidade da carne, o

que favorece a aceitação pelo mercado consumidor, o fácil cultivo, a esportividade na pesca, a alta taxa de reprodução e a resistência às variações climáticas, possibilitaram o aumento do cultivo e da comercialização da devida espécie. De acordo com OLIVEIRA et al. (2007), na atualidade, a tilápia é considerada a segunda espécie mais cultivada no mundo e a primeira no Brasil, podendo assim se transformar em uma atividade econômica tão importante como a avicultura, a suinocultura e a bovinocultura (<http://www.emparn.m.gov.br>).

FIGURA 3. Exemplar de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*.



Fonte: <http://revistapesca.com.br/invasao-de-tilapia-do-nilo-ameaca-peixes-no-igarape-da-fortaleza-no-ap> (2016).

Diante disto, os fatores determinantes na escolha desta espécie como objeto de estudo foram a sua importância econômica no mercado pesqueiro nacional e internacional, sendo assim informações sobre a sua fisiologia adaptativa poderão contribuir para o seu manejo em piscicultura. Além disso, a fácil adaptação a condições de laboratório e a grande adaptabilidade a condições abióticas adversas, tais como disponibilidade de oxigênio dissolvido, temperatura, pH, tornam a tilápia-do-Nilo um modelo ideal para estudos envolvendo as adaptações fisiológicas ao ambiente. Ademais, a vasta bibliografia disponível sobre a espécie, visto que é relativamente bem estudada, permite uma melhor compreensão de seus processos fisiológicos e adaptativos e a comparação a outras espécies.

Segundo TREWAVAS (1983), a tilápia-do-Nilo ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Subclasse: ACTINOPTERYGII

Superordem: TELEOSTEI

Ordem: PERCIFORMES

Família: CICHLIDAE

Genêro: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos causados por exposição ao nonilfenol etoxilado (NPE9) nas respostas cardiorrespiratorias de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), bem como possíveis alterações histológicas decorrentes desta exposição.

Para tanto, avaliou-se:

- Os efeitos do nonilfenol etoxilado (NPE9) sobre os parâmetros cardiorrespiratórios *in vivo* de tilápia-do-Nilo em condições normóxicas e durante a hipóxia gradual, determinados por meio de respirometria de fluxo intermitente, sendo analisados:
 - a. Consumo de O_2 ($\dot{M}O_2$) e tensão crítica de O_2 (P_cO_2);
 - b. Ventilação branquial – \dot{V}_G ; frequência respiratória – f_R ; volume ventilatório – V_T ; extração de O_2 da corrente ventilatória – EO_2 ;
 - c. Frequência cardíaca (f_H), determinada por meio de eletrocardiografia padrão.
- As possíveis alterações histológicas nos tecidos hepático, esplênico, renal e cardíaco causadas pela exposição ao nonilfenol etoxilado (NPE9).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos de anestesia, experimentação e eutanásia deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais UFSCar (CEUA - Aprovação N° 6671240715).

3.1 Reagentes e Drogas

No presente trabalho, utilizou-se o nonilfenol com nove cadeias etoxiladas Tergitol NPE9[®] (Sigma, CAS n°: 127087-87-0).

As demais drogas e reagentes foram adquiridos pela Sigma, Synth e Reagen.

3.2 Animais

Foram utilizados, no presente estudo, 30 exemplares de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Wt = 174,2 ± 38 g) de ambos os sexos, adquiridos na piscicultura Santa Cândida, município de Santa Cruz da Conceição (Estado de São Paulo).

Após a coleta, os peixes foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde foram mantidos em tanques com capacidade de 1000 L, dotados de recirculação de água aerada e termostaticada (25 ± 1 °C), por um período mínimo de 30 dias para aclimação às condições laboratoriais.

Durante o período de aclimação, os animais foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes. A alimentação foi suspensa 48h antes do início dos experimentos.

3.3 Delineamento Experimental

Após o período de aclimação, os exemplares de *O. niloticus* foram divididos em dois grupos: grupo controle basal (Ctrl, n = 10) e grupo exposto ao nonilfenol etoxilado (NPE9, n = 10).

Para a exposição ao NPE9, a concentração de 500 ng.Kg⁻¹ de peso corpóreo foi escolhida tendo como base uma média de concentrações de nonilfenol etoxilado e seus derivados (500 ng.L⁻¹), encontradas em águas ao redor do mundo, como mostrado na Tabela 1. O método de exposição ao NPE por meio de injeções intraperitoneais baseou-se no trabalho

de (PEDERSEN et al., 1999), que analisou as alterações endócrinas sobre o efeito de NP em machos de peixe-carneiro Europeu (*Zoarcetes viviparus*). Além disso, a CL50 de NP para *O. niloticus* de 0,032 mL.L⁻¹, determinada por RIVERO (2008), também serviu como base para a escolha de uma concentração subletal de NPE.

Previamente aos experimentos (48h), o grupo NPE9 recebeu uma injeção intraperitoneal de NPE (Figura 4). A injeção consistiu de 0,4 mL de solução salina a 0,9% contendo NPE9 na concentração de 500 ng.Kg⁻¹ de peso corpóreo. As concentrações de NPE foram obtidas de uma solução estoque preparada em álcool absoluto a 500 µL⁻¹.mL. Para avaliar possíveis efeitos deste procedimento cirúrgico bem como das injeções *per se*, um grupo sham (n = 10) recebeu uma injeção de 0,4 mL de solução salina a 0,9% contendo álcool absoluto na concentração 500 ng.Kg⁻¹ de peso corpóreo. Após as injeções, esperou-se um período de 12h para serem realizadas as medidas dos parâmetros respiratórios e cardíacos e análise histológica.

Os indivíduos do grupo controle (Ctrl) não foram submetidos ao procedimento de injeção intraperitoneal.

3.4 Avaliação dos Parâmetros Cardiorrespiratórios

Para as análises cardiorrespiratórias, 10 exemplares de *O. niloticus* foram divididos em dois grupos: grupo controle basal (Ctrl, n = 5) e o grupo exposto ao NPE (NPE9, n = 5).

As preparações empregadas para a obtenção dos parâmetros respiratórios e dos eletrocardiogramas (ECG) para análise da frequência cardíaca dos peixes de todos os grupos experimentais foram baseadas na metodologia utilizada por (MONTEIRO et al. 2013), conforme descrito a seguir.

As cirurgias foram precedidas de anestesia em um banho de benzocaína a 0,1% (1g:10L de água) por aproximadamente 5 minutos ou até a cessação da atividade espontânea. Imediatamente após a anestesia, os animais foram transferidos para uma mesa cirúrgica, e suas brânquias foram ventiladas artificialmente com uma solução de benzocaína (1g diluída em dez litros de água) onde se procedeu a implantação, com flange e cola de secagem rápida (Super Bonder[®]), dos cateteres de polietileno para o monitoramento das tensões de O₂ da água inspirada e expirada e sutura de eletrodos de eletrocardiografia para o registro da atividade cardíaca, como mostrado na Figura 5.

Um cateter de polietileno (PE 60) foi introduzido no interior da cavidade bucal, através de orifício aberto dorsalmente com o auxílio de uma broca, para o registro da frequência respiratória (f_R – inspirações.min⁻¹). A parte distal do cleitro opercular direito

também recebeu um cateter (PE 60) para a medida das tensões de O₂ da água expirada (PeO₂ - % de O₂) pelo peixe (Figura 4).

Para a obtenção da frequência cardíaca (f_H - bpm) através de registros de ECG, dois eletrodos de aço inoxidável foram inseridos na musculatura corpórea: o positivo, posicionado ventralmente entre as brânquias e o coração; e o negativo, em posição ventro-caudal próximo às nadadeiras pélvicas, ambos suturados com pontos cirúrgicos à musculatura corpórea para evitar seu deslocamento (Figura 6).

Adicionalmente, os grupos NPE9 e sham receberam uma cânula de polietileno (PE 10) na cavidade intraperitoneal para as injeções descritas no item 3.3. As cânulas foram suturadas à musculatura corpórea com pontos cirúrgicos para evitar seu deslocamento.

Imediatamente após a cirurgia acima descrita, os peixes de todos os grupos experimentais foram introduzidos no respirômetro de fluxo intermitente (Figura 7) e transferidos para a câmara experimental, permanecendo por 48h em condições normóxicas, a 26 °C. Após esse período, necessário para a recuperação da anestesia e restabelecimento das condições metabólicas basais, as medidas dos parâmetros cardiorrespiratórios do grupo Ctrl foram realizadas. Já para os grupos NPE9 e sham, as injeções descritas em 3.3 foram aplicadas após as 48h e esperou-se mais 12h para o início da tomada dos parâmetros cardiorrespiratórios.

FIGURA 4. Localização do eletrodo negativo de ECG e da cânula intraperitoneal em *Oreochromis niloticus*.



FIGURA 5. Localização das cânulas de polietileno opercular e bucal e eletrodos de ECG em *Oreochromis niloticus*.

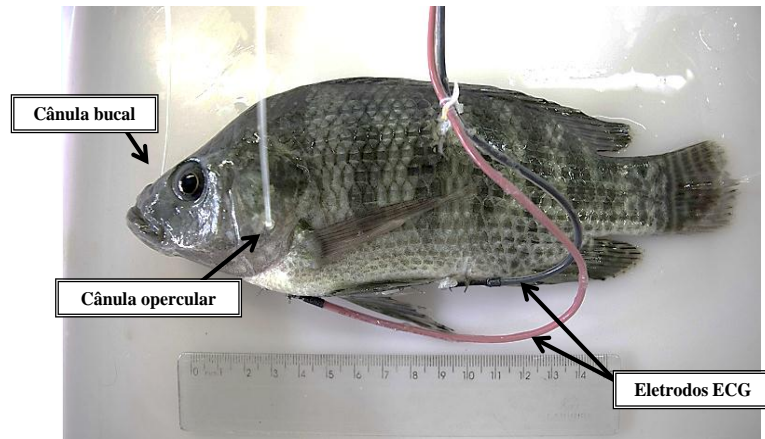


FIGURA 6. Localização dos eletrodos de ECG na posição ventral em *Oreochromis niloticus*.

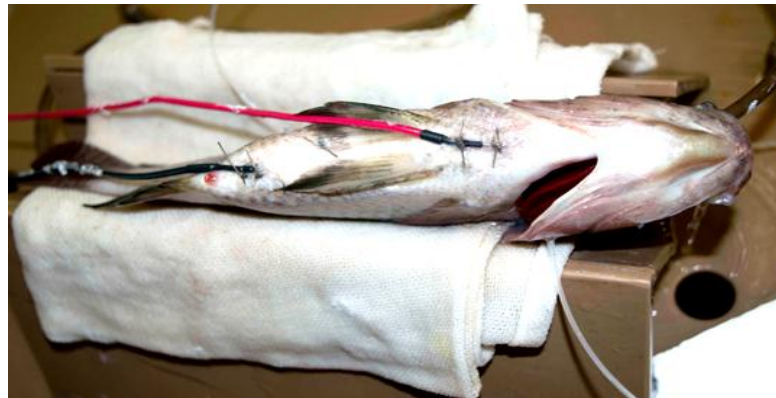
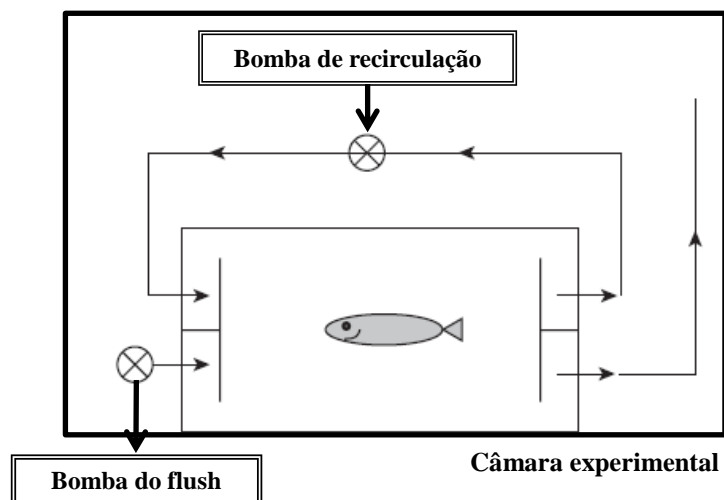


FIGURA 7. Esquema do respirometro de fluxo intermitente.



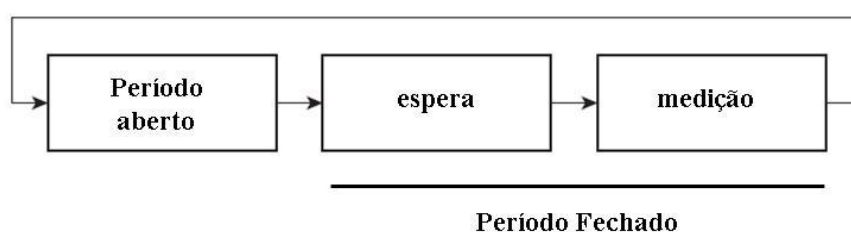
As setas indicam a direção do fluxo de água. Fonte Adaptada: (SVENDSEN et al., 2016).

3.4.1 Respirometria de Fluxo Intermitente

O consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$) em organismos aquáticos pode ser medido por meio de diferentes métodos, como por respirometria de fluxo intermitente que emprega as melhores características da respirometria fechada e de fluxo constante (SVENDSEN, et al. 2016).

Diante disso, a metodologia deste sistema experimental se fundamenta em períodos intercalados de tempo aberto e fechado (espera e medição - Figura 8). Durante o período aberto, em que a bomba de descarga (flush) está ligada, a água do respirometro é renovada, evitando hipóxia e o acúmulo de metabólitos (ROSEWARNE; WILSON; SVENDSEN, 2016).

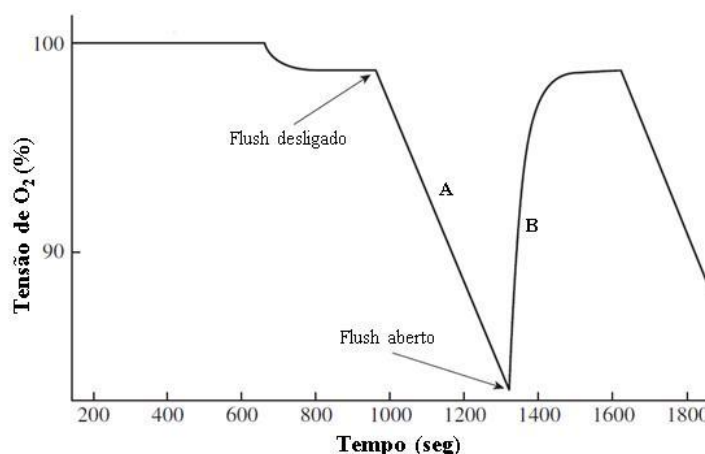
Figura 8. Ciclo de medição completo de respirometria intermitente.



As setas indicam a sequência das etapas do ciclo de medição. Adaptado de SVENDSEN, et al. 2016.

Já no período fechado, a bomba de descarga está desligada, espera-se por um curto período, para que a água do respirometro seja totalmente renovada, e assim realizar a medição do consumo de oxigênio de forma linear, como mostra a figura 9 (SVENDSEN et al. , 2016).

Figura 9. Mudanças no consumo de oxigênio durante um ciclo de medição completo na respirometria intermitente.

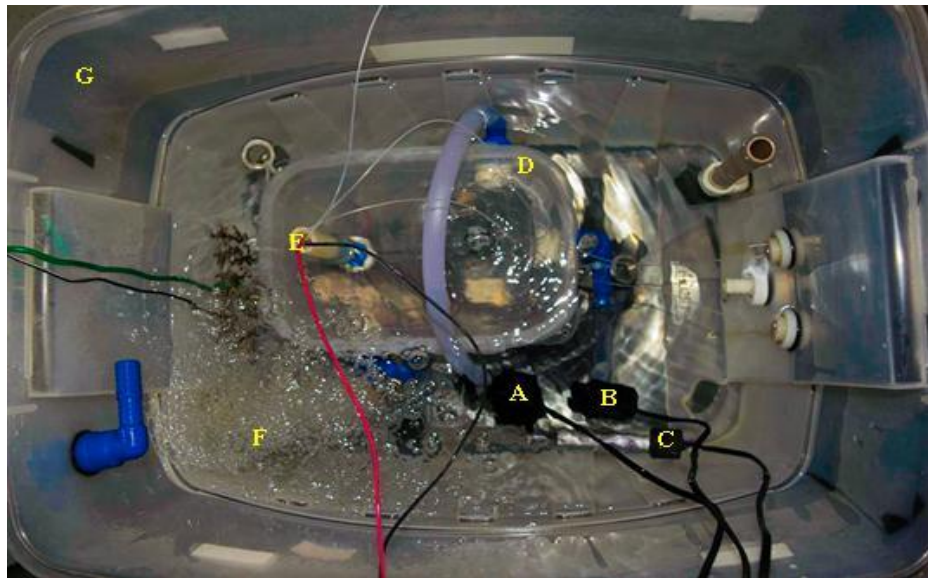


Consumo de oxigênio. A. declínio linear dos níveis de oxigênio no respirometro, B. aumento exponencial dos níveis de oxigênio no respirometro. Adaptado de SVENDSEN, et al. 2016.

A montagem compreende um respirometro conectado através de tubos a duas bombas submersíveis: uma garante a mistura da água (RODGERS et al., 2016) e a outra possibilita a recirculação da água. Além disso, um canal de sonda de oxigênio está conectado a uma unidade de controle central e a um computador, automatizando a operação e o registro do consumo de oxigênio dentro do respirometro durante as fases de medição (SVENDSEN, 2016).

Dessa forma, a respirometria de fluxo intermitente consiste de uma série de declínios lineares do consumo de oxigênio, sem o acúmulo de produtos de resíduos, que pode influenciar os resultados.

FIGURA 10. Respirometria de fluxo intermitente.



Respirometro de fluxo intermitente. A. bomba de recirculação, B. bomba de descarga (flush), C. termostato, D. respirometro, E. distribuição de cânulas e eletrodos, F. aeração, G. câmara experimental.

3.4.2 Tomadas dos Parâmetros Cardiorrespiratórios

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se um animal de cada vez, e após o período de recuperação, as medidas e registros dos parâmetros acima citados foram realizados em um período de 5 horas.

As tensões de O₂ (% de O₂) da água inspirada (P_iO₂), expirada (P_eO₂) pelos peixes, bem como as tensões de O₂ da água foram continuamente monitoradas, por meio de canais da sonda OXY-4 mini PreSens - Alemanha.

Para analisar a resposta do animal frente à hipóxia, a temperatura experimental foi mantida constante (26 °C) por meio de um termostato localizado no interior da câmara experimental e os experimentos foram conduzidos em normóxia (100 % de O₂) e nas seguintes tensões de O₂ hipóxicas: 70, 50, 30, 20 e 10 % de O₂, obtidas borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de N₂ e ar no interior da câmara experimental.

Após a estabilização, cada tensão de O₂ foi mantida por um período mínimo de 15 minutos antes de serem efetuados os registros dos parâmetros acima citados, esse procedimento foi efetuado, em média, dentro de 10 minutos.

O consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$ - mMolO₂.kg⁻¹.h⁻¹) em cada uma das tensões de O₂ experimentais foi determinada por meio de um dos canais da sonda posicionado dentro do respirômetro e calculada por meio da equação proposta por (SVENDSEN et al., 2016):

$$\dot{M}O_2 = [\beta O_2 \cdot V_{RE} \cdot W_0^{-1} \cdot (\frac{\delta pO_2}{\delta t})] \quad , \text{ em que:}$$

$$(\frac{\delta pO_2}{\delta t}) = \text{declive de O}_2 \text{ pelo tempo (\% de O}_2 \cdot \text{h}^{-1})$$

βO_2 = coeficiente de solubilidade do O₂ na água (mg de O₂.L⁻¹);

V_{RE} = volume do respirômetro (L);

W_0^{-1} = peso do animal (kg).

A tensão crítica de O₂ (P_cO₂), definida como a tensão de O₂ na qual o peixe perde a capacidade de manter a $\dot{M}O_2$ constante foi determinada graficamente.

Para a determinação da ventilação branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹) foi empregado o princípio de Fick (1870). Tal método, associa medições simultâneas das tensões de O₂ da água inspirada (P_iO₂) e expirada (P_eO₂) pelos peixes e a taxa de consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$). A \dot{V}_G foi calculada de por meio da equação de Fick:

$$\dot{V}_G = [\dot{M}O_2 / (P_iO_2 - P_eO_2)]$$

Para as medidas de frequência (f_R) respiratória o cateter de polietileno inserido na boca do peixe foi conectado ao transdutor de pressão que envia o sinal para um sistema computadorizado de aquisição de dados (ADInstruments – PowerLab). A f_R foi obtida por meio da contagem do número de ciclos respiratórios por unidade de tempo em cada tensão experimental e seus valores foram expressos em ciclos respiratórios.min⁻¹.

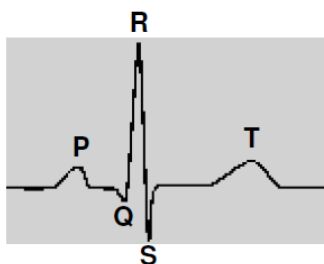
O volume ventilatório, ou volume corrente (V_T - mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹) foi calculado pelo quociente entre a ventilação branquial (\dot{V}_G) e a respectiva frequência respiratória.

A extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂ - %) pelas brânquias foi calculada a partir da equação:

$$EO_2 = (P_iO_2 - P_eO_2)/P_iO_2 \cdot 100$$

Além dos eletrodos positivo e negativo, um terceiro eletrodo, de referência, foi posicionado no interior da câmara experimental, sendo todos conectados ao bio-amplificador que envia o sinal para um sistema computadorizado de aquisição de dados (ADInstruments – PowerLab). Esta preparação possibilita a obtenção de registros similares àqueles observados na derivação DI da eletrocardiografia padrão, sendo assim um traçado de ECG típico de peixes teleósteos é mostrado na Figura 8. Como descrito para os parâmetros respiratórios, a f_H foi registrada após o período de recuperação.

FIGURA 11. Representação de um traçado eletrocardiográfico típico de peixes teleósteos.



Onda P (despolarização atrial), complexo QRS (despolarização ventricular) e onda T (repolarização ventricular).

3.5 Análises Histológicas

Para as análises histológicas, 10 exemplares de *O. niloticus* foram divididos em dois grupos: grupo controle basal (Ctrl, n = 5) e o grupo exposto ao NPE (NPE9, n = 5).

Imediatamente após as preparações descritas no item 3.3, os peixes de cada grupo foram transferidos para uma câmara experimental (100 Litros), permanecendo por 12h em condições normóxicas, a 26 °C.

Após esse período, os peixes de cada grupo experimental foram submetidos aos mesmos protocolos de hipóxia gradual descritos no item 3.4, ou seja, permaneceram em normóxia (100 % de O₂) e nas tensões de O₂ hipóxicas de 70, 50, 30, 20 e 10 % de O₂, obtidas borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de N₂ e ar no interior da câmara experimental.

Ao final de cada protocolo experimental, os animais foram eutanasiados com benzocaína 0,1% (1g:10L) e dissecados para a coleta das seguintes estruturas para análise histológica: coração, baço, fígado e rim. Imediatamente após a coleta, as amostras foram fixadas em Formalina neutra tamponada a 10 % (por 24 horas), lavadas em água por uma hora e conservadas em álcool a 70 % para posterior processamento histológico.

As amostras de tecidos foram submetidas ao processamento histológico padrão para preparação de lâminas histológicas permanentes, com inclusão em parafina histológica.

Após a inclusão, foi realizada a microtomia (Micrótomo rotativo semi-automático HM340E - Microm), obtendo-se cortes histológicos de 5 µm de espessura que foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Para as análises, foram utilizados os 5 indivíduos de cada grupo (Ctrl, Sham e NPE9), sendo avaliadas as lâminas histológicas por indivíduo em microscopia de luz (Microscópio Leica - M1000). As lâminas de fígado, baço, rim e coração foram fotodocumentadas pelo Microscópio Biológico.

Para verificar a frequência de centros de melanomacrófagos (µm²) nos grupos estudados, foram realizadas contagens desses centros nas lâminas histológicas fotodocumentadas de fígado, baço e rim mediante parâmetros preestabelecidos (Tabela 3) e do software Image Pro-Plus 6.0.

TABELA 3. Parâmetros preestabelecidos para a realização das análises morfométricas.

	Padronização para contagem das células melanomacrófágicas
Nº de indivíduos	5
Nº de campos por lâmina	2
Nº total de campos analisados	10
Objetiva óptica	10x
Campo de visão	maior área tecidual

Fonte: Adaptada de (SALLA, 2014).

3.6 Tratamentos Estatísticos dos Dados

Os valores dos parâmetros cardiorrespiratórios estão apresentados como médias \pm D.P. Foram consideradas diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância. Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados no presente estudo: Análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas para verificar a existência de possíveis variações significativas nas determinadas tensões de O₂ entre os diferentes tratamentos. O Teste t não pareado foi realizado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre as tensões de cada tratamento.

Da mesma forma, a quantificação dos centros melanomacrofágicos é apresentada como valores médios \pm D.P e os mesmos procedimentos estatísticos foram utilizados para verificar a existência de possíveis variações significativas entre os diferentes tratamentos para os órgãos analisados.

4. RESULTADOS

4.1 Respostas Respiratórias de *Oreochromis niloticus* à Hipóxia Gradual

4.1.1 Consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$) e tensão crítica de oxigênio (P_cO_2)

Os animais estudados sobreviveram ao período de experimento e não foi observada diferença marcante no comportamento desses.

O consumo de O_2 ou a taxa metabólica ($\dot{M}O_2$ - $mMolO_2.kg^{-1}.h^{-1}$) foi medida em normóxia e durante hipóxia gradual e seus valores médios para todos os tratamentos podem ser vistos na Tabela 4 e suas representações gráficas nas Figuras de 12 a 15.

A $\dot{M}O_2$ dos animais do grupo controle (Ctrl) mantiveram-se constantes até a tensão de 20 % de O_2 , com valores médios de $2,08 \pm 0,18 mMolO_2.kg^{-1}.h^{-1}$. Apenas durante a menor tensão de O_2 (10 %) é que foi observada uma redução significativa nos valores da $\dot{M}O_2$, atingindo $1,70 \pm 0,15 mMolO_2.kg^{-1}.h^{-1}$. A $\dot{M}O_2$ do NPE9 manteve-se constante, com valores médios de $2,48 \pm 0,15 mMolO_2.kg^{-1}.h^{-1}$, nas tensões de O_2 de 100 até 70 %. A partir da tensão de 50 % de O_2 a $\dot{M}O_2$ reduziu-se significativamente ($2,17 \pm 0,04 mMolO_2.kg^{-1}.h^{-1}$).

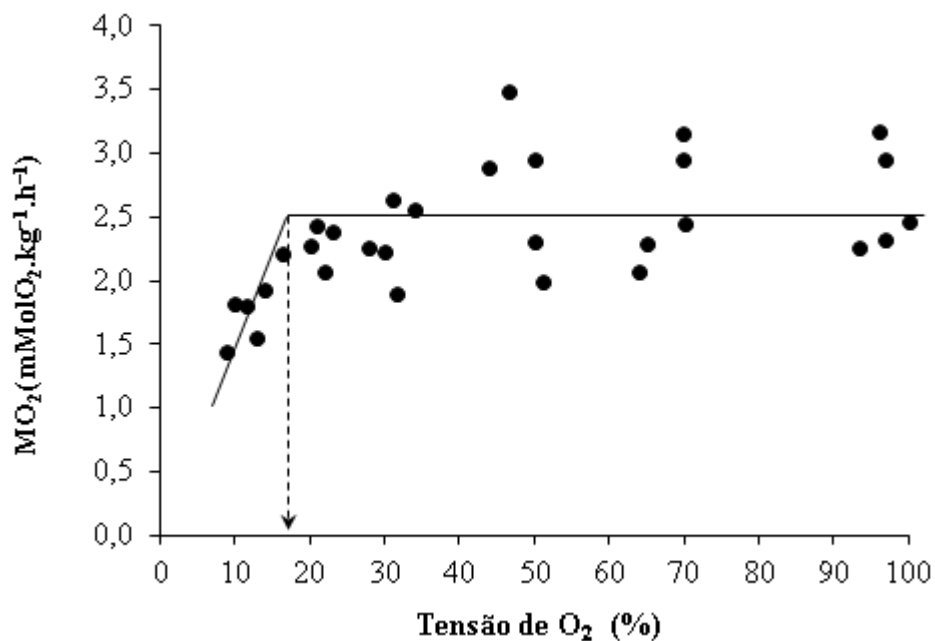
A tensão crítica de O_2 (P_cO_2) foi calculada pela intersecção das retas de regressão (obtidas pelo método descrito por RANTIN et al. 1992). A P_cO_2 dos grupos Ctrl e Sham foi de ~16 % de O_2 (~23 mmHg) para ambos e de ~50 % de O_2 (71 mmHg) para o grupo NPE9 (Figuras 9 a 11). A comparação dos valores médios de $\dot{M}O_2$ dos grupos experimentais é apresentada na Figura 12.

TABELA 4. Valores médios do consumo de oxigênio dos grupos experimentais.

[O ₂] (% de O ₂)	$\dot{M}O_2$ (mMol/Kg/h)		
	Ctrl	Sham	NPE9
100	2,30 ± 0,31	2,55 ± 0,20	2,69 ± 0,21
70	2,30 ± 0,27	2,38 ± 0,19	2,28 ± 0,09
50	2,41 ± 0,36	2,35 ± 0,19	2,17 ± 0,04
30	2,08 ± 0,19	2,19 ± 0,14	2,18 ± 0,09
20	2,08 ± 0,18	2,04 ± 0,17	2,10 ± 0,08
10	1,70 ± 0,15	1,57 ± 0,12	1,68 ± 0,09

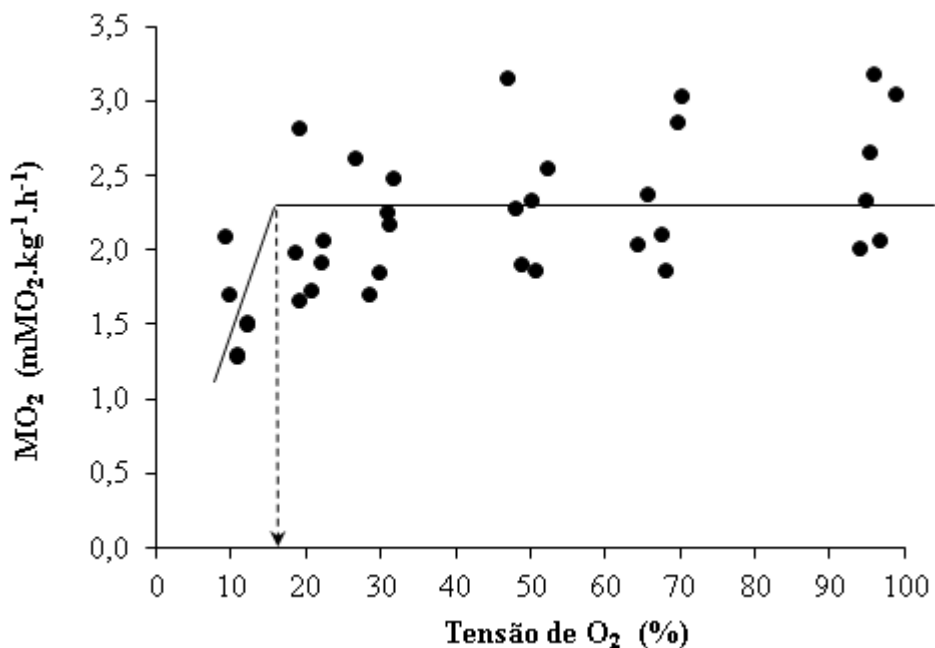
Consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$ - $mMolO_2.kg^{-1}.h^{-1}$) de *O. niloticus* dos grupos controle (Ctrl - n = 5) e sham (Sham - n = 5) e grupo exposto (NPE9 - n = 5), submetidos a diferentes tensões de O_2 na água. Valores médios ± 1 D.P. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores em normóxia.

FIGURA 12. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água sobre o consumo de oxigênio de *Oreochromis niloticus* do grupo controle basal.



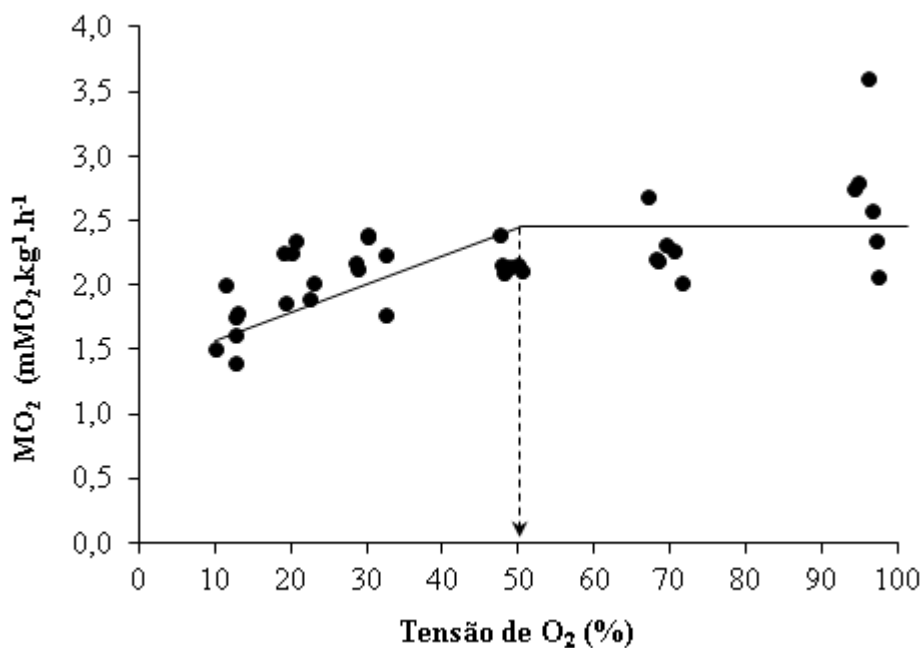
Consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$ - mMolO₂.kg⁻¹.h⁻¹). A seta representa a tensão crítica de O₂ (P_cO₂).

FIGURA 13. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água sobre o consumo de oxigênio de *Oreochromis niloticus* do grupo sham.



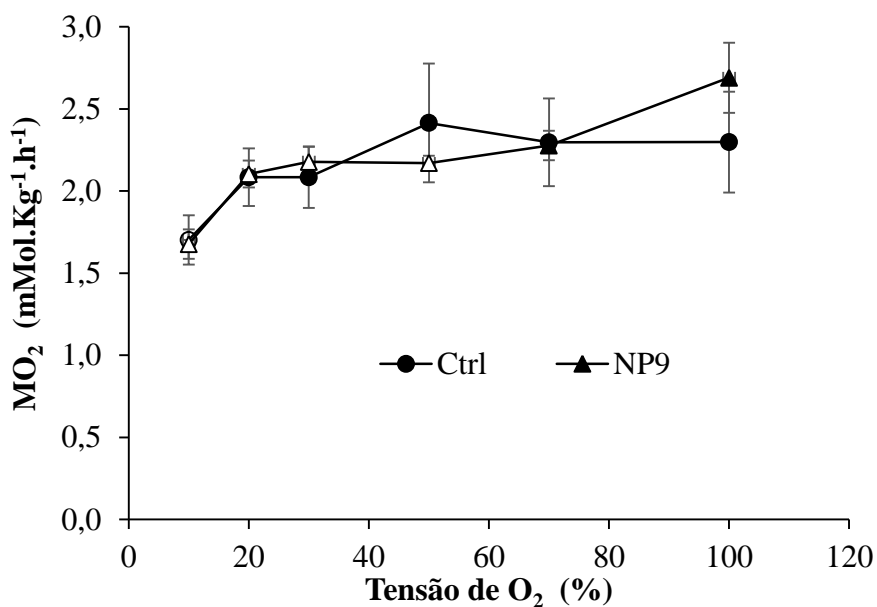
Consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$ - mMolO₂.kg⁻¹.h⁻¹). A seta representa a tensão crítica de O₂ (P_cO₂).

FIGURA 14. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água sobre o consumo de oxigênio de *Oreochromis niloticus* do grupo exposto ao NPE.



Consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$ - mMOlO₂.kg⁻¹.h⁻¹). A seta representa a tensão crítica de O₂ (P_cO₂).

FIGURA 15. Valores médios do consumo de oxigênio de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle basal e exposto ao NPE.



Consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$ - mMolO₂.kg⁻¹.h⁻¹). Ctrl – grupo controle basal e NPE9 – grupo exposto ao nonilfenol etoxilado. Valores médios ± DP. Símbolos em branco representam diferença significativa em relação aos valores de normóxia.

Por não haver diferença significativa entre os resultados obtidos para os grupos Ctrl e Sham, o que também foi observado na análise histológica, esses indivíduos foram agrupados como controle (Ctrl).

4.1.2 Ventilação branquial (\dot{V}_G), Frequência respiratória (f_R) e Volume ventilatório (V_T)

Os valores médios da ventilação branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹), da frequência respiratória (ciclos respiratórios.min⁻¹) e do volume ventilatório (V_T - mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹) dos exemplares de *O. niloticus* dos grupos controles (Ctrl e NPE9) e normóxia e hipóxia gradual estão apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7 e representados graficamente nas Figuras 16, 17 e 18.

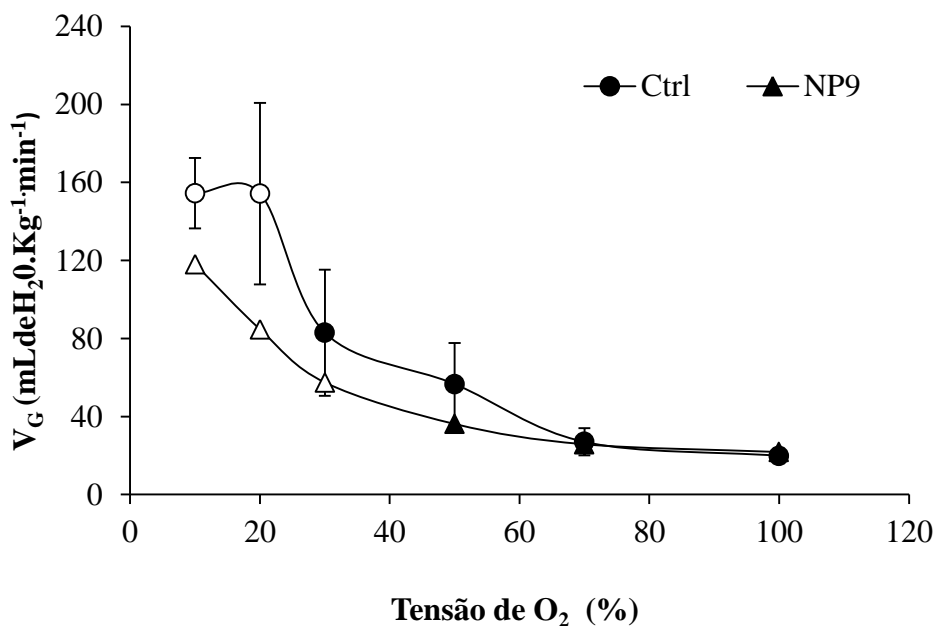
Os valores de \dot{V}_G do grupo Ctrl foram aumentando progressivamente desde a normóxia até a tensão de 20 % de O₂, a partir da qual, houve um aumento significativo comparado às tensões de 100 e 70 % de O₂. O maior valor de \dot{V}_G foi registrado na tensão de 10 % de O₂ (154,46 ± 18,06 mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹). No grupo NPE9, a \dot{V}_G foi mantida constante desde a normóxia até a tensão de 50 % de O₂, a partir da qual aumentos graduais e significativos foram registrados, sendo o maior valor registrado, de 118,10 ± 12,12 mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹ na tensão de 10 % O₂. Durante a normóxia, a frequência respiratória (f_R) do grupo Ctrl foi de 58,43 ± 5,90 ciclos respiratórios.min⁻¹, enquanto que na tensão de 10 % de O₂ foi de 73,37 ± 6,45 ciclos respiratórios.min⁻¹, não havendo mudança significativa entre as tensões de O₂.

TABELA 5. Valores de ventilação branquial dos grupos experimentais.

[O ₂] (% de O ₂)	\dot{V}_G - mLH ₂ O.kg ⁻¹ .min ⁻¹	
	Ctrl	NPE9
100	19,87 ± 2,50	21,79 ± 4,15
70	27,00 ± 6,97	25,77 ± 5,78
50	56,62 ± 21,08	36,18 ± 7,14
30	82,96 ± 32,39	57,46 ± 8,53
20	154,30 ± 46,54	84,70 ± 12,78
10	154,46 ± 18,08	118,10 ± 12,12

Ventilação branquial (\dot{V}_G - mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹) *O. niloticus* dos grupos controle (Ctrl - n = 5) e exposto (NPE9 - n =5) submetidos a diferentes tensões de O₂ na água. Valores médios ± 1 D.P. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores em normóxia.

FIGURA 16. Valores médios da ventilação branquial de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle basal e exposto ao NPE.



Ventilação branquial (\dot{V}_G – mLH₂O.kg⁻¹.min⁻¹) Ctrl – grupo controle basal e NPE9 – grupo exposto ao nonilfenol etoxilado. Valores médios \pm DP. Símbolos em branco representam diferença significativa em relação aos valores de normóxia.

A f_R dos peixes do grupo NPE9 também não sofreram alterações significativas entre as tensões de O₂, sendo a frequência respiratória em normóxia de $56,02 \pm 5,54$ ciclos respiratórios.min⁻¹, e na tensão de 10 % de O₂ foi de $76,84 \pm 3,27$ ciclos respiratórios.min⁻¹, não havendo mudança significativa entre as tensões de O₂.

A gradativa diminuição da tensão de O₂ da água provocou um aumento significativo do volume ventilatório (V_T) do grupo controle (Ctrl) somente a partir de 20 % de O₂. O valor de V_T observado em normóxia foi de $0,34 \pm 0,02$ mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹. Durante a tensão de 10 % de O₂, o V_T atingiu o valor de $2,19 \pm 0,19$ mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹, valor esse 6,4 vezes maior que o obtido em normóxia.

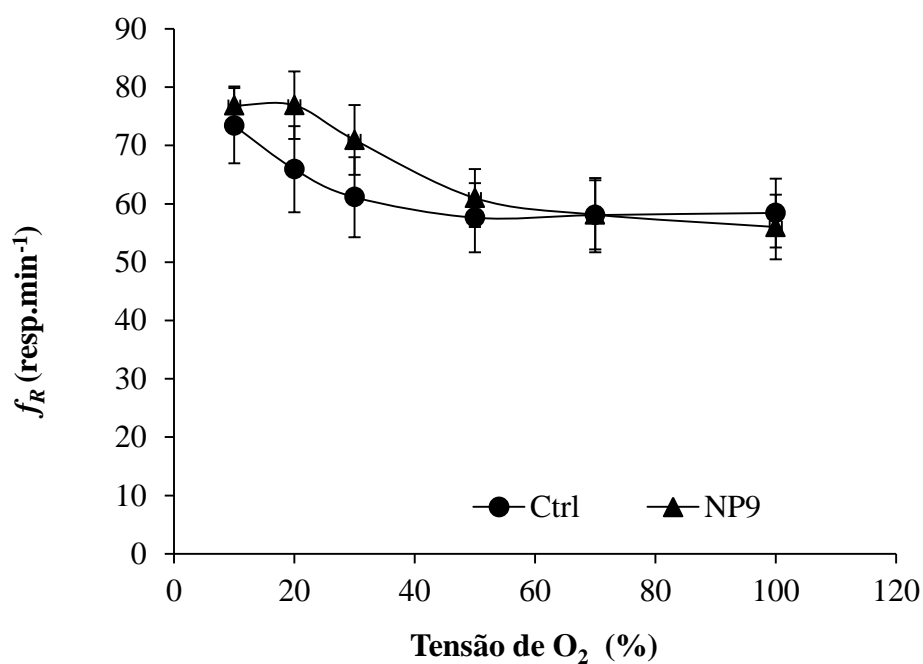
No grupo exposto (NPE9) houve um aumento progressivo dos valores de V_T dentre as tensões, mas somente a partir da tensão de 20 % de O₂ houve um aumento significativo. O valor de V_T registrado em normóxia foi de $0,39 \pm 0,06$ mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹ e durante a tensão de 10 % de O₂ foi de $1,55 \pm 0,15$ mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹, sendo esse valor apenas 4,0 vezes maior ao obtido em normóxia. Diferenças significativas entre os tratamentos (Ctrl e NPE9) só foram observadas na tensão de 20 % de O₂, sendo que os valores do grupo Ctrl foram significativamente superiores ao do grupo NPE9.

TABELA 6. Valores da frequência respiratória dos grupos experimentais.

[O ₂] (% de O ₂)	f_R - ciclos respiratórios.min ⁻¹	
	Ctrl	NPE9
100	58,43 ± 5,90	56,02 ± 5,54
70	58,06 ± 6,36	58,13 ± 5,92
50	57,61 ± 5,91	60,99 ± 4,95
30	61,13 ± 6,86	70,95 ± 5,97
20	65,91 ± 7,37	76,88 ± 5,79
10	73,37 ± 6,45	76,84 ± 3,27

Frequência respiratória (f_R - ciclos respiratórios.min⁻¹) dos grupos controle Ctrl (n = 5) e exposto (NPE9 – n = 5) de *O. niloticus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de O₂ da água. Valores médios ± 1 D.P.

FIGURA 17. Valores médios da frequência respiratória de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle basal e exposto ao NPE.



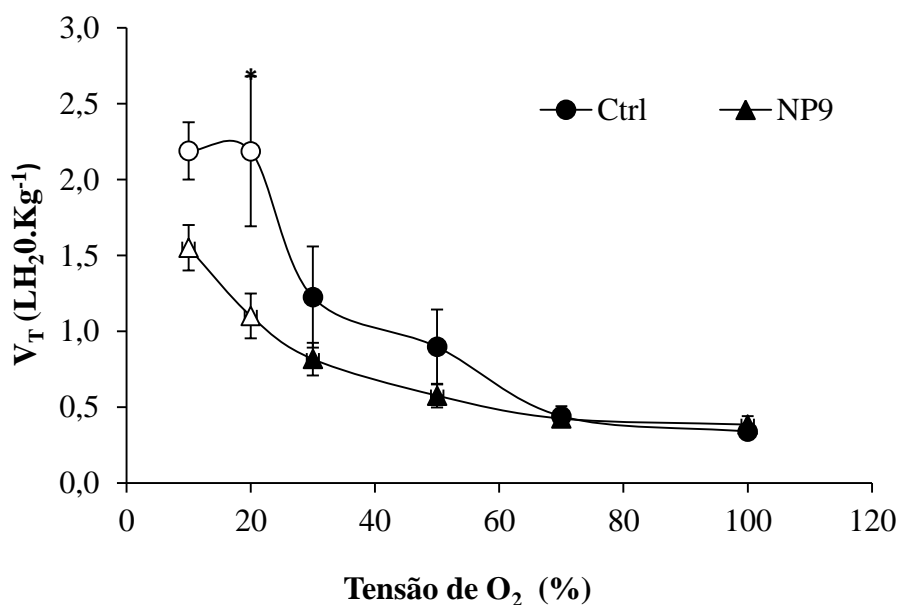
f_R - frequência respiratória. Valores médios ± DP.

TABELA 7. Valores do volume ventilatório dos grupos controle experimentais.

[O ₂] (% de O ₂)	V _T - mLH ₂ O.kg ⁻¹ .ciclo respiratório ⁻¹	
	Ctrl	NP9
100	0,34 ± 0,02	0,39 ± 0,06
70	0,44 ± 0,06	0,42 ± 0,05
50	0,90 ± 0,25	0,58 ± 0,08
30	1,22 ± 0,33	0,82 ± 0,11
20	*2,19 ± 0,49	*1,10 ± 0,15
10	2,19 ± 0,19	1,55 ± 0,15

Volume ventilatório (V_T - mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹) dos grupos controle Ctrl (n = 5) e exposto (NPE9 - n = 5) de *O. niloticus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de O₂ da água. Valores médios ± 1 D.P. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação à normóxia. *Diferença significativa entre os grupos estudados.

FIGURA 18. Valores médios do volume ventilatório de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle basal e exposto ao NPE.



Volume ventilatório (V_T - mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹). Ctrl – grupo controle basal e NPE9 – grupo exposto ao nonilfenol etoxilado. Valores médios ± DP. Símbolos em branco representam diferença significativa em relação aos valores de normóxia. * Diferença significativa entre os grupos Ctrl e NPE9.

4.1.3 Extração de Oxigênio da Corrente Ventilatória (EO₂)

Os valores médios da extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂) do grupo controle (Ctrl) e grupo exposto (NPE9) em resposta à diminuição da tensão de O₂ da água estão apresentados na Tabela 8 e a representação gráfica dos resultados na Figura 19.

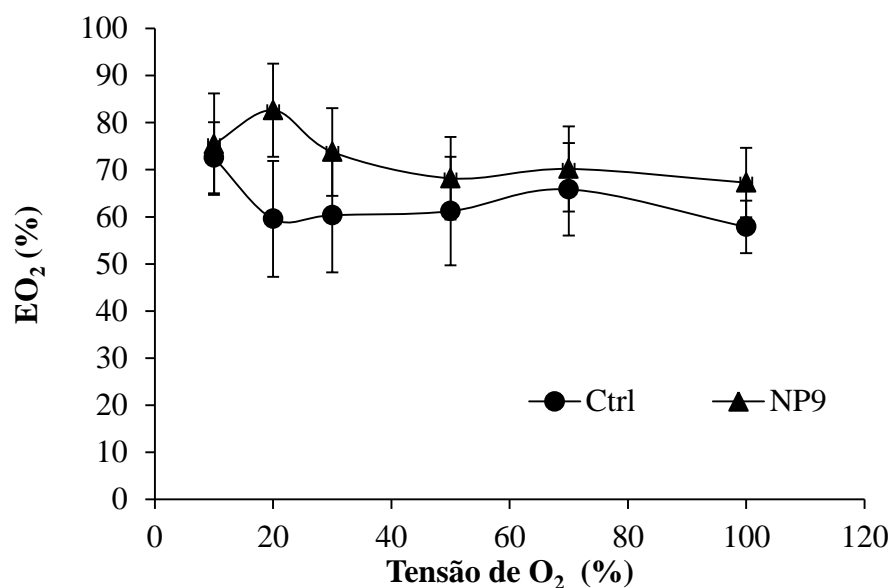
Não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de EO₂ do grupo Ctrl em nenhuma das tensões de O₂ analisadas ($p > 0,05$). O grupo NPE9, da mesma forma, também apresentou valores de EO₂ constantes ($p > 0,05$). Também não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de EO₂ dos grupos Ctrl e NPE9 em cada tensão de O₂ estudada.

TABELA 8. Valores da extração de O₂ da corrente ventilatória dos grupos experimentais.

[O ₂] (% de O ₂)	EO ₂ - %	
	Ctrl	NPE9
100	57,87 ± 5,60	67,26 ± 7,37
70	65,82 ± 9,83	70,17 ± 9,04
50	61,21 ± 11,52	68,18 ± 8,77
30	60,35 ± 12,16	73,79 ± 9,30
20	59,57 ± 12,32	82,63 ± 9,91
10	72,57 ± 7,56	75,45 ± 10,78

Extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂ - %) dos grupos controle Ctrl (n = 5) e exposto (NPE9 – n = 5) de *O. niloticus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de O₂ da água. Valores médios ± 1 D.P.

FIGURA 19. Valores médios da extração de oxigênio da corrente ventilatória de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle basal e exposto ao NPE.



Extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂ - %). Ctrl – grupo controle basal e NPE9 – grupo exposto ao nonilfenol etoxilado. Valores médios ± DP.

4.2 Frequência Cardíaca

A Tabela 9 e a Figura 20 apresentam os valores médios da frequência cardíaca (f_H - bpm) dos grupos experimentais nas a diferentes tensões de O₂ da água.

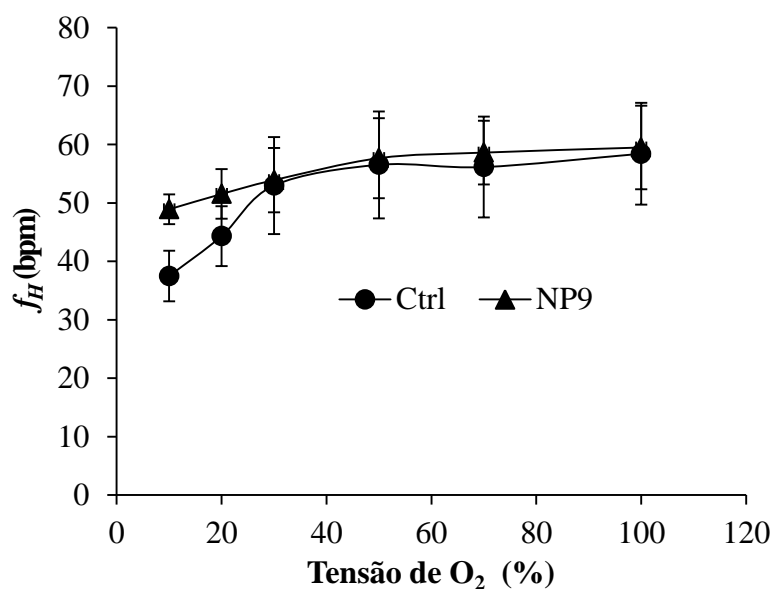
Apesar da tendência de queda, não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de f_H do grupo Ctrl em nenhuma das tensões de O₂ analisadas. A f_H em normóxia foi de $58,42 \pm 8,70$ bpm e na tensão de 10 % de O₂ foi de $37,48 \pm 4,35$ bpm. A mesma tendência foi verificada para o grupo NPE9, cujos valores médios de f_H , também não sofreram alterações significativas ($59,49 \pm 7,15$ bpm em normóxia e $48,91 \pm 2,56$ bpm à 10 % de O₂). Também não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de f_H dos dois grupos experimentais em nenhuma das tensões de O₂ analisadas.

TABELA 9. Valores médios da frequência cardíaca dos grupos experimentais.

[O ₂] (% de O ₂)	f_H - bpm	
	Ctrl	NPE9
100	58,42 ± 8,70	59,49 ± 7,15
70	56,14 ± 8,63	58,62 ± 5,46
50	56,53 ± 9,16	57,67 ± 6,84
30	52,99 ± 8,31	53,91 ± 5,52
20	44,33 ± 5,12	51,53 ± 4,24
10	37,48 ± 4,35	48,91 ± 2,56

Frequência cardíaca (f_H - bpm) dos grupos controle Ctrl (n = 5) e exposto (NPE9 - n = 5) de *O. niloticus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de O₂ da água. Valores médios ± 1 D.P.

FIGURA 20. Valores médios da frequência cardíaca de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle basal e exposto ao NPE.



Frequência cardíaca (f_H - bpm) Ctrl - grupo controle basal e NPE9 - grupo exposto ao nonilfenol etoxilado. Valores médios ± DP.

4.3 Análises Histológicas

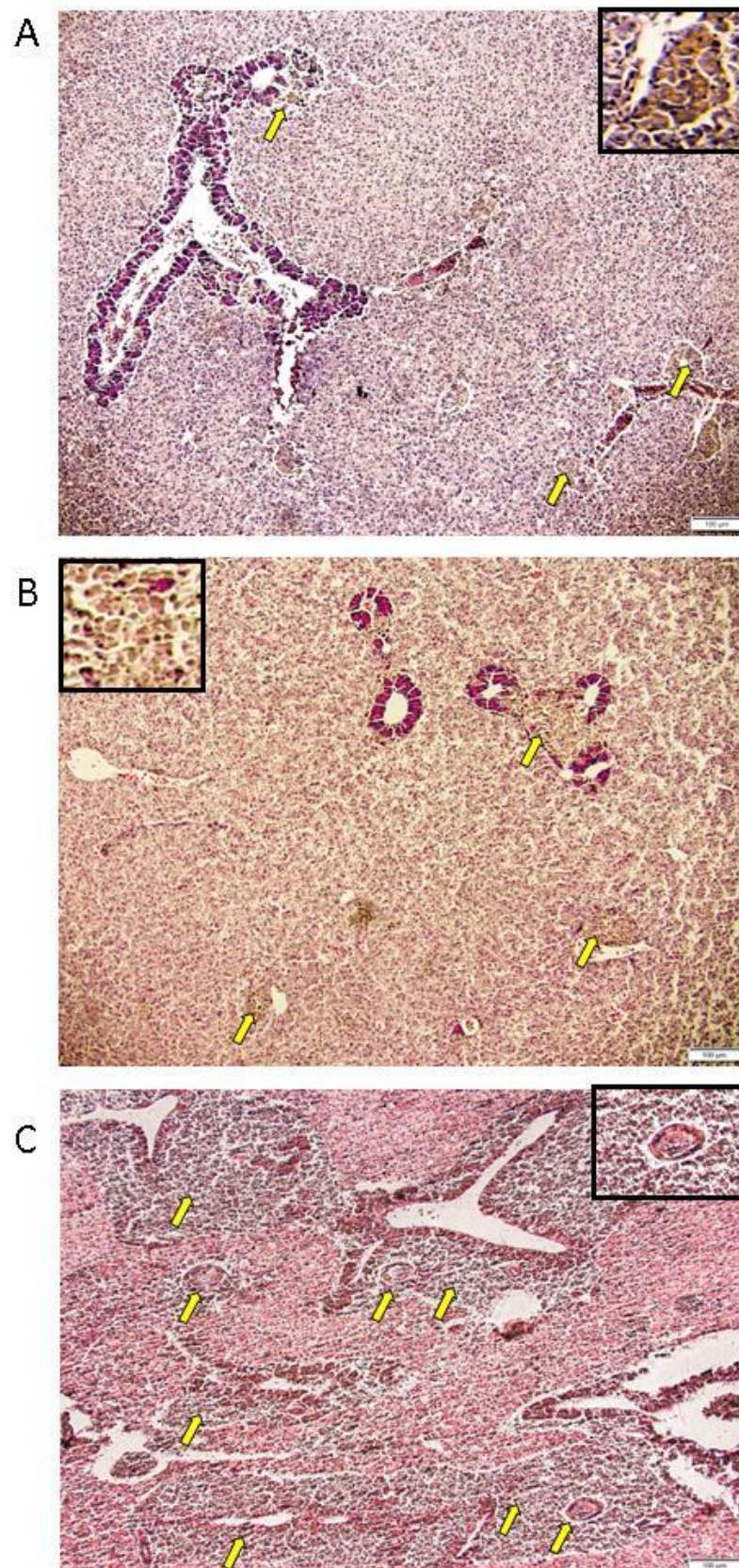
4.3.1 Fígado

A estrutura histológica do tecido hepático dos exemplares de *O. niloticus* analisados é composta de hepatócitos, envolvidos por capilares sinusóides, vasos sanguíneos, hepatopâncreas e células melanomacrofágicas.

As células melanomacrofágicas dos grupos estudados estavam dispostas por todo o tecido de forma livre e em centros de melanomacrófagos, próximos ao hepatoprâncreas, com grânulos de coloração castanhos claros, como mostrado na Figura 21. Essa figura mostra a diferença na frequência dos centros melanomacrofágicos entre os grupos estudados.

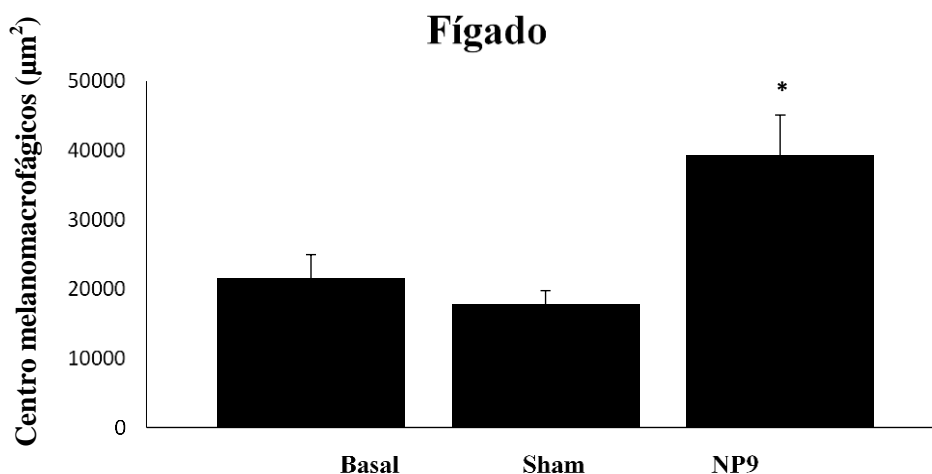
Os valores da quantificação das células melanomacrofágicas dos grupos controle e sham não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), sendo de $21526 \pm 3420 \mu\text{m}^2$ para Ctrl, e $17759 \pm 1960 \mu\text{m}^2$ para sham, enquanto que a quantificação dos indivíduos do grupo NPE9 foi de $39293 \pm 5763 \mu\text{m}^2$, sendo significativamente ($p > 0,05$) diferente dos demais grupos (Ctrl) (Figura 22).

FIGURA 21. Cortes histológicos de tecido hepático de *Oreochromis niloticus* experimentais.



A – controle basal; B – sham; C - exposto ao NPE9. As setas indicam centros melanomacrofágicos. A, B e C destacam os centros de melanomacrófagos no tecido hepático. Coloração H&E. Escala: 100µm.

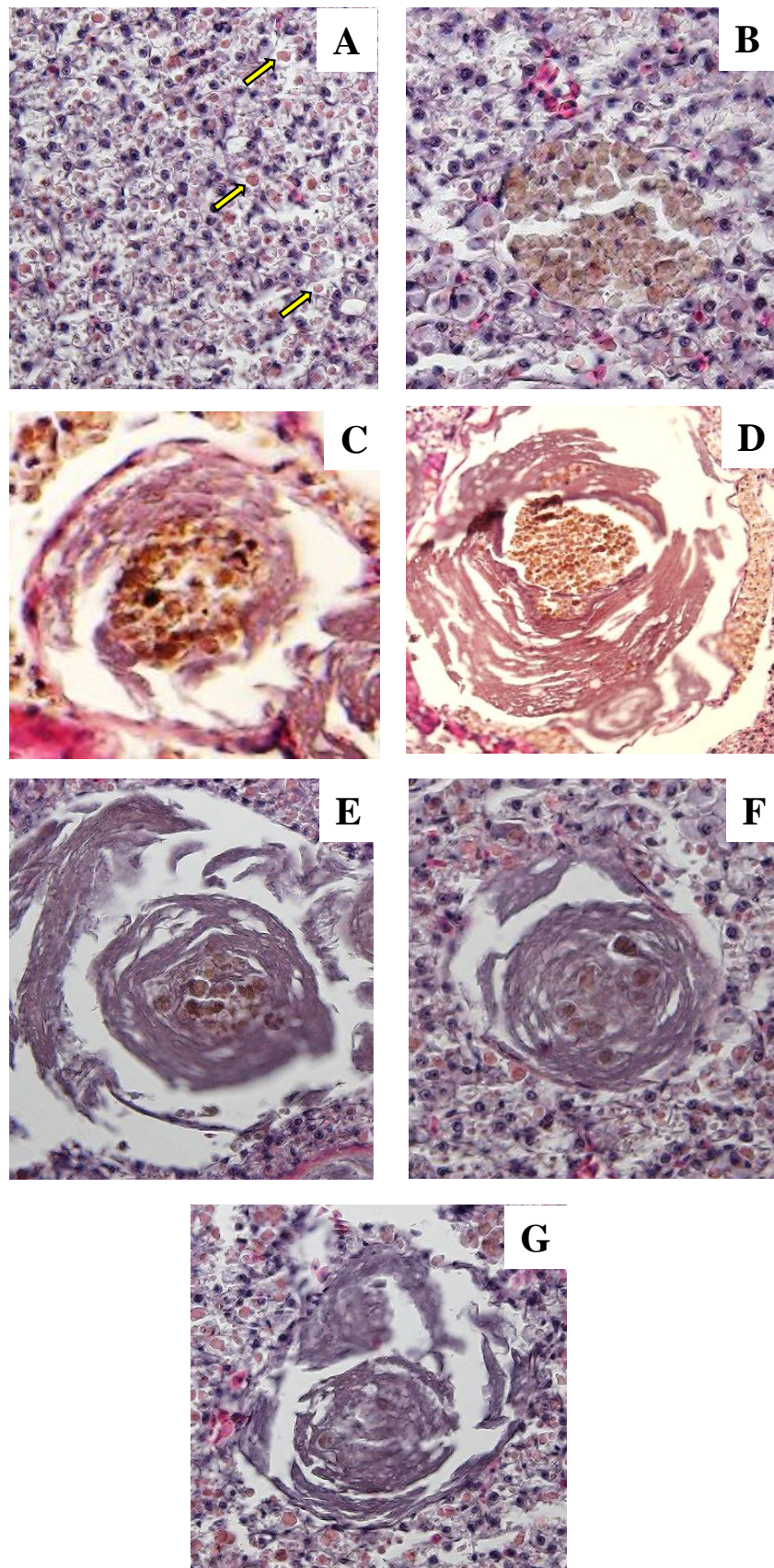
FIGURA 22. Análise quantitativa de centros melanomacrofágicos em tecido hepático de *Oreochromis niloticus*.



*Diferença significativa entre os grupos estudados.

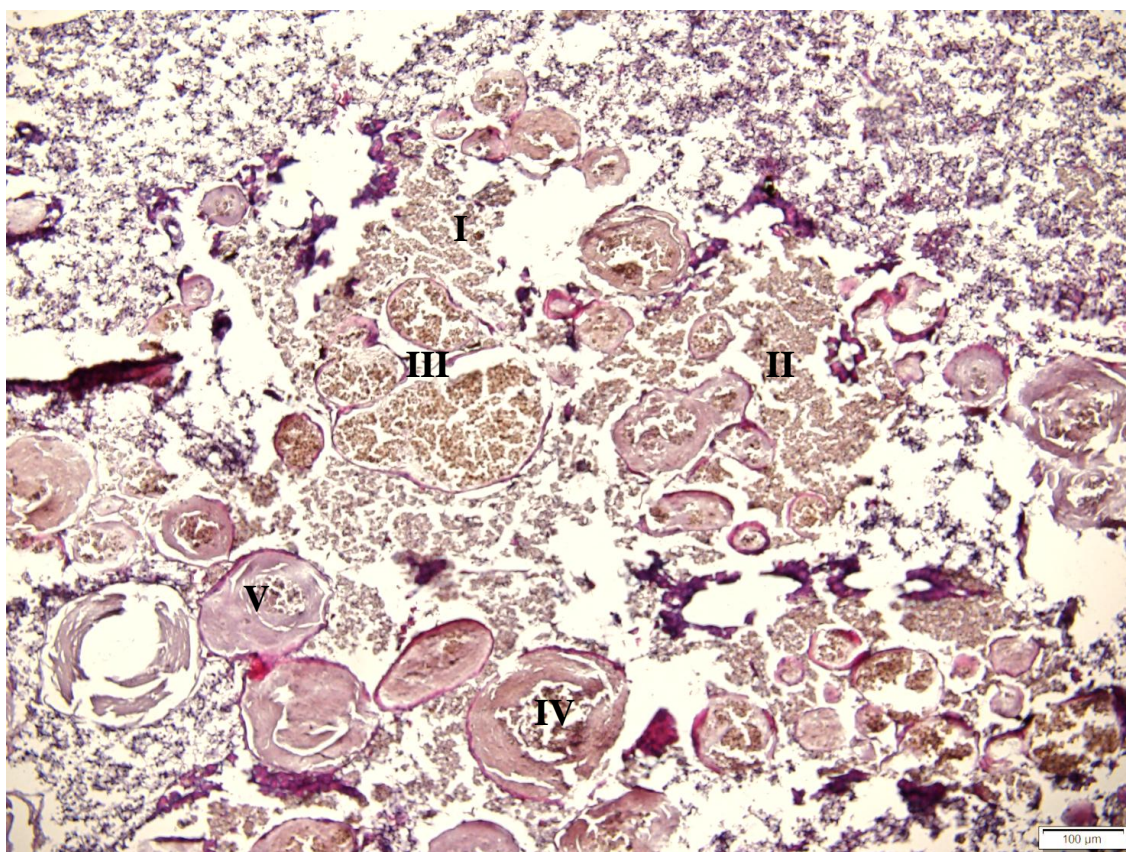
As células melanomacrofágicas do grupo exposto (NPE9) estavam dispostas de forma individual, em agregados acastanhados e arredondados, circundados por uma camada de tecido conjuntivo formado de fibras e fibroblastos, com espessura variada. Os diferentes estágios dos centros melanomacrofágicos observados foram: Estágio I: células macrofágicas pouco agrupadas (Figura 23A); Estágio II: acúmulo irregular das células melanomacrofágicas (Figura 23B); Estágio III: agregado de células melanomacrofágicas e formação do envoltório de tecido conjuntivo na porção periférica (Figura 23C e 23D); Estágio IV: envoltório de tecido conjuntivo na porção periférica totalmente formado (Figura 23E e 23F); Estágio V: espessamento do tecido conjuntivo envoltório (Figura 23G). A Figura 24 mostra os diferentes estágios no tecido hepático de um indivíduo exposto ao NPE9.

FIGURA 23. Estágios de desenvolvimento dos centros melanomacrofágicos no tecido hepático de *Oreochromis niloticus* exposto ao NPE9.



A: Estágio I; B: Estágio II; C e D: Estágio III; E e F: Estágio IV e G: Estágio V. As setas indicam células melanomacrofágicas. Coloração H&E. ESCALA: 50µm.

FIGURA 24. Tecido hepático de *Oreochromis niloticus* exposto ao NPE9, mostrando centros melanomacrofágicos em diferentes estágios de desenvolvimento.



Células macrofágicas isoladas ou pouco agrupadas (I), acúmulo irregular das células melanomacrofágicas (II), agregado de células melanomacrofágicas e formação do envoltório de tecido conjuntivo na porção periférica (III); envoltório de tecido conjuntivo na porção periférica totalmente formado (IV), espessamento do tecido conjuntivo envoltório e células em degradação (V). Coloração H&E. ESCALA: 100µm.

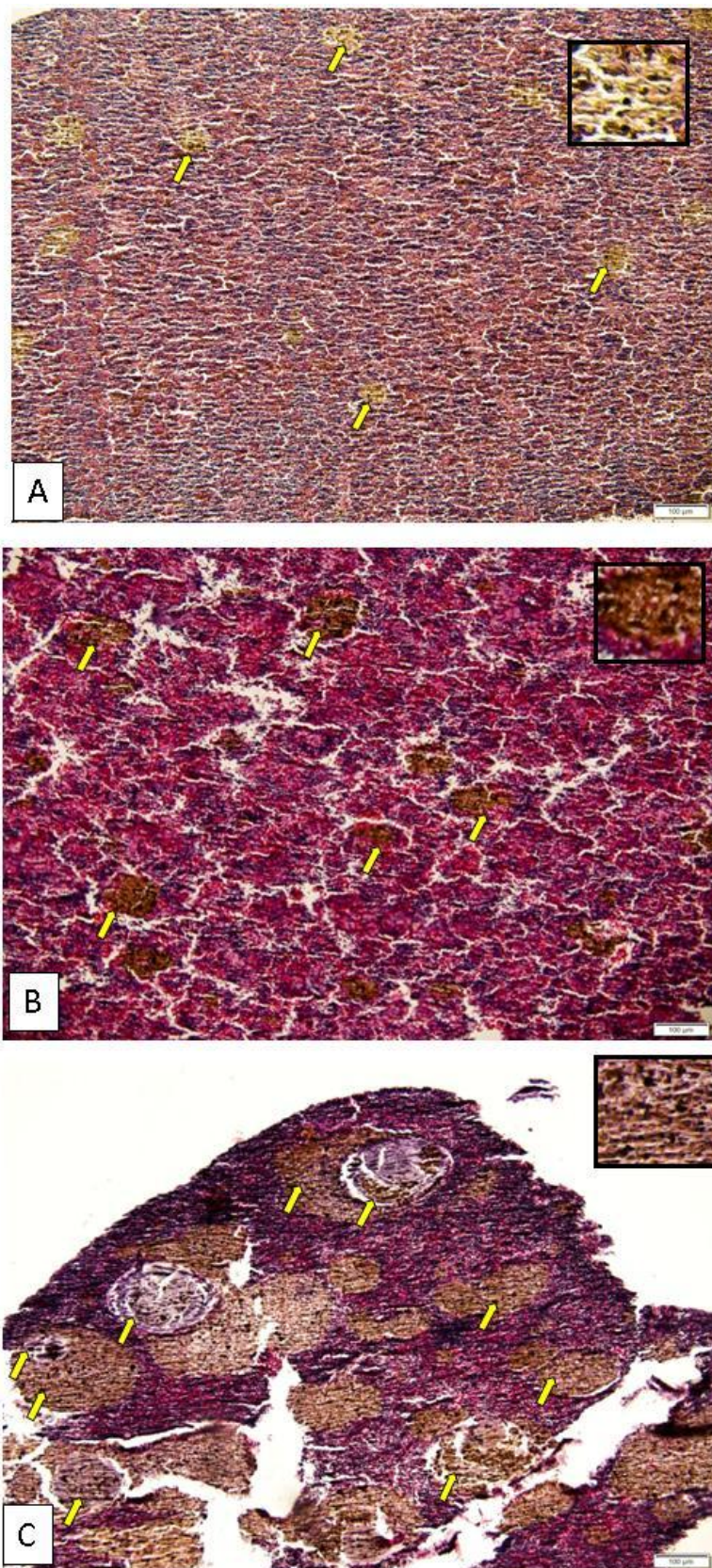
4.3.2 Baço

Ao analisar as lâminas dos indivíduos de cada tratamento foi possível observar a polpa branca, e polpa vermelha e células melanomacrofágicas.

As células melanomacrofágicas dos três grupos experimentais apresentaram coloração acastanhada e distribuição por toda extensão tecidual, ocorrendo de forma difusa, ou como centros melanomacrofágicos (CM). Entretanto, no grupo exposto (NPE9) foi observado diferentes estágios de desenvolvimento, como: células macrofágicas pouco agrupadas, acúmulo irregular das células melanomacrofágicas, agregado de células melanomacrofágicas e formação do envoltório de tecido conjuntivo na porção periférica.

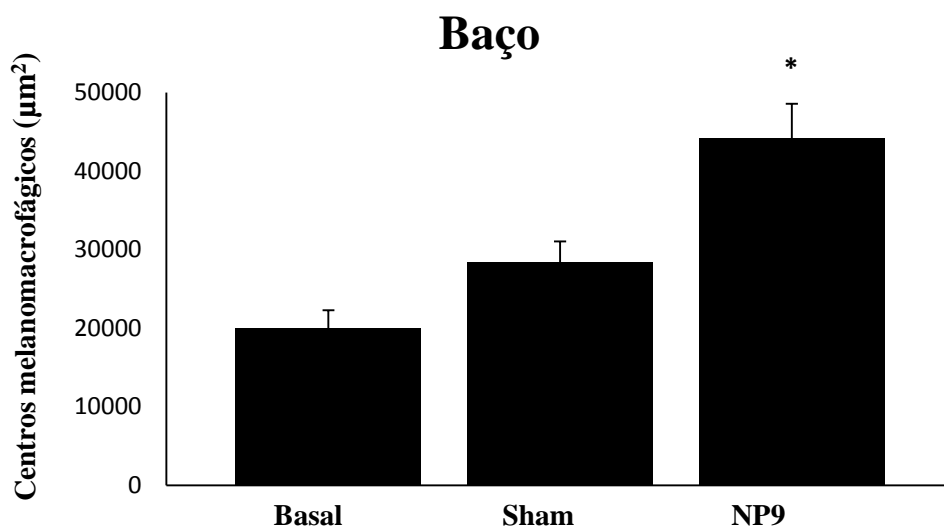
Houve diferença na frequência dos CM no tecido esplênico dos grupos estudados, como mostra a Figura 25.

FIGURA 25. Cortes histológicos de tecido esplênico de *Oreochromis niloticus* experimentais.



A – controle basal; B – sham; C - exposto ao NPE9. As setas indicam centros melanomacrófagos. A, B e C em destaque os centros de melanomacrófagos no tecido esplênico. Coloração H&E. ESCALA: 100µm.

FIGURA 26. Análise quantitativa de centros melanomacrofágicos em tecido esplênico de *Oreochromis niloticus*.



*Diferença significativa entre os grupos estudados.

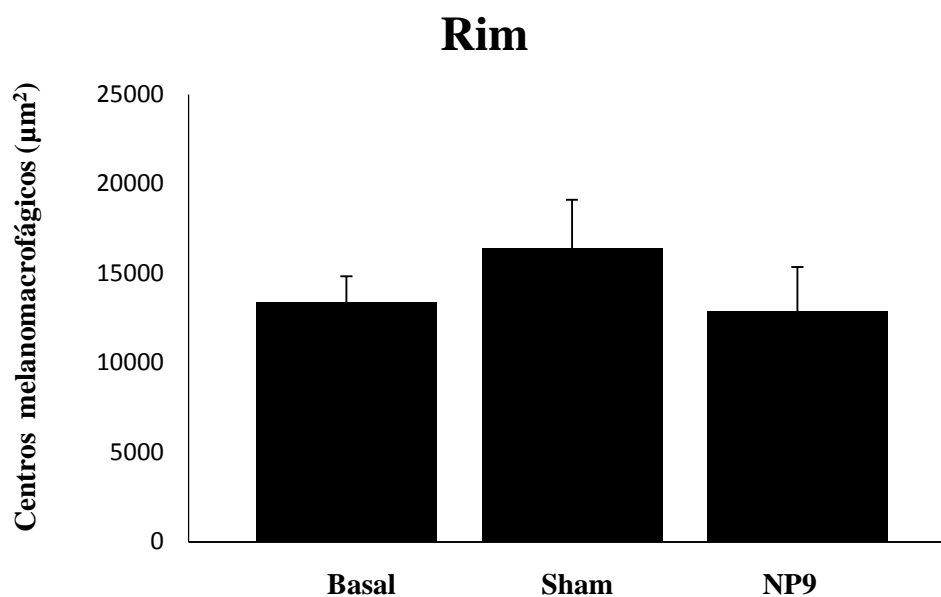
Como mostra a Figura 26, o valor da quantificação de CM do grupo Ctrl foi de $20005 \pm 2281 \mu\text{m}^2$, valor próximo ao do grupo sham de $28389 \pm 2639 \mu\text{m}^2$, não havendo diferença significativa entre esses. A quantificação desses centros no grupo NPE9 foi de $44216 \pm 4348 \mu\text{m}^2$, sendo significativamente diferente dos grupos Ctrl e sham.

4.3.3 Rim

A quantificação dos CM no tecido renal entre os indivíduos experimentais não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), sendo $13378 \pm 1461 \mu\text{m}^2$ para o Ctrl, $16404 \pm 2716 \mu\text{m}^2$ para sham e $12895 \pm 2460 \mu\text{m}^2$ para NPE9 (Figura 27).

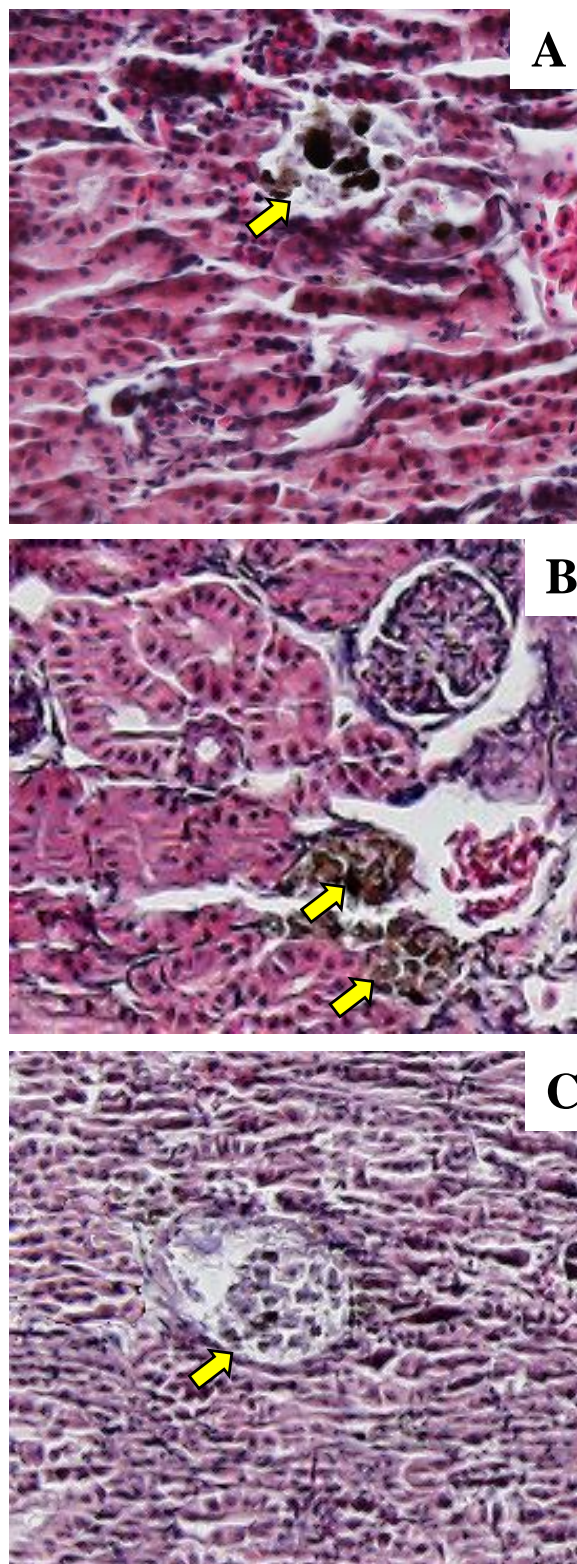
No tecido renal, foram observados glomérulos, capilares, túbulos contorcidos proximais constituídos por epitélio cúbico simples com borda em escova e túbulos contorcidos distais formados por um epitélio cúbico, com núcleos redondos basais e luz central reduzida. Células hematopoiéticas e CM dispersos foram observados. Esses estavam distribuídos por todo tecido renal, tanto de forma difusa quanto em aglomerados, fortemente pigmentados, com os grânulos de coloração acastanhada (Figura 28). A mesma mostra os CM no tecido renal dos grupos estudados.

FIGURA 27. Análise quantitativa de centros melanomacrofágicos no tecido renal de *Oreochromis niloticus*.



Além disso, no grupo NPE9 também foram observados diferentes estágios de desenvolvimento dos CM, como: células macrofágicas isoladas ou pouco agrupadas, acúmulo irregular das células melanomacrofágicas, agregado de células melanomacrofágicas e formação do envoltório de tecido conjuntivo na porção periférica.

FIGURA 28. Cortes histológicos de tecido renal de *Oreochromis niloticus* experimentais.



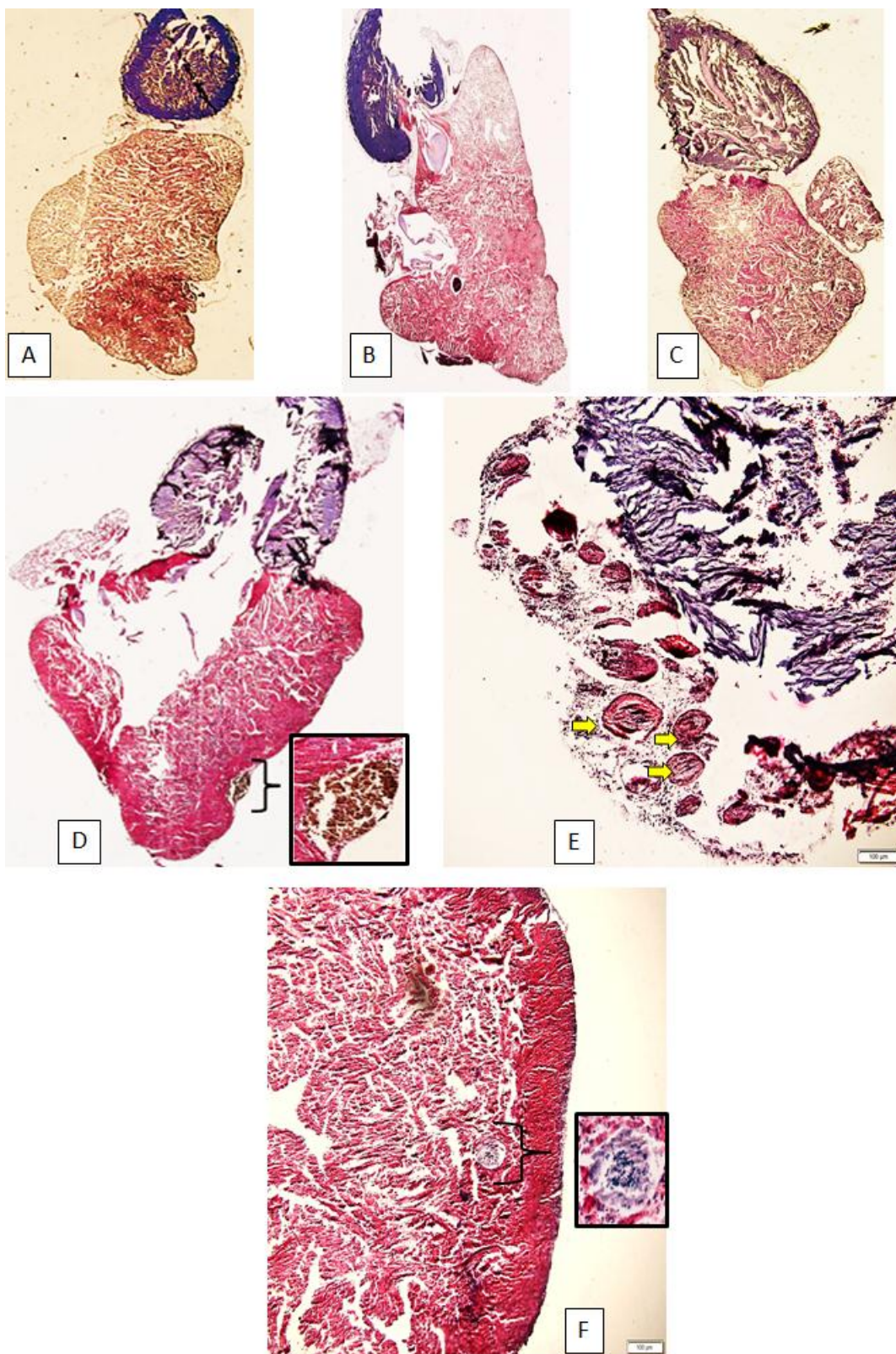
A – controle basal; B – sham; C - exposto ao NPE9. As setas indicam centros melanomacrofágicos no tecido renal. Coloração H&E. ESCALA: 100µm.

4.3.4 Coração

No tecido cardíaco dos exemplares de *O. niloticus* dos grupos experimentais, analisou-se o ventrículo e bulbo arterioso. O ventrículo é composto de músculo estriado cardíaco dividido em uma fina camada de aspecto compacto e o restante esponjoso com os feixes musculares dispostos em diversas direções. No bulbo arterioso, foi observado tecido conjuntivo elástico circundado por uma fina camada de tecido conjuntivo.

Não foram observadas alterações histológicas no grupo Ctrl. Em apenas dois indivíduos sham observou-se a presença de poucos CM no tecido conjuntivo do epicárdio e do bulbo arterioso, enquanto que no grupo NPE9 esses centros foram encontrados na camada esponjosa do ventrículo de dois indivíduos, apresentando pigmentação diferenciada em relação àqueles observados em outros órgãos analisados no presente trabalho (Figura 29).

FIGURA 29. Cortes histológicos de tecido cardíaco de *Oreochromis niloticus* experimentais.



A – controle basal; B – sham; C - exposto ao NPE9 respectivamente. H&E. ESCALA: 40 μ m. D e E destacam os centros de melanomacrófagos no tecido conjuntivo do epicárdio e do bulbo arterioso respectivamente nos indivíduos sham. F em destaque o centro de melanomacrófagos no tecido cardíaco no grupo NPE9. Coloração H&E. ESCALA: 100 μ m.

5. DISCUSSÃO

5.1 Respostas Respiratórias de *Oreochromis niloticus* Submetido à Hipóxia Gradual.

5.1.1. Consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$) e tensão crítica de O_2 (P_cO_2)

A taxa metabólica é influenciada por fatores endógenos (ex. massa corporal) e exógenos, como a disponibilidade de oxigênio e temperatura (ROSEWARNE; WILSON; SVENDSEN, 2016). Sendo assim o consumo de oxigênio está relacionado à atividade metabólica de um animal em resposta a fatores específicos, refletindo o gasto energético (MEHRLE; MAYER, 1984).

Em peixes, a taxa metabólica aeróbica pode ser estimada, de forma indireta, a partir de medições do consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$) em condições tanto normóxicas quanto hipóxicas. Em algumas espécies de peixes, a $\dot{M}O_2$ se reduz concomitantemente às reduções na pressão parcial de oxigênio do ambiente, sendo classificados como oxiconformistas. Em outras espécies, a $\dot{M}O_2$ é mantida constante em uma ampla gama de pressões parciais de oxigênio, sendo classificados como oxirreguladores. Entretanto, mesmo nessas espécies, há uma tensão de oxigênio, denominada tensão crítica de O_2 (P_cO_2), a partir da qual o animal não consegue mais regular a tomada de O_2 e passa a se comportar como um oxiconformista, devido à redução na eficiência dos mecanismos homeostáticos envolvidos na tomada de O_2 pelas brânquias e na difusão de gases para os tecidos (DAVIS, 1975; STEFFENSEN, 2006).

Oreochromis niloticus é uma espécie oxirreguladora, visto que manteve constante o $\dot{M}O_2$ independente da tensão de O_2 ambiental até atingir a sua pressão crítica de oxigênio, conforme anteriormente descrito por FERNANDES e RANTIN (1989); KALININ; GLASS e RANTIN (1999); THOMAZ et al. (2009); MARTINS (2011), e corroborado pelo presente estudo.

Os valores da P_cO_2 dos grupos Ctrl e sham foram de aproximadamente 16 % de O_2 (~23 mmHg), valor próximo ao descrito por DELAVECHIA (1994) de 20 mmHg, FERNANDES e RANTIN (1989), em torno de 18 mmHg, e MARTINS (2011), de 16 mmHg para tilápia-do-Nilo.

As águas tropicais constituem um importante sistema para estudos de adaptações ao ambiente por apresentarem grandes oscilações diárias e sazonais naturais na disponibilidade de O_2 . Assim sendo, espécies de peixes tropicais estão comumente sujeitos à hipóxia ambiental. Os baixos valores da P_cO_2 observados neste trabalho são compatíveis com o habitat da espécie, pois permitem uma alta capacidade de regular a tomada de O_2 do meio

(FERNANDES; RANTIN, 1989). Além disso, o gênero *Oreochromis* é considerado tolerante as grandes variações nos fatores ambientais, portanto sendo amplamente distribuído em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (PHILIPPART; RUWET, 1982; CHERVINSKI, 1982).

A exposição ao NPE9 aumentou significativamente a P_cO_2 da espécie, de 16 % de O_2 (~23 mmHg), para 50 % de O_2 (71 mmHg). Desse modo, os indivíduos NPE9 apresentaram uma menor capacidade de manter a tomada de O_2 constante, fazendo com que a $\dot{M}O_2$ da espécie dependa da concentração de O_2 do meio a partir de tensões de O_2 mais elevadas, reduzindo sua capacidade de sobrevivência em ambientes hipóxicos.

Até o momento, não há estudos na literatura que relatem os efeitos da exposição ao NPE ou aos seus derivados sobre a função cardiorrespiratória de peixes.

De acordo com COX (1996) as brânquias de peixes são particularmente sensíveis à presença de surfactantes, visto que há estudos que demonstraram o comprometimento destas quando expostas ao nonilfenol etoxilado.

(SAYED; MEKKAWY; MAHMOUD, 2012) observaram alterações histológicas nas brânquias de bagre-africano (*Clarias garieipinus*) expostos por 15 dias a $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 4-NP e observaram o aumento no número de células mucosas em brânquias. Essa resposta morfológica das brânquias aos xenobióticos ambientais é muitas vezes manifestada por um aumento significativo na densidade de suas células mucosas (DUTTA, 1997, HEMALATHA; BANERJEE, 1997), sendo considerado um mecanismo de defesa (HANDY; EDDY, 1991; MAZON et al., 1999).

GRANMO e KOLLBERG (1976) descreveram a captação e eliminação do NP10E em bacalhau-do-atlântico (*Gadus morhua*) após exposição a 5 ppm desse composto. De acordo com os autores, a penetração ocorre principalmente através das brânquias, iniciando uma formação de filmes superficiais de muco sobre o epitélio branquial, em consequência das propriedades do surfactante (KÖLBEL; KURZENDÖRFER, 1969). Em concentrações mais elevadas, pode ocorrer um dano celular mais específico, como desnaturação de proteínas celulares, já descrito por MANWELL e BAKER (1967) e por SWISHER et al. (1964). HOFER et al. (1995) observaram hiperplasia epitelial e aumento na distância interlamelar nas brânquias de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) após exposição ao surfactante Fixade® (à base de NPE), dificultando a difusão do oxigênio, o que resulta em estresse respiratório e falha osmorregulatória.

(BHATTACHARYA; XIAO; LUN, 2008) estudaram os efeitos de concentrações subletais de 4-NP (0,17, 0,34 e 0,68 μM / 14 dias) nas brânquias, fígado e rins de barbo rosado (*Pethia conchoniis*). Os resultados mostraram que, nas brânquias, o 4-NP causou alterações

estruturais como hiperplasia do epitélio e a fusão de lamelas secundárias, efeitos estes provavelmente decorrentes do aumento da permeabilidade da membrana celular, devido às propriedades da extremidade hidrofóbica da molécula de NP.

PÄRT et al. (1985) estudaram exemplares de *O. mykiss* expostos a 63 mg.L⁻¹ de NPE10 e observaram um aumento no efluxo de sódio nas células do epitélio branquial, decorrente do aumento na permeabilidade da membrana dessas células, e formação de edema nas lamelas secundárias. Tais efeitos diminuiram a capacidade de difusão do oxigênio na presença do surfactante.

Assim, os trabalhos acima demonstram que as brânquias são estruturas alvo da ação do NPE e derivados. De fato, as brânquias são o primeiro alvo de poluentes transmitidos pela água devido ao contato constante com o ambiente externo (PERRY; LAURENT, 1993). No presente estudo observou-se um maior acúmulo de muco nas brânquias dos peixes NPE9, sugerindo um mecanismo de ação semelhante aos descritos acima. Se este foi o caso no presente trabalho, um efeito deletério sobre as brânquias poderia justificar os valores mais elevados de PcO₂ do grupo NPE9.

(MADHU; POOJA, 2015) avaliaram o efeito genotóxico do 4-nonilfenol (NP) em *Channa punctatus* expostos a três concentrações subletais de 4-NP (0,15 mg.L⁻¹; 0,31 mg.L⁻¹ e 0,63 mg.L⁻¹) durante 24, 48, 72 e 96 h, e observaram alterações genotóxicas nos eritrócitos branquiais. A degeneração de eritrócitos pode ser atribuída a condições patológicas em peixes expostos a substâncias tóxicas (BUCKLEY et al., 1976), como pesticidas (ADEDEJI et al., 2009) e metais pesados (OLOLADE; OGinni, 2010; ADEYEMO, 2007), geralmente diminuindo os índices de eritrócitos, células sanguíneas que facilitam o transporte de oxigênio pelo corpo.

SCHWAIGER et al. (2000) observaram alterações nos parâmetros hematológicos de carpa-comum (*Cyprinus carpio*) expostos a 1-15 µg.L⁻¹ de NP durante 70 dias. Dentre os resultados observaram uma diminuição significativa no número total de eritrócitos e da quantidade de hemoglobina de peixes expostos a 10 e 15 µg.L⁻¹ de NP, como também o aumento de eritrócitos imaturos, levando esses animais ao estado de anemia e a estimulação da eritropoiese. Esses resultados refletem da interação entre as propriedades bioquímicas do NP com a membrana dos eritrócitos, visto que o NPE pode induzir efeitos hemolíticos *in vitro* dependendo do comprimento da cadeia etoxilada e da concentração utilizada (GALEMBECK et al. 1998), sugerindo assim que quanto menor a cadeia etoxilada, maior afinidade com os fosfolipídios das membranas.

Diante disso, o NPE e seus derivados alteram o funcionamento e a estrutura dos eritrócitos, células responsáveis pela captação e transporte de O₂, reduzindo a capacidade de

transporte de O₂ aos tecidos. Sendo assim a alteração na homeostase observada no presente estudo pode ser decorrente da ação do NPE9 sob essas células sanguíneas.

Alguns estudos demonstraram os efeitos combinados de xenobióticos e hipóxia aquática em peixes. MARTINS (2011) analisou as respostas cardiorrespiratórias em tilápia-do-Nilo após 48h de uma injeção intraperitoneal de microcistina-LR (100µg.Kg⁻¹ de peso corpóreo) e submetidos à hipóxia gradual. A microcistina reduziu a capacidade da manutenção da taxa metabólica constante e aumentou a P_{cO₂} em relação ao grupo controle. THOMAZ (2009) também analisou estas respostas em tilápia-do-Nilo expostos a uma dose subletal de trichlorfon (TRC – 0,5 mg.L⁻¹, durante 96h) e submetidos à hipóxia gradual. De forma semelhante, a exposição ao TRC reduziu a capacidade da manutenção da taxa metabólica e aumentou a P_{cO₂} em relação ao grupo controle.

MONTEIRO (2011) analisou os efeitos sobre as respostas cardiorrespiratórias em matrinxã (*Brycon amazonicus*) expostos ao cloreto de mercúrio (HgCl₂ - 0,15 mg.L⁻¹, por 96h) e à hipóxia gradual e também verificou um aumento da P_{cO₂}.

Dessa forma, a combinação de baixos níveis de oxigênio dissolvido e a presença de contaminantes nas águas interfere nos processos respiratórios, o que corrobora os resultados do presente estudo, em que a exposição ao nonilfenol etoxilado (NPE9) não apenas reduziu os valores de $\dot{M}O_2$ em condições hipóxicas, como também aumentou significativamente a P_{cO₂}, reduzindo a capacidade de manter a tomada de O₂ constante, e conseqüentemente comprometendo as chances de sobrevivência em ambientes hipóxicos.

5.1.2 Ventilação Branquial (\dot{V}_G), Frequência Respiratória (f_R) e Volume Ventilatório (V_T).

Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos adotados pelos teleósteos durante a hipóxia ambiental para maximizar a tomada de O₂ e economizar seu gasto incluem, segundo SATCHELL (1991) e RANTIN (1993), 3 categorias de respostas: 1) respostas reflexas desencadeadas pela estimulação dos quimiorreceptores de O₂ como hiperventilação branquial, bradicardia, sincronismo cardio-respiratório e constrição dos vasos sanguíneos periféricos; 2) respostas intrínsecas dos vasos branquiais, modificando o padrão de fluxo sanguíneo nas brânquias, podendo aumentar a espessura da lamina de sangue no interior das lamelas branquiais e, conseqüentemente, causar um aumento na área disponível para a troca gasosa em cada lamela individual e recrutar lamelas adicionais; 3) respostas desencadeadas pela ativação, via estresse hipóxico, dos centros autonômicos que regulam a liberação de catecolaminas no sangue pelos tecidos cromafins. As catecolaminas, por sua vez, podem

evocar respostas tais como mudanças adicionais no padrão do fluxo de sangue nas brânquias e na condutância difusiva de O₂, regulação da tomada de O₂ pelos eritrócitos, proteção da musculatura cardíaca contra acidificação e aumento nos níveis sanguíneos de glicose compensando, em parte, a passagem de metabolismo aeróbico para glicolítico.

Assim, a manutenção da homeostase respiratória depende da capacidade de mobilização dos mecanismos compensatórios, como o aumento da ventilação branquial, para manter o gradiente de oxigênio entre água e sangue, garantindo assim a eficiência respiratória nas trocas gasosas (FERNANDES; RANTIN, 1989). Esse mecanismo, como resposta primária à redução na tensão de oxigênio ambiental, já foi observado em várias espécies, como carpa-comum, *Cyprinus carpio* (SAUNDERS, 1962; LOMHOLT; JOHANSEN, 1979), traíra, *Hoplias malabaricus* e trairão, *Hoplias lacerdae* (RANTIN et al., 1992).

No presente estudo, tanto os indivíduos do grupo Ctrl quanto do grupo NPE9 exibiram aumentos significativos na ventilação branquial (\dot{V}_G) frente à hipóxia gradual, a partir da tensão 20 % de O₂. Segundo WEBER (1982) os mecanismos utilizados pela maioria das espécies de peixes tropicais em resposta às diminuições nas tensões de O₂ no ambiente são as respostas ventilatórias e os ajustes na capacidade de transportar O₂ pelo sangue.

Durante o desenvolvimento da hipóxia, os valores de \dot{V}_G dos grupos Ctrl e NPE9 não se diferenciaram significativamente. Os valores de \dot{V}_G exibidos pelos grupos estudados foram caracterizados pelo maior aumento no volume ventilatório (V_T), na tensão de 20 % de O₂ que aumentou cerca de 6,4 vezes no grupo Ctrl e 2,8 no grupo NPE9, enquanto que a frequência respiratória manteve-se constante durante a hipóxia gradual.

Alguns estudos demonstram as diferentes estratégias usadas pelos teleósteos para o ajuste da ventilação branquial durante os períodos hipóxicos, sendo uma dessas o aumento na \dot{V}_G devido a um maior aumento de f_R do que no V_T , como observado em carpa-comum, *C. carpio* (MARVIN; HEATH, 1968) e pacu, *P. mesopotamicus* (AGUIAR et al., 2002).

Contudo, a estratégia do maior aumento do V_T em comparação à f_R é a mais observada em peixes teleósteos. Entre os animais que apresentam esse tipo de resposta estão: tilápia-do-Nilo, *O. niloticus* FERNANDES e RANTIN (1989) e KALININ; GLASS e RANTIN (1999), traíra, *H. malabaricus* (KALININ; RANTIN; GLASS, 1993), curimatã, *Prochilodus scrofa* FERNANDES et al. (1995) e cascudo, *Hypostomus regani* (MATTIAS; RANTIN; FERNANDES, 1998). Segundo (RANTIN et al., 1992), o uso dessa estratégia baseia-se no baixo custo para a manutenção da velocidade e constância da contração muscular, enquanto que uma alta frequência de contração é limitada pelo trabalho muscular contra a alta viscosidade da água ventilada.

De acordo com a “equação fundamental da fisiologia respiratória” (DEJOURS, 1981),

$$(\dot{V}_G/\dot{M}O_2) \cdot EO_2 \cdot PO_2 = 1,$$

a manutenção da tomada de O_2 constante, a partir da redução da tensão de O_2 da água, ocorre por meio do aumento da ventilação branquial e/ou da extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2). Como a capacidade de aumentar a EO_2 é muito limitada em peixes, o aumento na \dot{V}_G é necessário para a manutenção da $\dot{M}O_2$ (KALININ et al., 1996). Desta forma, o aumento na ventilação branquial é necessário para a manutenção do $\dot{M}O_2$ constante, e as causas que comprometem a capacidade de aumentar os valores de \dot{V}_G em condições hipóxicas tendem a dificultar a sobrevivência.

MARTINS (2011) submeteu exemplares de tilápia-do-Nilo à hipóxia gradual após uma injeção intraperitoneal de microcistina-LR (100 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de peso corpóreo, por 48h) e verificou que a \dot{V}_G e o V_T foram consideravelmente menores nos peixes expostos à MC-LR, provavelmente devido a uma alteração nos mecanismos homeostáticos, prejudicando a resposta respiratória regular desta espécie à hipóxia ambiental.

THOMAZ (2009) também submeteu exemplares de tilápia-do-Nilo à hipóxia gradual, mas após a exposição a uma dose subletal de trichlorfon (TRC – 0,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, durante 96h), e verificou um aumento significativo e progressivo da \dot{V}_G em ambos os grupos experimentais para manter a tomada de O_2 durante a hipóxia, sendo que os aumentos na \dot{V}_G foram caracterizados por aumentos no volume ventilatório (V_T), enquanto que a frequência respiratória (f_R) se alterou muito pouco.

Entretanto, no presente estudo a exposição ao NPE9 não comprometeu o desenvolvimento normal das respostas ventilatórias, que desempenham um papel fundamental na permanência dos peixes em águas hipóxicas, por serem respostas imediatas (WEBER, 1982).

5.1.3 Extração de O_2 da Corrente Ventilatória (EO_2)

A espécie estudada, *Oreochromis niloticus*, apresenta elevados valores de extração de O_2 de 75 a 80 % em normóxia (FERNANDES; RANTIN 1989; KALININ et al., 1996; DELAVECHIA, 1994; MARTINS, 2011). Em outras espécies estudadas verificaram-se valores de EO_2 , em normóxia, acima de 70% como: tambaqui, *C. macropomum*, pacu, *P. mesopotamicus*, curimbatá, *P. scrofa*, traíra, *H. malabaricus* e carpas (KALININ et al., 1996; CORRÊA, 1996; GUERRA, 1992; FERNANDES et al., 1995 (MATTIAS; RANTIN; FERNANDES, 1998); SAUNDERS, 1962).

No presente estudo, observaram-se valores de EO_2 em normóxia de 57,87 % para o grupo Ctrl e 67,26 % para o grupo NPE9. As diferenças nos valores de EO_2 encontradas no presente estudo em relação aos previamente descritos na literatura podem ter sido causados por diferenças metodológicas, visto que os trabalhos anteriores utilizaram respirometria de fluxo constante e, no presente trabalho, utilizou-se respirometria de fluxo intermitente.

Os indivíduos de *O. niloticus* de ambos os grupos experimentais mantiveram constantes os valores de EO_2 frente a hipóxia gradual. O aumento na \dot{V}_G enquanto a EO_2 se mantém relativamente alta e constante constitui uma das mais importantes compensações respiratórias durante as reduções da tensão de O_2 ambiental (FERNANDES; RANTIN, 1989).

De acordo com (STEFFENSEN; LOMHOLT; JOHANSEN, 1982), a comparação entre os peixes de diferentes níveis de tolerância à hipóxia indica que as espécies mais tolerantes possuem maior potencial de aumentar a \dot{V}_G , enquanto mantém a EO_2 em níveis constantes. A estratégia de aumentar \dot{V}_G e manter EO_2 constante foi adotada pelos indivíduos de ambos os grupos, não havendo diferenças significativas.

5.2 Frequência Cardíaca de *Oreochromis niloticus* Submetido à Hipóxia Gradual

A f_H pode ser empregada como indicador de efeitos tóxicos de contaminantes ambientais em peixes, devido as reduções de seus valores com coincidentes aumentos na ventilação branquial, respostas comuns em peixes expostos a uma variedade de xenobióticos (TEUSCHLER et al., 2005; HEATH, 1995).

No presente estudo, a exposição ao NPE9 não alterou a frequência cardíaca (f_H) em nenhuma das tensões de O_2 experimentais quando comparada ao grupo Ctrl. Ambos os grupos analisados mantiveram a f_H constantes durante a hipóxia gradual. Os valores médios de f_H dos grupos experimentais (Ctrl e NPE9) em normóxia, foi de aproximadamente 60 bpm, valor esse que corrobora o observado para a mesma espécie por MARTINS (2011), de ~60 bpm.

De acordo com FRITSCHÉ e NILSSON (1993) e (RANTIN et al., 1992), as alterações na \dot{V}_G , para a manutenção da tomada de O_2 , em geral, são acompanhadas por bradicardia reflexa, como observado por MARTINS (2011) que expôs tilápia-do-Nilo a uma injeção intraperitoneal microcistina-LR (100 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de peso corpóreo, por 48h) e submetidos à hipóxia gradual. Como resultado, os indivíduos controles exibiram bradicardia reflexa característica em resposta à hipóxia, e o grupo exposto apresentou uma frequência cardíaca significativamente menor em todas as tensões de O_2 , provavelmente devido ao efeito direto desta toxina no tecido cardíaco. THOMAZ (2009) observou em tilápia-do-Nilo a redução

significativa da f_H do grupo exposto ao trichlorfon (TRC – 0,5 mg.L⁻¹, durante 96h) em todas as tensões experimentais, esse resultado deveu-se à ação direta deste composto no tecido cardíaco.

No entanto, no presente estudo, a f_H dos grupos (Ctrl e NPE9) manteve-se constante durante a hipóxia gradual, o que indica que a exposição ao nonilfenol etoxilado não alterou o cronotropismo do coração de *O. niloticus*.

5.3 Análises Histológicas

De acordo com DI GIULIO e NEWMAN (2012), os efeitos tóxicos de xenobióticos podem ser causados tanto por meio da exposição aguda como crônica e organizados em níveis de uma ordem crescente: subcelular (molecular e bioquímico), celular, organismo, população, comunidade e ecossistema.

As células melanomacrofágicas ocorrem naturalmente nos anfíbios (LOUMBOURDIS; VOGIATZIS, 2002) e nos peixes (WOLKE, 1992; FOURNIE et al., 2001; FISHELSON, 2006) e em órgãos como o rim, o baço, timo e fígado (BRUSLÈ; ANADON, 1996; BLAZER, 2002; AGIUS; ROBERTS, 2003; FISHELSON, 2006). (AGIUS; AGBEDE, 1984) caracterizaram os centros melanomacrofágicos (CM) como parte integrante do sistema reticuloendotelial de peixes e, dentre suas funções, destacam-se o envolvimento com processos inflamatórios, fagocitose de eritrócitos, captura e degradação de patógenos, degradação e acúmulo de produtos tóxicos (AGIUS; AGBEDE, 1984; PASSANTINO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2011; ROBERTS, 1972).

Os CM são geralmente nodulares, com um envoltório e se localizam próximos a vasos sanguíneos. Os melanomacrófagos, que formarão os CM, são aglomerados formando agregados maiores, ampliados devido à fagocitose ativa de materiais heterogêneos (AGIUS; ROBERTS, 2003). O desenvolvimento dos CM é caracterizado pelo acúmulo de melanomacrófagos e por um envoltório de tecido conjuntivo na porção periférica, como mostra Figura 30. De acordo com (HAAPARANTA et al., 1996), o CM maduro é caracterizado por um espesso envoltório periférico, constituído de duas ou mais camadas de tecido conjuntivo e células epitelióides, que são macrófagos modificados e mais eficientes para a fagocitose e digestão.

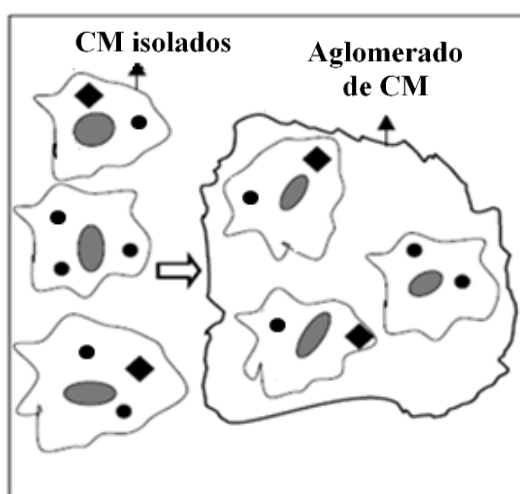
Apesar das evidências dos períodos de desenvolvimento das células melanomacrofágicas para envoltório de aspecto fibroso e da distribuição aleatória, ainda há

pouca informação sobre esse desenvolvimento em teleósteos, necessitando assim estudos complementares sobre o referido assunto.

A formação dos CM após a exposição a interferentes ambientais e biológicos pode ser de grande valia para análise histopatológica (BUCKE; DIXON, 1992), por isso, certos trabalhos evidenciam o uso dessas estruturas como biomarcadores para a exposição à xenobióticos.

De acordo com HERRAEZ e ZAPATA (1986) e AGIUS e ROBERTS (2003), as mudanças na quantidade de CM podem ocorrer fisiologicamente, associadas ao envelhecimento, restrição alimentar e mudanças ambientais, dentre essas a exposição à hipóxia prolongada. Diante disso, e das características funcionais dos CM, sugere-se o uso do número e do tamanho dos CM como biomarcadores nas avaliações de impacto ambiental (HERRAEZ; ZAPATA, 1986; WOLKE, 1992; FISHELSON, 2006; FOURNIE et al., 2001).

FIGURA 30. Representação esquemática das fases de desenvolvimento de centros melanomacrofágicos (CM) em tecidos de peixes (rim, baço, fígado).



CM isolados que engolfaram materiais estranhos, posteriormente um aglomerado de CM totalmente envolto por tecido conjuntivo. ● e ◆ representam materiais estranhos. Fonte adaptada: PASSANTINO et al. (2005).

Muitos estudos atribuem aos CM um papel na destruição, desintoxicação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos, estando esses isolados ou agrupados, sendo que no último estágio podem ser classificados como um tipo especial de granuloma (AGIUS, 1981; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; MELA et al., 2007). HERRAEZ e ZAPATA (1991) e LYLIAN et al. (2016) observaram CM espalhados pelo tecido hepático de tuvira (*Gymnotus* sp.) e peixe-dourado (*Carassius auratus*) formando pequenos agregados de

materiais heterogêneos, com aspecto granulomatoso, o que correspondia a uma reação inflamatória crônica, formando granulomas.

(PASSANTINO et al., 2005) observaram a presença de CM em fígado, baço e rim de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e a interação entre os eritrócitos, macrófagos e CM após exposição à *Candida albicans*, sugerindo seu importante papel de defesa imune inata contra patógenos e eliminação de células esgotadas, principalmente os eritrócitos. Diante disso, supuseram a formação dos CM a partir de eritrócitos isolados, que fagocitariam antígenos e viajariam por vasos sanguíneos para órgãos distantes, como baço, rim e fígado.

5.3.1 Fígado

Os estudos histopatológicos em peixes são direcionados para diferentes órgãos, principalmente aqueles responsáveis pelo metabolismo de substâncias tóxicas, como o fígado, que pode sofrer alteração estrutural e metabólica, refletindo uma variedade de processos patológicos mediante a exposição a poluentes, alimentação, parasitos e microrganismos (ARELLANO et al., 1999; GERNHÖFER et al., 2001; FANTA et al., 2003; AU, 2004; BOMBONATO et al., 2007).

GRANMO e KOLLBERG (1976) observaram o acúmulo de NPE10 na vesícula biliar do bacalhau-do-atlântico (*Gadus morhua*), visto que o fígado rapidamente (em 30 minutos) armazenou grande quantidade do surfactante, enviando-o posteriormente à vesícula biliar. (ISMAIL; MAHBOUB, 2016), observaram o acúmulo de NP nas brânquias, fígado, baço, rins e vesícula biliar de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) depois de 7 e 10 dias de exposição.

No presente trabalho, as células melanomacrofágicas do tecido hepático dos indivíduos Ctrl, Sham e NPE9 localizaram-se próximas às regiões portais, onde se formam os CM, o que corrobora BRUSLÉ e ANADON (1996). Entretanto, no último grupo houve um aumento na quantidade dessas células após a exposição ao NPE, sendo o mesmo demonstrado por (SAYED; MEKKAWY; MAHMOUD, 2012), que após a exposição ao 4-NP durante 15 dias, observaram a presença de melanomacrófaos no tecido hepático de bagre africano (*C. gariepinus*).

De acordo com UGUZ et al. (2003), pode haver necrose e diminuição do número de hepatócitos juntamente com a vacuolização após a exposição ao NP por 28 dias, entre outros efeitos deletérios, devido à relação disruptor endócrino e produção de vitelogenina.

(BHATTACHARYA; XIAO; LUN, 2008) verificaram que concentrações subletais de 4-NP (0,17, 0,34 e 0,68 μM / 14 dias) promoveram alterações morfológicas no fígado de *P. conchoniis* incluindo degradação da membrana celular e necrose no tecido hepático.

Sendo assim, a patologia hepática de peixes é considerada um indicador de toxicidade química e pode ser considerada uma ferramenta útil para estudar os efeitos da exposição de animais aquáticos às toxinas presentes no meio (FERNANDES et al., 2008).

Vale ressaltar que, diferente dos trabalhos anteriores, a exposição ao NPE9 no presente estudo constitui-se de uma dose intraperitoneal única e as análises realizadas após 12 horas. Mesmo em tais condições e curto período de tempo o NP9 foi capaz de induzir alterações estruturais significativas.

5.3.2 Baço

O baço é um órgão linfoide de grande importância na hematopoiese e captura de antígenos, sendo os linfócitos e os macrófagos histologicamente estudados devido à importância no sistema de defesa de peixes (HANSEN, 1997; FOURNIE et al., 2001; KURTOVIC et al., 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a intensa atividade de células melanomacrofágicas no tecido esplênico do grupo NPE9 em relação aos grupos Ctrl e Sham, agindo na degradação e no acúmulo da substância e possivelmente na fagocitose de eritrócitos. Além disso, o tecido esplênico em situação de estresse, como durante hipóxia e intoxicação, tende a aumentar a sua atividade eritropoiética, devido à ação da adrenalina, e consequente contração esplênica, o que favorece a liberação de eritrócitos para a circulação, contribuindo na captação e no transporte de O₂ no organismo (AFFONSO, 1999).

Esse resultado corrobora estudos que defendem o uso de CM como biomarcadores para a exposição de xenobióticos (BUCKE et al., 1984; KRANZ, 1989; BUCKE et al., 1992; KHAN et al., 1994; KHAN, 1995). Tendo em vista que os CM variam em número e tamanho entre as espécies de peixes e indivíduos, a presença dos mesmos constitui-se em um parâmetro confiável para análise das condições fisiológicas mediante exposição a interferentes ambientais (WOLKE, 1992).

Estudos indicaram o efeito de NPE e seus derivados em diferentes órgãos em teleósteos, no entanto não há relatos sobre efeitos deletérios no baço após a exposição a esses compostos.

5.3.3 Rim

Segundo LINS et al. (2010), o rim de teleósteos é um órgão misto composto de elementos hematopoiéticos, reticuloendoteliais, endócrinos e excretores que participam

ativamente de processos fisiológicos importantes. Este órgão é suscetível a doenças causadas por processos parasitários, bacterianos, virais, de manejo nutricional e de contaminantes. No tecido hematopoiético encontram-se as células melanocrofágicas (ROBERTS, 1972).

O rim de teleósteos é um dos primeiros órgãos a serem afetados por contaminantes na água (THOPHON et al., 2003) devido ao importante papel na excreção. Por isso, as lesões renais evidenciam possíveis danos toxicológicos e a combinação com alterações patológicas em outros órgãos pode comprovar os impactos de xenobióticos (RHODES et al., 1987).

CARDOSO (2009), ao realizar estudos toxicológicos e ambientais, descreveu alterações histológicas no tecido renal de peixe-espada (*Trichiurus lepturus*), dentre essas a presença de células melanomacrofágicas. (SAYED; MEKKAWY; MAHMOUD, 2012) observaram a presença de melanomacrófagos no rim de bagre africano (*C. gariiepinus*) após 15 dias de exposição à 0,08 mg/L de 4-nonilfenol, resultado esse que pode estar relacionado ao longo período de exposição dos indivíduos.

Dentre os resultados obtidos no presente estudo, os CM renais não diferiram entre os grupos experimentais. (KEEN et al., 2005) descreveram a efetiva eliminação do 4-NP no salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) através da excreção biliar/fecal após a transferência para água limpa depois de quatro semanas de exposição. (COLDHAM et al., 1998) estudaram os efeitos da exposição de truta arco-íris (*O. mykiss*) ao NP-4 por 1, 2, 4, 24, 48, 72 e 144 horas e encontram maiores concentrações de resíduos desse surfactante na bile, no conteúdo intestinal e nas fezes, indicando a excreção por via biliar/fecal. Isso pode ter acontecido no presente estudo, o que poderia explicar a ausência de efeitos significativos no rim.

5.3.4 Coração

As células melanomacrofágicas podem estar distribuídas em diferentes órgãos de teleósteos, sendo um desses o coração (ELLIS, 1976).

Alguns estudos demonstraram os CM no tecido cardíaco de teleósteos devido a respostas inflamatórias ou enfermidades. Os peixes que habitam um ambiente poluído podem refletir tais condições ambientais através da atividade alterada do sistema imunológico (KELLY-REAY; WEEKS-PERKINS, 1994) e, em tais situações, os CM são considerados biomarcadores, visto que aumentam em tamanho ou frequência em condições de estresse ambiental.

De acordo com CIMINI et al. (1977); GRECO e TOTA (1981); SANTER (1985) e AGNISOLA e TOTA (1994), a morfologia ventricular dos teleósteos reflete características funcionais e ecofisiológicas. Sendo assim, o estudo dos CM cardíacos pode ser considerado

um complemento à interpretação das respostas fisiológicas a mudanças ambientais. No entanto, são raras as informações sobre CM no tecido cardíaco.

No presente estudo, não foram observados CM no grupo Ctrl e apenas dois indivíduos do grupo Sham apresentaram CM, um no tecido conjuntivo do epicárdio e outro no bulbo arterioso. (POPPE; TAKSDAL, 2000) observaram CM no epicárdio de salmão do atlântico (*Salmo salar*) ao analisar má-formação cardíaca causada por fatores microbiológicos, nutricionais e hereditários. Dessa forma, a ocorrência de CM no grupo Sham pode ter sido aleatória e causada por fatores prévios à experimentação.

Entretanto, nos indivíduos expostos ao NPE9 os CM foram encontrados no miocárdio ventricular, como observado por (OVERSTREETAB; THULINC, 1989) em garoupa leopardo de corais, *Plectropomus leopardos*, e em outros serranídeos, devido à ação de parasitas nesses organismos. (NAKAMURA; SHIMOZAWA; KIKUCHI, 1993) demonstraram que células do revestimento do endocárdio de certos teleosteos são fagocitárias de materiais estranhos. (GRIVAS et al., 2014) observaram CM em locais de lesão necrótica e em áreas adjacentes ao miocárdio ao analisar o reparo e o potencial regenerativo cardíaco do peixe-dourado (*Carassius auratus*) frente à resposta inflamatória. Ao estudarem a síndrome de cardiomiopatia, doença viral comum associada a uma grave inflamação cardíaca que pode ser acompanhada de melanização intensa do coração em salmão do Atlântico (*Salmo salar*), (FAGERLAND et al., 2013) demonstraram que a melanização está ligada à melanogênese por melanomacrófagos. Portanto, a presença das células melanomacrófágicas no tecido ventricular é importante na eliminação de partículas estranhas. A presença de CM no miocárdio do grupo NPE9 pode indicar um processo de reparo e regeneração desse tecido, o que poderia explicar a ausência de efeito do NPE na frequência cardíaca da espécie.

5.4 Considerações Finais

Por tudo que foi exposto, as investigações sobre os efeitos da exposição de peixes ao NPE e seus derivados enfocam, em sua maioria, nas alterações morfológicas das gônadas (GIMENO et al., 1996; JOBLING et al., 1996; GRAY; METCALFE, 1997; ASHFIELD et al., 1998) ou seus efeitos estrogênicos (ARCAND-HOY; BENSON, 1998; HART, 1990; HERMAN; KINCAID, 1988; KIME, 1999; NAYLOR et al., 1992; PEDERSEN et al. 1999; JOBLING et al. 1996; LEWIS; LECH 1996). Entretanto, a exposição a esses compostos não afetam apenas os órgãos endócrinos e sua fisiologia.

O presente estudo mostrou que a exposição de tilápias-do-Nilo a 500 ng.L⁻¹ (ou 0,0005 mg.L⁻¹) durante 12 h causou o aumento da tensão crítica de O₂, um efeito que pode estar

relacionado à ação do NPE9 sobre os eritrócitos e, conseqüente, a redução na capacidade de transporte de O₂ do sangue. Por conseguinte, é possível que o NPE coloque em risco a sobrevivência da espécie em condições hipóxicas, situações estas comumente enfrentadas pelos peixes em seus ambientes naturais. Além disso, o NPE aumentou a frequência de células melanomacrofágicas nos tecidos hepático e esplênico, para degradação e acúmulo de produtos tóxicos, como também fagocitose de eritrócitos.

6. CONCLUSÕES

O estudo das respostas cardiorrespiratórias e estruturais de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em situação controle e após 12 horas da injeção intraperitoneal de nonilfenol etoxilado (NPE9 - 500 ng.Kg⁻¹ de peso corpóreo) permitiu as seguintes conclusões:

- a. A exposição ao NPE aumentou significativamente a tensão crítica de O₂ (P_CO₂), reduzindo a capacidade de manter a tomada de O₂ constante, comprometendo assim as chances de sobrevivência em ambientes hipóxicos por períodos longos.
- b. O NPE, na concentração utilizada no presente estudo, não alterou as respostas ventilatórias da espécie, sugerindo que os mecanismos homeostáticos foram suficientes para manter a resposta ventilatória frente à hipóxia ambiental.
- c. Todos os grupos experimentais apresentaram capacidade de manter constante a extração de O₂ da corrente ventilatório (EO₂) durante hipóxia.
- d. A concentração de NPE utilizada não teve efeito sobre a frequência cardíaca, sugerindo que o surfactante não comprometeu o funcionamento normal do coração de *O. niloticus*.
- e. A exposição ao NPE induziu aumento da frequência de centros melanomacrofágicos no fígado e baço.
- f. A quantificação dos centros melanomacrofágicos mostrou-se um importante parâmetro biológico para estudos ecotoxicológicos e do impacto ambiental decorrente da exposição à xenobióticos, particularmente ao NPE.
- g. A exposição a concentrações subletais e ambientalmente relevantes de NPE pode comprometer a sobrevivência da espécie estudada em ambientes hipóxicos.
- h. Os resultados apontam para a necessidade de inclusão do nonilfenol etoxilado na legislação que regulamenta limites máximos permitidos de substâncias em ambientes aquáticos para a manutenção da vida.

7. REFERÊNCIAS

- ABDULLA BIN-DOHAISH, E. J. The effects of 4-nonylphenol contamination on livers of Tilapia fish (*Oreochromis spilurs*) in Jeddah. **Biological Research**, v. 45, n. 1, p. 15–20, 2012.
- ADEDEJI, O.B., et al. Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*). **Afr. J. Biotechnol**, v. 8 (16), p. 3940–3946. 2009.
- ADEYEMO, O.K. Haematological profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to lead. **Turk. J. Fish Aquat. Sci**, v. 7, p. 163–169. 2007.
- AFFONSO, E.G. O gás sulfídrico e a respiração de duas espécies de peixe teleósteos *Hoplosternum littorale* e *Colossoma macropomum*: distribuição, tolerância e adaptação, 107p. 1999.
- AGIUS C. Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissue and age related changes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 5, p. 597–606. 1981
- AGIUS, C.; AGBEDE, S. A. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**, v. 24, n. 4, p. 471–488, 1984.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, n. 9, p. 499–509, 2003.
- AGNISOLA, C; TOTA, B. Structure and function of the fish cardiac ventricle: flexibility and limitations. **Cardioscience**, v. 5, p. 145–153. 1994.
- AGUIAR, L.H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F.T. The effects of temperatura on the cardiorespiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. **J. Therm. Biol.**, v. 27, p. 299-308, 2002.
- AHEL M, et al. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. **Environ Pollut**, v. 79, p. 243–248. 1993.
- AHEL, M.; GIGER, W.; SCHAFFNER, C. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-II. Occurrence and transformation in rivers. **Water Research**, v. 28, n. 5, p. 1143–1152, 1994.
- ALI, T.E.; LEGLER, J. Developmental toxicity of nonylphenol in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Indian Journal of Marine Sciences**, Amsterdam, v. 40 (4), p. 509-515. 2011.
- ANELLI Jr, L.C. **Efeitos de diferentes formulações comerciais do herbicida Roundup® sobre a função cardiorrespiratória de matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae)**. 92p. 2010.
- ARCAND-HOY, L., BENSON, W.H. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. **Environ. Toxicol. Chem**, v. 17. 1998.
- ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the senegales sole *solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n. 1, p. 62-72, 1999.
- ASHFIELD, L.A. et al. Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. **Environ. Toxicol. Chem**, v. 17 (3), p. 679–686. 1998.
- AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 9-10, p. 817-834, 2004.

- AWARD, P. Science Education Partnership Award +. 2011.
- BERALDO, D. A. D. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e nonilfenols em águas superficiais da cidade de Americana, SP.** p. 79, 2012.
- BERNET, D. et al. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25–34, 1999.
- BHATTACHARYA, H.; XIAO, Q.; LUN, L. Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (*Puntius conchonius*): A biochemical and histopathological evaluation. **Tissue and Cell**, v. 40, n. 4, p. 243–249, 2008.
- BOMBONATO, M. T. S. et al. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 81–85, 2007.
- BRAVO, J.E.B. Contaminantes emergentes en el agua. **Revista Digital Universitaria**, México v. 10, n. 8, p.1-7. 2009.
- BRUSLÈ J.; ANADON G.G. The structure and function of fish liver. In: Fish Morphology (ed. by J.S.D. Munshi & H.M. Dutta), pp. 77–93. **Science Publisher**, New York. 1996.
- BUCKE, D.; DIXON, P.F. **Serological and histopathological studies on fish exposed in vitro to contaminated harbour sludge.** International Council for the Exploration of the Sea (ICES), Copenhagen, E:35.1992.
- BUCKE, D.B.; WATERMAN S. FEIST. Histological variations of hepato-splenic organs from the North Sea dab, *Limanda limanda*. **Journal of Fish Diseases**, 7 (4), 255–268. 1984.
- BUCKLEY, J.A., et al. Changes in blood chemistry and blood cell morphology in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* following exposure to sublethal levels of total residual chlorine in municipal wastewater. **J. Fish Res.** 1976.
- BURKHARDT-HOLM, P. et al. Waste-water management plant effluents cause cellular alterations in the skin of brown trout. **Journal of Fish Biology**, v. 50, p.744-758.1997.
- CAI, W., et al. Effect of the pollution level on the functional bacterial groups aiming at degrading bisphenol A and nonylphenol in natural biofilms of an urban river. **Environ Sci Pollut Res**, v.15, p,15727-38. 2016.
- CAILLEAUD, K., et al. Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates. **Chemosphere**, v. 70, p. 281–287. 2007.
- CARDOSO, T. P. et al. Concentração de mercúrio e análise histopatológica em músculo, rim e cérebro de peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) coletados na praia de Itaipu - Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural [online]**, v. 39, n. 2, p. 540-546, 2009.
- CARRASCHI, S.P. et al. Toxicidade aguda e risco ambiental de surfactantes agrícolas para o guaru, *phalloceros caudimaculatus* (pices: poecilidae). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.7, n.1, 2012.
- CARVALHO, A.R.M., et al. Occurrence and analysis of endocrine-disrupting compounds in a water supply system. **Environ Monit Assess.** 187: 139. 2015.
- CHERVINSKI, J. **Environmental physiology of tilapias.** In The Biology and Culture of Tilapia (R. S. V. Pullin & R. H. Lowe, eds), pp. 119-128. Proceedings of the 7th ICLARM Conference. Manila, Philippines: International Center for Living Aquatic Resources Management. 1982.

CHRISTENSEN, L. J. et al. **The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus* (L.)**. In Proceedings from the Fifth SETAC Europe Congress, Copenhagen, P37, p. 164. 1995.

CIMINI, V.; MARESCA, A.; TAJANA, G.; TOTA, B. On the heterogeneity of the fish heart ventricle: I. Preliminary morphological observations. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 53, 543–548. 1977.

CIONNA, C. et al. Effects of nonylphenol on juveniles and adults in the grey mullet, *Liza aurata*. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 449–454, 2006.

COLDHAM, N. G. et al. Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Drug Metabolism and Disposition**, v. 26, n. 4, p. 347–354, 1998.

COOMBS, S. et al. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. **Encyclopedia of Fish Physiology**, v. 1, p. 476–488, 2011.

CORRÊA, C.F. **Efeitos das reduções graduais do oxigênio ambiental sobre a função cardio-respiratória de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) (Teleostei, Serrasalmidae)**. 109p, 1996.

COX, C. Nonylphenol and related chemicals. **J. Pesticide Reform**, 16, 15-20.1996.

CRAWSHAW, G. J.; WEINKLE, T. K. Clinical and Pathological Aspects of the amphibian liver. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, n. 3, p. 165-173, 2000.

DA SILVA, F. V. et al. Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados: Uma visão ambiental. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 20, n. 1–2, p. 1–12, 2007.

DAVIS, J.C. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. **J. Fish. Res. Board Can.** 32, 2295–2332.1975.

DEJOURS, P. Principles of Comparative Respiratory Physiology. **Elsevier**, New York. 1981.

DELAVECHIA, M.L. **Respostas cardio-respiratórias de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* (SCHWARTZ, 1983) às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente**. 324p, 1994.

DI CORCIA, A. et al. Occurrence and abundance of dicarboxylated metabolites of nonylphenol polyethoxylate surfacants in treated sewages. **Environ Sci Technol** 34:3914–3919. 2000.

DI GIULIO, R.T.; NEWMAN, M.C. Ecotoxicologia. in: **Fundamentos em toxicologia de Cassarett e Doul**. Porto Alegre: AMGH, 2012. Cap.29, p.392-396.2012.

DIAZ-SATIZABAL, L.; MAGOR, B. G. Isolation and cytochemical characterization of melanomacrophages and melanomacrophage clusters from goldfish (*Carassius auratus*, L.). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 48, n. 1, p. 221–228, 2015.

DUTTA, H.M. A composite approach for evaluation of the effect of pesticides on fish, In: Munshi, J. S. D., Dutta, H. M. (Eds.), *Fish Morphology, Horizon of new research* Science Publisher Inc., USA, pp. 249-277. 1997.

ELLIS, A.E. Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Journal of Fish Biology* 8: 143-156. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 20: 2552-2560. 1976.

EPA, **Environmental Protection Agency**. Nonphenol and nonylphenol ethoxylates action plan. U.S. 2010.

ESTEBAN, S., et al. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and

estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. **Science of the Total Environment**, v.466–467, p.939–951. 2014.

FAGERLAND, H. A. S. et al. Pathological pigmentation in cardiac tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with cardiomyopathy syndrome. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 1–7, 2013.

FANTA, E.; RIOS, F.S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A.C.C.; FREIBERGER, S. Histopathology of fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p.119-130, 2003.

FERNANDES, C., Monitoring pollution in Esmoriz–Paramos lagoon, Portugal: liver histological and biochemical **Fish Biology**. Vol. 50: 744-758. 2008.

FERNANDES, M.N. & MORON, S. E. **Respiração e Adaptação Respiratórias. in: Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. São Paulo: Funep, 2014. Cap.10, p. 203-231, 2014.

FERNANDES, M.N. & RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **J. Fish Biol.** 35, 509–519. 1989.

FERNANDES, M.N.; BARRIONUEVO, W.R; RANTIN, F.T. Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of South American Prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. **J.Fish Biol**, v. 46, p. 123-133, 1995.

FISHELSON L. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. **Journal of Morphology** 267, p.:57– 69, 2006.

FOURNIE J.W., et al. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. **Journal of Aquatic Animal Health** 13, 105–116. 2001.

FRANCO, S. **Alquiflenóis em água superficial: estudo analítico e determinação no Ribeirão das Cruzes (Araraquara, SP)** p. 146, 2013.

GALIS, F.; BAREL, C.D.N. Comparative functional morphology of the gills of African lacustrine Cichlidae (Pisces, Teleostei). An eco-morphological approach. **Neth. J. Zool.**, v. 30 (2), 392-430. 1980

GERNHÖFER, M., et al. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, n.3-4, p. 241-260, 2001.

GIMENO, S., et al. Feminization of male carp. **Nature** 384, 221–222. 1996.

GRANMO, A.; KOLLBERG, S. uptake pathways and elimination of a nonionic surfactant in cod (*Gadus morrhua* L.) **Water Research**. Vol. 10.pp.189-194. Pergamon press. 1976.

GRAY, M.A.; METCALFE, C.D., 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nonylphenol. **Environ. Toxicol. Chem.** 16 (5), 1082–1086. 1997.

GRIVAS, J. et al. Cardiac repair and regenerative potential in the goldfish (*Carassius auratus*) heart. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 163, p. 14–23, 2014.

GUERRA, C.D.R. **Respostas cardio-respiratórias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente**. 114p, 1992.

HAAPARANTA, A. et al. Do macrophage centres in freshwater fishes reflect the differences

in water quality? **Aquatic Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 253–272, 1996.

HANDY, R.D. & EDDY, F.B. The absence of mucous on the secondary lamellae of unstressed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Fish Biology**. Vol. 38: 153-155.1991.

HANSEN, J.D. 1997. Characterization of Rainbow trout terminal deoxynucleotidyl transferase structure and expression. TdT and RAG1 co-expression define the trout primary lymphoid tissues. **Immunogenetics** 46, 367-375. 1997.

HART, J.E. Endocrine pathology of estrogens: species differences. **Pharmacol. Ther.**, v. 47 (2), p. 203–218. 1990.

HEATH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**, second ed. Lewis Publishers, Boca Raton. 1995.

HEMALATHA, S.; BANERJEE, T.K. Histopathological analysis of sublethal toxicity of zinc chloride to the respiratory organs of the air-breathing catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Biological Research**, v. 30, p. 11-21.1997.

HERMAN, R.L.; KINCAID, H.L. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. **Aquaculture**, v. 72, p.165–172. 1988.

HERRAEZ M.P.; ZAPATA A.G. Structural characterization of the melano-macrophage centres (MMCs) of goldfish *Carassius auratus*. **European Journal of Morphology**, v. 29, p. 89–102. 1991.

HERRAEZ, M. P.; ZAPATA, A. G. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, n. 1–4, p. 117–126, 1986.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: Biological Indicators of stress in fish. **American Fisheries Society Symposium**, v. 8, p. 51-66, 1990.

HOFER, R.; JENEY, Z.; BUCHER, F. Chronic effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and ammonia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry at water criteria limits. **Water Research**, v. 29, n. 12, p. 2725- 2729. 1995.

HÖHNE, C.; PÜTTMANN, W. Occurrence and temporal variations of the xenoestrogens bisphenol A, 4-tert-octylphenol, and tech. 4-nonylphenol in two German wastewater treatment plants. **Environ Sci Pollut Res**, v.15, p.405–416.2008.

HUGHES, G.M., ALBERS, C., MÜSTER, D., GÖTZ, K.H. Respiration of the carp, *Cyprinus carpio* L., at 10 and 20 °C and the effects of hypoxia. **J. Fish Biol.**, v. 22, p. 613–628. 1983.

JIANG, W., et al., Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China. **J. of Env. Sciences**, v.24, p. 2-25. 2012.

JOBLING, S., et al. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. **Env. Toxicol. Chem.**, v. 15, p.194–202. 1996.

JOBLING, S.; SUMPTER, J. P. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 27, n. 3–4, p. 361–372, 1993.

KALININ, A. L.; GLASS, M. L.; TADEU RANTIN, F. A comparison of directly measured and estimated gill ventilation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 122, n. 2, p. 207–211, 1999.

KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; GLASS, M. L. Dependence on body size of respiratory

function in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during graded hypoxia. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 47–51, 1993.

KALININ, A.L., RANTIN, F.T., FERNANDES, M.N., GLASS, M.L. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. INPA Ed., Manaus, pp. 191–202. 1996.

KANNAN K., et al. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in fish, sediment, and water from the Kalamazoo River, Michigan. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 44, p.77–82.2003.

KEEN, P. L. et al. Effects of dietary exposure of 4-nonylphenol on growth and smoltification of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Science of the Total Environment**, v. 349, n. 1–3, p. 81–94, 2005.

KELLY-REAY K. & WEEKS-PERKINS B.A. Determination of the macrophage's chemiluminescent response in *Fundulus heteroclitus* as a function of pollution stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 4, p.95–105. 1994.

KHAN, R.A. Histopathology in winter flounder, *Pleuronectes americanus*, following chronic exposure to crude oil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.54, p.297–301. 1995.

KHAN, R.A., et al. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.26, p.95–102. 1994.

KIME, D.E. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. **Sci. Total Environ.**, v.225 (1/2), p.3–11. 1999.

KÖLBEL H. & KURZENDTIRFER P. Konstitution and Eigenschaffen von tensiden. Fortschr. **Chem. Forsch.** v.12,p.252-348.1969.

KRANZ H. & PETERS N. Melano-macrophage centres in liver and spleen of ruffe (*Gymnocephalus cernuus*) from the Elbe Estuary. **Helgolander Meeresuntersuchungen**, v. 37, p.415–424. 1984.

KRANZ, H. Changes in splenic melano-macrophage centers of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.6, p.167–174. 1989.

KURTOVIC, B. Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). **Acta adriat**, v. 49(2), p. 147-154. 2008.

LEWIS, S. K.; LECH, J. J. Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 26, n. 8, p. 813–9, 1996.

LINS, J. A. P. N., et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**. Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LISBOA FILHO, N. D. S. L. **Desenvolvimento E Validação De Método Analítico Para Determinação De Interferentes Endócrinos: Aplicação Em Amostras De Água Da Baía De Todos Os Santos**, BA. p. 1–87, 2012.

LOMHOLT, J.P., JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp: how it affects oxygen uptake, ventilation and oxygen extraction from water. **Physiol. Zool**, v.52, p. 38–49. 1979.

- LOUMBOURDIS N.S. & VOGIATZIS A.K. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.53, p. 52–58. 2002.
- LYLIAN, H. et al. Histopathology from liver of tuvira (*Gymnotus* spp.) parasitized by larvae of nematodes. v. 2016, p. 1233–1239, 2016.
- MADHU, S.; POOJA, C. Acute Toxicity of 4-nonylphenol on Haematological profile of Fresh water Fish *Channa punctatus*. v. 4, p. 25–31, 2015.
- MADSEN, S.S., et al. Effects of 17- β -estradiol and 4 nonylphenol on smoltification and vitellogenesis in atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 17, p.303–312. 1997.
- MANN, R. M.; BODDY, M. R. Biodegradation of a nonylphenol ethoxylate by the autochthonous microflora in lake water with observations on the influence of light. **Chemosphere**, v. 41, n. 9, p. 1361–1369, 2000.
- MANWELL C. & BAKER C. M. A. A study of detergent pollution by molecular methods: Starch gel electrophoresis of a variety of enzymes and other proteins. **J.Mar. Biol. Ass.**, v. 47, p. 659–675. 1967.
- MARTINS, N.D., et al., Microcystin-LR: How it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 84, p. 154-159, 2011.
- MARUYAMA K., et al. Seasonal changes in ethylene oxide chain length of poly(oxyethylene) alkylphenyl ether nonionic surfactants in three main rivers in Tokyo. **Environ Sci Technol**, v.34, p.343–348. 2000.
- MATTIAS, A. T.; RANTIN, F. T.; FERNANDES, M. N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 120, n. 2, p. 311–315, 1998.
- MAZON, A.F., et al. Acute copper exposure in freshwater fish, Morphological and physiological effects. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., (Eds.), *Biology of Tropical Fishes*, INPA, Manaus, pp. 263-275. 1999.
- MEHRLE, P.M.; MAYER, F.L. Biochemistry/physiology. In: Rand, G. M; PETROCELLI, S. R. *Fundamental of aquatics toxicology: Methods and application*. New York: **Hemisphere**, p.264-274, 1984.
- MIDHILA, E. M.; CHITRA, K. C. Nonylphenol-induced hepatotoxicity in the freshwater. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 5, n. 3, p. 1–5, 2015.
- MONTEIRO, D.A., et al. Cardiorespiratory responses to graded hypoxia in the neotropical fish matrinxã (*Brycon amazonicus*) and traira (*Hoplias malabaricus*) after waterborne or trophic exposure to inorganic mercury. **Aquatic Toxicology**, v.140 – 141, p.346 – 355. 2013.
- MOREIRA, M. et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). **Environmental Technology**, v. 32, n. 12, p. 1409–1417, 2011.
- MORO, G.V., et al. **Espécies de peixe para piscicultura. in: Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília: Embrapa, Cap.1, p.29-68, 2013.
- MOURA, J. A. **Estudo da eficiência de estações de tratamento de esgoto - ETE e estações de tratamento de água - ETA na eliminação de resíduos de estrógenos naturais e sintéticos na Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré (UGRHI 13)**. 2009.
- MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M., *Sistemas Respiratórios*. In: *Princípios de Fisiologia Animal* 2ªed. Porto Alegre: **Artmed**. P.412-467. 2010.

NAKAMURA, H.; SHIMOZAWA, A.; KIKUCHI, S.-I. Melano-macrophage centre-like structure in the heart of the Medaka, *Oryzias latipes*. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 175, n. 1, p. 59–63, 1993.

NAYLOR C.G., et al. In: Proceedings of the 4th World Surfactants Congress, Barcelona, Spain, v. 4, p. 378. 1996.

NILSSON, S.; SUDIN, L. Gill blood flow control. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v.119,p.137-147, 1998.

OLIVEIRA, E.G.; Santos, F.J.S.; Pereira, A.M.L. e Lima, C.B. Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria. **Circular Técnica**, v. 45, n. 12, p.1-12. 2007.

OLOLADE, I.A. & OGinni, O. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings. **J. Environ. Chem. Ecotoxicol**, v.2, n.2, p.14–19.2010.

OVERSTREETAB, R. M.; THULINC, J. **Response by *Plectropomus leopardus* and other Serranid Fishes to *Pearsonellum corventum* (Digenea: Sanguinicolidae), including Melanomacrophage Centres in the Heart**. 1989.

PÄRT, P.; SVANBERG, O.; BERGSTROM, E. The influence of surfactants on gill physiology and cadmium uptake in perfused rainbow trout gills. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 9, 135-144.1985.

PASSANTINO, L. et al. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, n. 3, p. 241–250, 2014.

PASSANTINO, L. et al. Lymphoreticular System in Fish: Erythrocyte-Mediated Immunomodulation of Macrophages Contributes to the Formation of Melanomacrophage Centers. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 27, n. 1, p. 147–161, 2005.

PEDERSEN, S. N. et al. In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Science of the Total Environment**, v. 233, n. 1–3, p. 89–96, 1999.

PERRY S.F.; LAURENT P. Environmental effects on fish gill structure and function, p.231-264. In: Rankin J.C. & Jensen F.B. (ed.), **Fish Ecophysiology**. Chapman and Hall, London.1993.

PHILIPPART, J. C.; RUWET, J. C.. Ecology and distribution of tilapias. In *The Biology and Culture of Tilapia*. (R. S. V. Pullin & R. H. Lowe, eds), pp. 15-59. Proceedings of the **7th ICLARM Conference**. Manila, Philippines: International Center for Living Aquatic Resources Management. 1982.

POPPE, T. T.; TAKSDAL, T. Ventricular hypoplasia in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Diseases of aquatic organisms**, v. 42, n. 1, p. 35–40, 2000.

RABITTO, I. S. et al. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 2, p. 147–156, 2005.

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da Bacia do Rio Atibaia**.2007.

RANDALL, D.J.; BUEGGREN, W.; FRENCH, K. Gas exchange and acid-base balance. In: Randall, D.J.; Bueggren, W.; French, K. (eds). **Animal Physiology-Mechanisms and Adaptations**. New York: W.H. Freeman and Co.p.517-570. 1997.

RANTIN, F. T. et al. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **Journal of Fish Biology**, v. 41, n. 5, p. 805–812, 1992.

RANTIN, F.T. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environment hypoxia. **Environ. Biol. Fish.**, v. 36, p. 93-97, 1993.

RAZIA, S., et al. **Histological changes in immune and endocrine organs of quail embryos: Exposure to estrogen and nonylphenol.** 2006.

RHODES, L.D., et al. Epizootic characteristics of hepatic and renal lesions in English sole, *Parophrys vetulus*, from Puget Sound. **Journal of Fish Biology**, 31, 395–407. 1987.

RIBEIRO, H. J. et al. Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. **Cell and Tissue Research**, v. 346, n. 3, p. 417–425, 2011.

RIBELIN, W. E.; MIGAKI, G. (Ed.). **The pathology of fishes.** Madison: The University of Wisconsin Press, 1975

RICHARDSON, S.D.; TERNES, T.A. Water analysis: emerging contaminants and current issues; **Anal.Chem.**, v.83 p. 4614. 2011.

RIVERO, C.L.G. et. al. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (pisces: cichlidae). **Ecotoxicology**, Brasília n.17 p. 732 – 737. 2008.

ROBERTS, J. E. T. R. J. An aeromonad epidemic in the brown trout (*Salmo trutta* L.). **Journal of Fish Biology**, v. 4, n. 3, p. 441–451, 1972.

RODGERS, G. G.; TENZING, P. G; CLARK, T.D. Experimental methods in aquatic respirometry: the importance of mixing devices and accounting for background respiration. **Journal of Fish Biology** 2016.

ROSEWARNE, P. J.; WILSON, J. M.; SVENDSEN, J. C. Measuring maximum and standard metabolic rates using intermittent-flow respirometry: A student laboratory investigation of aerobic metabolic scope and environmental hypoxia in aquatic breathers. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 265–283, 2016.

SALLA, R.F. **Efeitos do *Batrachochytrium dendrobatidis* sobre a morfologia hepática e a função cardíaca de duas espécies de anfíbios.** p.99. 2014.

SANTER, R.M., 1985. Morphology and innervation of the fish heart. Adv. Anat. **Embryol. Cell Biol.** 89, 1–102, 1985).

SATCHELL, G.H. **Physiology and form of fish circulation**, New York: Cambridge University Press, 235p. 1991.

SAUNDERS, R.L. The irrigation of the gills of fishes. II. Efficiency of oxygen uptake in relation to respiratory flow, activity and concentrations of oxygen and carbon dioxide. **Can. J. Zool.** 40, 817–862. 1962.

SAYED, A. E. H.; MEKKAWY, I. A.; MAHMOUD, U. M. Histopathological Alterations in some Body Organs of Adult *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Exposed to 4-Nonylphenol. **Zoology**, p. 206, 2012.

SCHWAIGER, J. et al. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquatic Toxicology**, vol. 51, p. 69–78, 2000.

SEKI, M., et al. Effect of 4- nonylphenol and 4- tert octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka (*Oryzias Latipes*), **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 22:1507-1516. 2003.

SELVARAJ, K.K., et al. GC–MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 99, p. 13–20. 2014.

SODRÉ, F.F. Interferentes endócrinos como contaminantes emergentes: uma questão de saúde pública. **Artigos temáticos do Aqqua**, Brasília n.1, p.1-8. 2012.

STEFFENSEN, J. F. Some errors in respirometry of aquatic breathers: How to avoid and correct for them. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 49–59, 1989.

STEFFENSEN, J. F.; LOMHOLT, J. P.; JOHANSEN, K. Gill ventilation and O₂ extraction during graded hypoxia in two ecologically distinct species of flatfish, the flounder (*Platichthys flesus*) and the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Environmental Biology of Fishes**, v. 7, n. 2, p. 157–163, 1982.

STEFFENSEN, J.F. **Oxygen consumption of fish exposed to hypoxia: Are they all oxyregulators or are any oxyconformers?** Fish physiology, toxicology, and water quality. US Environmental Protection Agency. In: Proceedings of the Ninth International Symposium, Capri, Italy, pp. 239–250. 2006.

SUN, H. W. et al. The bioconcentration and degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates by *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 1255–1270, 2014.

SVENDSEN, M.B.S; BUSHNELL, P.G; STEFFENSEN, J.F. Design and setup of intermittent-flow respirometry system for aquatic organisms. **Journal of Fish Biology**, v.88, p. 26–50. 2016.

SWISHER R. D.; O'ROURKE J. T. & TOMLINSON H. D. Fish bioassays of linear alkylate sulfonates (LAS) and intermediate biodegradation products. **J. Am. Oil Chem.Soc.** 41, 746-752. 1964.

TEUSCHLER, L.K., et al. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 58, p. 1283–1291. 2005.

THOMAZ, J.M., MARTINS, N.D., MONTEIRO, D.A., RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Cardiorespiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p. 1413–1424. 2009.

THOPHON S., et al. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v. 121, p.307-320. 2003.

TREWAVAS, E. **Tilapias: Taxonomy and speciation**. In: The biology and culture of tilapias, 7, Proceedings. Phillipines: RSV Pullim, 1983.p. 1-432, 1982.

UGUZ, C. et al. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). **Environmental Research**, v. 92, n. 3, p. 262–270, 2003.

VAL, A.L. **Adaptations of fish to extreme conditions in fresh water. In: The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life.** (J.E. Bicudo, ed.) pp: 43-53. CRC Press. Boca Raton. 1993.

VAN DER OOST R., BEYER J. & VERMEULEN N.P. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAZQUEZ-DUHALT, R., MARQUEZ-ROCHA, F., PONCE, E., LICEA, A.F., VIANA, M.T. Nonylphenol, and integrated vision of a pollutant. **Appl. Ecol. Environ. Res.** 4,1–25. 2005.

VINCENT, M.D.V; SNEDDON, J. Nonylphenol: an overview and its determination in oysters and wastewaters and preliminary degradation results from laboratory experiments. **Microchem J.** 2009.

WEBER, R.E. **Intraspecific adaptation of hemoglobin function in fish to environmental oxygen availability.** p. 87-102. In: A.D.F. Addink and Spronk (ed.) Exogenous and Endogenous Influences on Metabolic and Neural Control, Vol. 1, Biochemistry. Oxford, Pergamon Press.1982.

WESTER, P.W.; ROGHAI, C.J. **Monitoring of sublethal chronic effects in fish: the pathomorphological approach.** In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. (1994). Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Fishing News Books, Cambridge. Cap.1, p. 5-14. 1994.

WHO, **World Health Organization.** Integrated risk assessment: nonylphenol case study. Integrated Risk Assessment: Nonylphenol Case Study. Geneva, Switzerland. 2002.

WOLKE, R. E. Piscine macrophage aggregates: A review. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, n. C, p. 91–108, 1992.

YING, G-G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment - a review. **Environment International**, v. 32, p. 417-431, 2006.

YOKOTA, H., et al. Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*), 2001.

ZERAIK, V.M. **Distribuição e orientação dos quimiorreceptores de O₂ branquias em tilápi-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): Controle das respostas cardiorrespiratórias à hipóxia.** 92p. 2012.