

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E METABÓLICAS NO TELEÓSTEO DE ÁGUA DOCE
MATRINXÃ, *BRYCON CEPHALUS* (GÜNTHER, 1869) EXPOSTO AO ORGANOFOSFORADO
METIL PARATION (FOLISUPER 600 BR[®])

TIAGO DE REZENDE BARRETO

SÃO CARLOS-SP
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E METABÓLICAS NO TELEÓSTEO DE ÁGUA
DOCE MATRINXÃ, *BRYCON CEPHALUS* (GÜNTHER, 1869) EXPOSTO AO
ORGANOFOSFORADO METIL PARATION (FOLISUPER 600 BR[®])

TIAGO DE REZENDE BARRETO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

SÃO CARLOS-SP
2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B273am

Barreto, Tiago de Rezende.

Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600BR[®]) / Tiago de Rezende Barreto. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

79 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Morfologia. 2. Toxicologia. 3. Brânquias. 4. Células interrenais. 5. *Brycon cephalus*. I. Título.

CDD: 574.4 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Dissertação de Tiago de Rezende Barreto

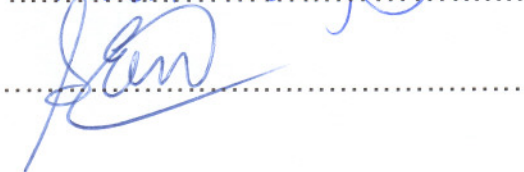
Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes



Profa. Dra. Lúcia Helena de Aguiar



Prof. Dr. Sandro Estevan Moron



Dedico esse Trabalho:

À Daniele, minha esposa, minha vida, meu amor...!

À meus Pais e minhas irmãs, que quanto mais duvidam, mais me estimulam.

À minha nova família formada aqui em São Carlos pelos momentos de descontração e de muita força.

AGRADECIMENTO

À Deus que me dá muita saúde, muita força e um grandíssimo amor à minha vida.

À Dani, que me dá a maior força e me ajuda muito em tudo o que eu faço.

Aos meus Pais pela atenção no decorrer do mestrado, pela dúvida, e pela ajuda, ainda que distante sei que nunca fui esquecido...

Ao meu sogro e minha sogra, que eu adoro e sempre me dão a maior força e me ajudam sempre quando eu mais preciso, meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora Marisa, pela confiança e orientação quando me aceitou dentro de seu laboratório desde o princípio lá na graduação, quando comecei a preparar as minhas primeiras lâminas e a cada dia aprendo mais.

À todos os colegas de laboratório do LZBC pela convivência amigável, eventuais dúvidas discutidas e se não sanadas ao menos encaminhadas num caminho de saná-las.

Aos colegas que contribuíram diretamente nessa dissertação: Cléo, Fábio (pelo Kit de dosagem do cortisol), Renner, Marise (pelo auxílio nas análises de intermediários metabólicos), Diana e Cléverson.

Ao professor Gilberto Moraes do Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução, minha admiração pelo imenso bom humor e conhecimento compartilhado, minha sincera gratidão por utilizar de seu laboratório e aprender procedimentos de análises de alguns intermediários metabólicos.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica Adaptativa pela ajuda com análises de intermediários metabólicos.

E aos meus colegas salva vidas que sabem como é duríssimo engolir muitos sapos para conseguir fazer o bem de verdade no momento em que uma pessoa mais precisa e que sabem bem de perto como foi muito dura esta minha caminhada. Ao Denis, ao George (*in memoriam*), ao Jefferson, ao Oziél, ao Ronaldo...Valeu rapaziada!!!...Forte abraço!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABELAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O ambiente aquático.....	1
1.2. Contaminação do ambiente aquático.....	2
1.3. Organofosforados – Metil Paration.....	4
1.3.1. Efeitos do MP em peixes.....	8
1.4. Alterações Morfofuncionais.....	10
1.4.1. Células interrenais.....	10
1.4.2. As Brânquias – Importância e função.....	11
1.5. Intermediários Metabólicos.....	13
1.6. O Matrinxã, <i>Brycon cephalus</i> – Características Gerais.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Procedência e manutenção em laboratório.....	19
3.2. Desenho experimental.....	20
3.3 Análises sanguíneas e hepáticas.....	21
3.4 Análises morfométricas.....	24
3.4.1. Células interrenais.....	24
3.4.2. Brânquias.....	25
3.5 Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Análises Morfológica e Morfométrica das Células Interrenais e das Brânquias..	28
4.1.1. Células Interrenais.....	28
4.1.2. Brânquias.....	32
4.2. Análises sanguíneas.....	41
4.3. Intermediários metabólicos.....	51
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula do metilparation (**A**),. Fórmula do metil-paaxon (**B**) cujo enxofre foi substituído pelo oxigênio. 7
- Figura 2.** Exemplar de matrinxã, *Brycon cephalus*. 15
- Figura 3.** Corte mostrando o sistema de vetores-teste que foi utilizado para marcação dos limites do núcleo (**A**) e da célula (**B**). Região próxima à luz de vaso (LV) exibindo uma região com células interrenais (CI). Observe 4 raios marcados à partir das proximidades do centro do núcleo para cálculo das áreas do núcleo e da célula. Barra de escala = 10 µm. Coloração: Azul de Toluidina e Fucsina Básica. 25
- Figura 4.** Rim anterior de *B. cephalus* do grupo controle mostrando o tecido ricamente irrigado (*). G, glomérulo. Barra de escala = 10 µm. Coloração: Azul de Toluidina e Fucsina Básica. 29
- Figura 5.** Rim anterior de *B. cephalus* do grupo controle (**A**) e do grupo MP 96 h (**B**) mostrando células interrenais (CI) próximas a um capilar (*). Barra de escala = 10 µm. Coloração: Azul de Toluidina e Fucsina Básica. 30
- Figura 6.** Valores médios (\pm SEM) da área das células interrenais (**A**); dos núcleos dessas células (**B**); e razão área dos núcleos/área das células (**C**) de *B. cephalus* (n = 6) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa (p< 0,05). 31
- Figura 7.** Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* do grupo controle mostrando as lamelas (L) no filamento branquial (F). Note o epitélio estratificado do filamento e o epitélio bicamada das lamelas. Células-cloreto (CC) estão distribuídas no epitélio do filamento. CPV - célula pavimentosa, CP - célula pilar, SVC - seio venoso central (**A**); Barra de escala = 50 µm. Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* do grupo controle mostrando a localização das células mucosas (CM) na borda do filamento. Note a ausência de lamelas nessa região. CPV - célula pavimentosa, Ar – artéria(**B**). Barra de escala = 30µm. 35
- Figura 8.** Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* exposto a 2 ppm de MP durante 96h. Note a espessura das lamelas e o número das células-cloreto (CC) no epitélio do filamento (F) e lamelas (L). PVC - célula pavimentosa. Barra de escala = 50 µm. 37
- Figura 9.** Valores médios (\pm SEM) da altura do epitélio do filamento branquial (**A**) e das lamelas (**B**), da distância interlamelar (**C**) e da altura da lamela (**D**) de *B. cephalus* (n = 6) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa (p< 0,05) 38
- Figura 10.** Valores médios (\pm SEM) da área das células-cloreto (**A**); das células mucosas (**B**); das células pavimentosas (**C**) nos filamentos branquiais de *B. cephalus* (n = 6) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa (p< 0,05). 39

Figura 11. Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* do grupo controle mostrando as lamelas. Note o epitélio da lamela e os espaços sangüíneos (*) formados pelas flanges das células pilares (CP) e o canal marginal (CnM) formado pela flange da célula pilar e célula endotelial. PVC - célula pavimentosa (A). Barra de escala = 10 μm ; Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* exposto a 2ppm de MP durante 96h. Note a redução dos espaços sangüíneos (*) e canal marginal (CnM). CC – célula-cloreto, CP - célula pilar, PVC - célula pavimentosa. A seta dupla indica deslocamento e ruptura do epitélio da lamela.(B) Barra de escala = 10 μm . 40

Figura 12. Células sanguíneas de *B. cephalus*. A. Linfócito (L) e eritrócito (Ert); B. Monócito (M); C. Trombócito (t); D. Célula Granulocítica Especial (CGE). Barra de escala = 10 μm . 44

Figura 13. Valores médios (\pm SEM) do hematócrito (A); da concentração de hemoglobina (B); e da contagem de eritrócitos (C) do sangue de *B. cephalus* (n = 6) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 45

Figura 14. Valores médios (\pm SEM) do volume corpuscular médio, VCM, (A); da hemoglobina corpuscular média, HCM, (B); e da concentração de hemoglobina corpuscular média, CHCM, (C) do sangue de *B. cephalus* (n = 6) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 46

Figura 15. Valores médios (\pm SEM) da contagem de Leucócitos (A); e da contagem Trombócitos (B) do sangue de *B. cephalus* (n = 6) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 47

Figura 16. Valores médios (\pm SEM) da porcentagem de Monócitos (A); da porcentagem de Linfócitos (B); e da porcentagem de Células Granulocíticas Especiais, C.G.E., (C) do sangue de *B. cephalus* (n = 6) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 48

Figura 17. Valores médios (\pm SEM) da osmolalidade (mOsmol/KgH₂O) plasmática (A) e pH do sangue (B) de *B. cephalus* (n = 6 em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 49

Figura 18. Valores médios (\pm SEM) da concentração plasmática de Cl⁻ (mEq/mL) (A), de Na⁺ (mEq/mL) (B) e de K⁺ (mEq/mL) (C) de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 50

Figura 19. Valores médios (\pm SEM) da concentração de cortisol plasmático (A), glicose plasmática (B) e da concentração de glicose hepática (C) de *B. cephalus* (n = 6 em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 53

Figura 20. Valores médios (\pm SEM) da concentração do lactato plasmático (**A**) e da concentração do lactato hepático (**B**) de *B. cephalus* (n = 6 em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). **54**

Figura 21. Valores médios (\pm SEM) da concentração de piruvato plasmático (**A**) e da concentração de piruvato hepático (**B**) de *B. cephalus* (n = 6 em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). **55**

Figura 22. Valores médios (\pm SEM) da concentração de amônia plasmática (**A**) e da concentração de amônia hepática (**B**) de *B. cephalus* (n = 6 em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). **56**

Figura 23. Nível de organização biológica indicando organização envolvidas em respostas rápidas e mecanismos de ação e em resposta a longo prazo envolvidas em processos de relevância ecológica de acordo com ADAMS (2002). **58**

LISTA DE TABELAS

- Tabela I.** – Histopatologia das brânquias de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2ppm de MP durante 96 horas, indicando a classificação das lesões em estágios de acordo com Poleksic and Mitrovic–Tutundizic (1994) e modificado por Cerqueira e Fernandes (2002). 36
- Tabela II.** Índice médio e erro padrão da média (\pm SEM) das histopatologias encontradas nas brânquias de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm do organofosforado MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 37
- Tabela III.** Valores médios (\pm SEM) das variáveis hematológicas de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm do organofosforado MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 43
- Tabela IV.** Porcentagem de leucócitos (\pm SEM) de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm do organofosforado MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 43
- Tabela V.** Valores médios (\pm SEM) da osmolalidade, pH e concentração de íons plasmáticos de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm do organofosforado MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 43
- Tabela VI.** Valores médios \pm S.E.M de cortisol, glicose e lactato plasmático de matrinxã, *B. cephalus* exposto a 2ppm de metil paration durante 96h. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança ($p < 0,05$). 52
- Tabela VII.** Valores médios \pm erros padrões dos parâmetros bioquímicos hepáticos de matrinxã exposto a 2ppm de metil paration durante 96h. * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança ($p < 0,05$). 52

RESUMO

A introdução de xenobióticos no ambiente aquático é cada vez mais frequente no Brasil, tanto em campos agrícolas, como no tratamento de tanques de cultivo de peixes. No presente estudo foi verificado se o peixe teleósteo de água doce matrinxã (*Brycon cephalus*) quando exposto a uma dose subletal do organofosforado metil paration (MP) sofre alterações morfofuncionais nas células interrenais, brânquias e se há alterações metabólicas nesta espécie. Exemplares de matrinxã juvenis foram separados em dois grupos de 7 animais em aquários de 200 L: um grupo controle mantido sem a presença do organofosforado e o outro grupo foi exposto a 2 ppm de metil paration durante 96 horas. Ambos os grupos tiveram a alimentação suspensa 24 horas antes da transferência para os respectivos aquários-teste, onde permaneceram por 12 horas para aclimação antes do início do experimento. Os peixes expostos ao MP apresentaram diminuição na atividade natatória e foram observadas alterações histológicas nas células interrenais como aumento da área das células, de seus respectivos núcleos e, também da razão área nuclear/área celular, indicando aumento na atividade dessas células, cujo principal produto é o hormônio cortisol que também aumentou significativamente nesses animais. As alterações histológicas nas brânquias foram classificadas como de grau leve para moderada. As análises hematológicas corroboram o fato acima, pois, não houve alterações nas variáveis sanguíneas e nem nos índices hematimétricos. A concentração de glicose plasmática aumentou nos animais expostos ao MP, enquanto a concentração diminuiu no fígado desses animais indicando um efeito glicemiante por parte do fígado. As concentrações de lactato diminuíram tanto no plasma como no fígado dos animais expostos ao MP o que sugere a ausência de um quadro de hipóxia e corrobora com a indicação de que o funcionamento das brânquias foi mantido. As concentrações de piruvato permaneceram sem alterações significativas mas os níveis de amônia aumentaram no plasma e no fígado dos animais expostos a 2 ppm de MP durante 96 horas. Estes resultados sugerem que ocorreu um processo de neoglicogênese de forma a manter um nível de glicose suficiente para a manutenção de um aporte energético para os tecidos. Os resultados mostraram que a exposição de matrinxã a 2 ppm ao metilparation embora seja subletal causa aumento da área das células interrenais, sugerindo ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal e alterações de leve a moderada nas brânquias que apesar disso mantem parcialmente suas funções. As alterações no metabolismo do tecido hepático pode estar associado a demanda de energia para o metabolismo.

ABSTRACT

The xenobiotics influxes into the aquatic systems are continuously increasing in Brazil due to their use in agriculture and to control insects in aquaculture. In the present study, it was evaluated if the exposure of the freshwater teleost fish matrinxã (*Brycon cephalus*) to sublethal concentration of the organophosphorus pesticides methylparathion (MP) induce morphofunctional changes in the interrenal cells and in the gills as well as metabolic changes in this species. Specimens of matrinxã were divided into two groups with 7 animals in each one and kept in aquarium with 200L. One of them was the control group and was kept in water without the presence of MP and the other was the MP group and was exposed to 2 ppm of methyl parathion during 96 hours. Food was suspended for both groups 24 hours before the transference of fish to their respective aquarium and fish were maintained 12 hours in the aquarium for acclimatizing before experiments. Fish exposed to MP reduced the swimming activity and histological changes were observed in the interrenal cells as increasing of cell and nucleus areas and also the ratio nucleus area/cellular area indicating an increase of cell activity, which cortisol is the major corticoid produced by these cells. Plasma cortisol also increased in fish exposed to MP. The histological changes in the gills were classified as slight to moderate. The hematological analysis supports its hypothesis as no change was found in the blood hematology and in their indexes. Glucose concentration in plasma increased in fish exposed to MP while it decreased in the liver. Lactate concentration decreased in plasma and liver of animals exposed to MP suggesting an absence of internal hypoxia and supports the indication that the gill function was partially maintained. Pyruvate concentration did not change, but the ammonia levels increased in plasma and liver in fish exposed to 96h to MP. These results suggest that gluconeogenesis occurred and the high level of glucose was kept high to maintain the energy supply to tissues. In conclusion, the results evidenced that the exposure to 2 ppm of methyl parathion caused an increase of area of interrenal cells suggesting the activation of Hypothalamic-Pituitary-Interrenal axis and slight to moderate changes in the gill tissues although they partially kept their function. The changes in liver metabolism are probably related to the increase of energy demand of fish.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O ambiente aquático

Os ecossistemas aquáticos são altamente dinâmicos, envolvem uma complexa interação entre microorganismos, plantas e animais e são continuamente influenciados pelas alterações climáticas e pela atividade antrópica.

A quantidade de sólidos dissolvidos assim como sua composição varia com sua localização, estação do ano, geologia local e atividade antrópica. A precipitação pluvial tem forte influência na dinâmica dos sistemas aquáticos. Durante os períodos chuvosos, grandes quantidades de partículas do solo são carreadas pelas águas, resultando numa acentuada alteração de cor e aumento da turbidez e quantidade de sólidos suspensos e, conseqüentemente, diminuição da transparência da água. As variações sazonais de temperatura da água dos corpos d'água são parte do regime climático, no qual a temperatura atmosférica é influenciada por fatores como latitude, altitude, estação do ano, período do dia entre outros (GUERESCHI, 2004).

Considerando que de toda a água superficial do planeta, apenas 0,8% corresponde à água doce, a preservação dos ecossistemas aquáticos de água doce é extremamente importante para garantir a sustentabilidade dos recursos naturais (GUERESCHI, 2004) uma vez que não se conhece ainda qual a fração que se encontra contaminada (GALVÃO, 2004). Em ambientes de água doce, a topografia local, hidrologia, biologia, condições climáticas e precipitação determinam a entrada e balanço de poluentes em corpos d'água como lagos, reservatórios e rios (GOUVÊA, 2004). Os processos químicos e biológicos são complementares e intimamente ligados na regulação dos ecossistemas aquáticos (BUFFLE & DE VITRE, 1993 in GOUVÊA, 2004).

É importante ressaltar que os sistemas aquáticos de água doce são bastante heterogêneos e a diversidade da fauna está relacionada com fatores abióticos, como velocidade de fluxo, temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade entre outros fatores, além da presença de competidores e predadores que também podem causar alterações na estrutura de comunidades aquáticas (GUERESCHI, 2004).

A instabilidade dos ecossistemas aquáticos de água doce é uma característica comum, principalmente os ambientes lênticos, devido às modificações na intensidade, duração e época das cheias, disponibilidade de nutrientes, áreas sazonalmente alagáveis com impactos sobre a capacidade biogênica do sistema, sobre ciclos de compostos químicos, fluxo de energia e aspectos da cadeia trófica instalada no ambiente aquático (DABÉS *et al.*, 2001).

Contaminação do ambiente aquático

Além dos fatores naturais, as atividades humanas têm gerado grandes alterações nos ecossistemas aquáticos. O modelo de desenvolvimento humano tem se mostrado altamente impactante principalmente devido a grande produção de resíduos e a introdução de compostos tóxicos na água (GUERESCHI, 2004).

A entrada de poluentes no ambiente aquático ocorre principalmente através das águas superficiais (rios, riachos, enxurradas, etc.) devido à lixiviação química e física efetuada pela água sobre a litosfera, na bacia de drenagem ou provenientes do ar e podem eventualmente atingir o meio aquático em sua forma original ou como produto de transformação (ZAGATTO, 2000 *in* AGUIAR, 2002).

Nas últimas décadas a degradação dos ecossistemas aquáticos tem ocorrido de forma contínua devido aos múltiplos impactos ambientais provenientes das

atividades antrópicas como a mineração, os despejos de efluentes domésticos e industriais sem tratamento e uso inadequado do solo em regiões ripárias e planícies de inundação e várzeas (GUERESCHI, 2004).

Alguns corpos de água recebem diretamente os resíduos altamente tóxicos lançados pelas indústrias dos centros urbanos e, em áreas rurais, são os agrotóxicos provenientes do desenvolvimento da agricultura altamente tecnificada os causadores da contaminação do ambiente aquático. Na água, os metais e os resíduos de pesticidas podem ser adsorvidos ao material em suspensão, depositados no sedimento ou absorvidos por organismos, podendo ser metabolizados, desintoxicados e/ou acumulados (AGUIAR, 2002). Além disso, a contaminação direta das águas superficiais ocorre também devido ao uso de metais e pesticidas em sistemas de cultivo de peixes para o controle de algas e parasitas (ROMÃO *et al.*, 2006).

A partir da utilização do inseticida sintético DDT no controle de pestes há aproximadamente 50 anos, outros compostos orgânicos foram sintetizados e ocorreu uma grande e contínua expansão do uso destes compostos. As propriedades destes compostos orgânicos, tais como a alta toxicidade para uma grande variedade de insetos e a atividade mantida por meses ou anos, estimularam a pesquisa e a descoberta de outros compostos orgânicos sintéticos, dentre os quais, os organoclorados (aldrin, doeldrin, heptachlor, lindane, chlordane) e organofosforados ou fosfatados (malathion, parathion, diazinon, guthion) (NIMMO, 1984).

Os pesticidas organoclorados são extremamente tóxicos e apresentam elevada estabilidade química, alto poder residual no ambiente e capacidade de bioacumulação. O mecanismo redox destes pesticidas geralmente envolve a remoção de um átomo de cloro (GALLI *et al.*, 2006). O endossulfam, inseticida organoclorado, é considerado altamente bioconcentrável em peixes, muito tóxico para organismos

terrestres, altamente tóxico para mamíferos (por via inalatória), altamente irritante aos olhos de mamíferos, medianamente tóxico para aves e altamente tóxico para abelhas (GRISOLIA, 2005 *in* RODRIGUES *et al.*, 2005) razão pelas quais muitos inseticidas organoclorados foram removidos do mercado nos Estados Unidos pela U.S.EPA na década de 90 (United States Environmental Protection Agency). No Brasil, o uso de agrotóxicos é muito intenso tanto para o controle de ervas daninhas quanto para o controle de insetos. Nos últimos anos, o Brasil passou de 5º. para o 4º. lugar entre os países que mais utilizam agrotóxicos (ZAVATTI *et al.*, 1999; AGUIAR, 2002; MOREIRA *et al.*, 2002).

Apesar de apresentarem alta eficiência no controle de pragas, a contaminação do solo e ambientes aquáticos por esses compostos pode causar efeitos deletérios aos organismos que vivem nesses ambientes.

1.3. Organofosforados – Metil paration

Os pesticidas organofosforados (OP) possuem em sua estrutura um átomo central de fósforo pentavalente ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre, por uma dupla ligação. Tais como os organoclorados, os organofosforados são lipossolúveis, sendo contaminantes potenciais para diversos tipos de alimentos. Possuem efeito tóxico mais agudo para seres humanos e outros mamíferos, porém são menos persistentes no ambiente e possuem menor capacidade de bioacumulação que os organoclorados. O principal efeito tóxico é a inibição da enzima acetilcolinesterase, essencial para a transmissão de impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas e placas motoras (BAIRD, 2000 *in* GALLI *et al.*, 2006).

Os organofosforados são um grupo de compostos químicos amplamente utilizados em agropecuária como inseticidas, ocasionando intoxicações acidentais em animais e humanos. A toxicidade desses produtos decorre da insuficiência cardíoro-respiratória por comprometimento do sistema nervoso. Alguns destes compostos induzem miopatia que é caracterizada por degeneração (necrose) de células musculares em animais de experimentação e em humanos, comprometendo sobretudo a musculatura respiratória. Uma vez que a insuficiência respiratória é uma das conseqüências mais graves das intoxicações por organofosforados, é possível que o envolvimento dos músculos da respiração constitua agravante do distúrbio respiratório, o qual é devido à disfunção do sistema nervoso autônomo (CAVALIERE, 1996). O risco de efeitos adversos relacionados aos pesticidas depende fundamentalmente do perfil toxicológico do produto, do tipo e da intensidade da exposição a que o indivíduo é submetido e da susceptibilidade da população exposta (DELGADO, 2004).

Apesar dos aspectos agressivos apresentados acima, existem algumas vantagens imediatas relacionadas ao uso dos pesticidas, as quais incluem o fato de que milhões de vidas têm sido salvas da morte pela malária, febre amarela, doença do sono, peste negra, febre tifóide, etc., através do controle de populações de animais vetores que transmitem essas doenças e, em relação à agricultura, a redução nas perdas de lavoura após aplicações dos pesticidas. As desvantagens, porém, são relevantes, principalmente devido à ação inespecífica dos pesticidas, uma vez que somente 0,1% do aplicado atinge o alvo específico, enquanto que o restante tem potencial para se mover através de diferentes compartimentos ambientais (AGUIAR, 2002). Além disso, o combate a animais vetores e pragas utilizando pesticidas organofosforados ou carbamados pode, no futuro ser ineficaz quando algum tipo de vetor adquirir resistência ao mesmo como já foi relatado no caso de *Culex quinquefasciatus*, transmissor da filariose bancroftiana nas

Américas (BRACCO *et al.*, 1997; CAMPOS & ANDRADE, 2003), *Aedes aegypti*, transmissor da dengue (CAMPOS & ANDRADE, 2003) e *Leucoptera coffeella*, bicho-mineiro-do-cafeeiro (FRAGOSO *et al.*, 2003).

Dentre os pesticidas os compostos organofosforados são os mais utilizados tanto na agricultura quanto em sistemas de cultivo de animais aquáticos para o controle de uma grande variedade de pragas (NIMMO, 1984; DAS, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2005). No Brasil o metil paration é muito utilizado em plantações de algodão, milho, soja, cítricos, amendoim, arroz, cana-de-açúcar, abacaxi, melão, melância e hortaliças para o controle de uma variedade de insetos como os afídios, escaravelhos, baratas, carunchos, lepidópteras, pestes das frutas, do algodão, de hortaliças, e também vários insetos do solo (AGUIAR, 2002).

O inseticida metil paration (MP) ($C_8H_{10}NO_5PS$; O, Odimetil O-4-nitrofenil tiofosfato) (Figura 1A), pertence à classe dos inseticidas organofosforados (OPs), também designado por nomes fantasias como: Metaphos, Dalif, Bladan, Cekumethion, Devithion, E601, Folidol-M, Fosferno M50, Gearphos, Kilex, Parathion, Metacide, Nitrox 80, Parton M, Pencap M, Tekwaisa, Tamadol, Formithion, Fertidol, Folisuper[®] 600 BR, etc. (EXTOXNET, 1999 *in* AGUIAR, 2002). Este pesticida é parcialmente solúvel em água (20 a 25 ppm), mas o paraoxon, o metabólito ativo é muito mais solúvel (2400 ppm) e é classificado como de toxicidade moderada a alta para muitos organismos. (VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION, 1996 *in* AGUIAR, 2002). Em água, o MP é lentamente hidrolizado à p-nitrofenol e ácido dietilortotiofosfórico e essa reação pode ser acelerada pelo aumento da temperatura, exposição a luz e em meio alcalino (WAUCHOPE *et al.*, 1992 *in* Monteiro 2006). A vida média do MP em meio aquático é de 120 dias e no solo varia de 30 a 100 dias (EXTOXNET, 2004 *in* Monteiro 2006).

A toxicidade do MP está relacionada ao enxofre duplamente ligado ao fósforo ligante (Figura 1A) e grupos que circundam o fosfato (LANDIS & MING-HO YU, 1995) que quando metabolizado no organismo, pelas reações de desintoxicação no fígado pelo metabolismo oxidante do sistema P450 substitui o átomo de enxofre (P = S) pelo oxigênio (P = O) gerando uma forma tóxica mais potente, o paraoxon (OP) (SULTATOS, 1995) (Figura 1B).

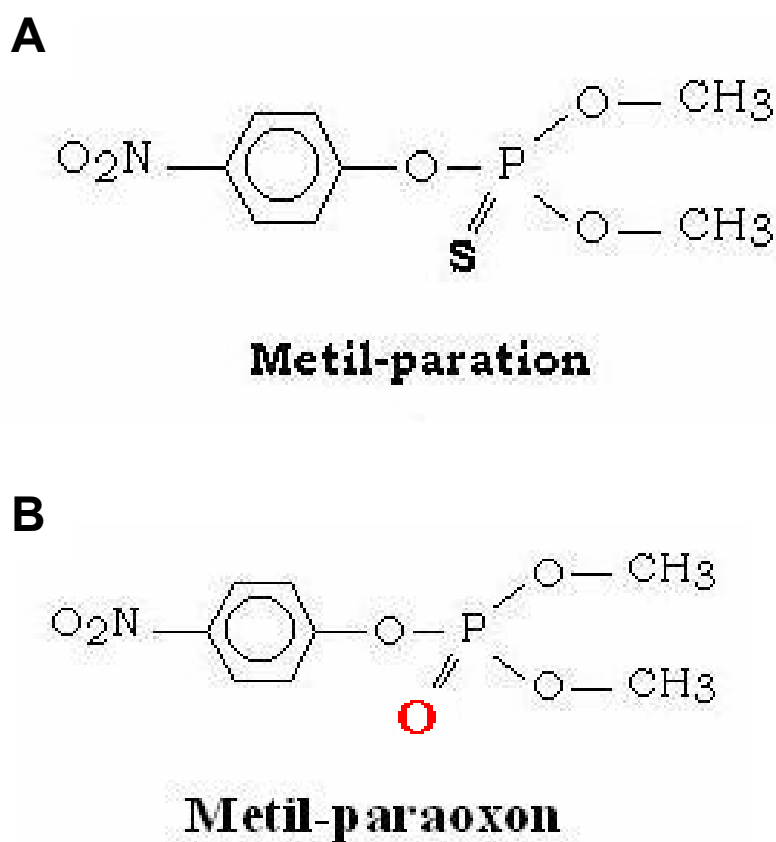


Figura 1. Fórmula do metilparation (A). Fórmula do metil-paraoxon (B) cujo enxofre foi substituído pelo oxigênio.

De acordo com CUNHA BASTOS *et al.* (1992) aproximadamente 6% de paration é biotransformado em paraoxon por homogeneizado de fígado (0,15 mg de

proteína) de *Hypostomus punctatus* quando incubados durante 2 horas com 0,5 ppm de MP.

O organofosforado metil paration tem sido amplamente utilizado em sistemas de cultivo de peixes, principalmente em viveiros de recepção de larvas de peixes, para eliminar predadores aquáticos como larvas de insetos (SILVA *et al.*, 1993) na concentração de 0,25 a 3 ppm do produto ativo (FIGUEIREDO & SENHORINI, 1990). Além disso, o MP em concentrações que variam de 0,25 a 12,5 mg L⁻¹ tem sido empregado para o controle da infestação de parasitas na epiderme e brânquias, dependendo da espécie de parasita e peixe (WILLIAMS & JONES, 1994 in MONTEIRO *et al.*, 2006). De acordo com HOWARD (1989) o MP é rapidamente metabolizado por animais e plantas e parece não persistir ou bioconcentrar nos organismos, entretanto, segundo DE LA VEGA SALAZAR *et al.* (1997), o MP pode bioconcentrar 221 vezes nas brânquias e 76 vezes no músculo de carpa (*Cyprinus carpio*). Deste modo, os peixes podem estar constantemente sujeitos à exposição ao metil paration, seja acidentalmente ou em condições de tratamento em tanques de criação, sendo de grande importância o estudo de seus efeitos nos peixes brasileiros.

1.3.1. Efeitos do metil paration (MP) em peixes

A extrema toxicidade do paraoxon deve-se a sua ligação ao aminoácido serina constituinte de muitas proteínas. Embora as enzimas que tem serina em seus sítios ativos possam ser afetadas, a toxicidade aguda deste composto está associada à inibição da acetilcolinesterase, enzima encontrada nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares e que tem papel importante no funcionamento do sistema nervoso (AGUIAR *et al.*, 2004; SILVA FILHO *et al.*, 2004).

Entretanto os efeitos do MP e outros organofosforados não estão restritos à inibição da acetilcolinesterase (ERWIN *et al.*, 2003; AGUIAR *et al.*, 2004). Outros neurotransmissores também são afetados pelos OP entre os quais a liberação de catecolaminas e aminoácidos excitatórios (SOLBERG & BELKIM, 1997) que, via receptores N-metil-D-aspartato, libera cálcio que desencadeia a ativação de enzimas proteolíticas e, em consequência, gera radicais livres (BEAL, 1995 *IN* MONTEIRO, 2006). Alterações na atividade de diferentes enzimas do fígado e coração foram relatadas por AGUIAR *et al.* (2004) e nas enzimas relacionadas às defesas antioxidantes por MOHAMMAD *et al.* (2004), principalmente nas brânquias e músculo branco, MONTEIRO *et al.* (2006). Além disso, alterações nos parâmetros sanguíneos após exposição ao MP foram relatadas por MURTY (1986) em *Clarias batrachus* e AGUIAR (2002) em *Brycon cephalus*. Alterações hematológicas associadas às lesões no tecido branquial também foram relatadas em *Ictalurus punctatus* por AREECHON & PLUMB (1990) *in* AGUIAR (2002).

As alterações na atividade enzimática das células de um dado tecido ou órgão têm como consequência alterações na fisiologia desse tecido ou órgão e podem conduzir a alterações morfológicas. As análises morfológicas e morfométricas são ferramentas eficientes para diagnosticar e identificar alterações associadas à ação de um contaminante sobre a célula, ou seja, ação direta ou via fatores endógenos como consequência das alterações bioquímicas e fisiológicas causadas pela contaminação ambiental (MALLAT, 1985; FANTA *et al.*, 2003; BOEGER *et al.*, 2003; ROMÃO *et al.*, 2006). Por exemplo, a contaminação aquática por paration causa dano nas membranas das mitocôndrias, retículo endoplasmático e membrana nuclear e aumenta o número de lisossomos em células do tecido branquial do linguado, *Paralichthys olivaceus* (LI & ZHANG, 2002).

1.4. Alterações Morfofuncionais

1.4.1. Células Interrenais

Quando uma espécie é exposta a um xenobiótico ou a algum fator que perturba a homeostase, uma série de respostas compensatórias ou adaptativas é estimulada, podendo resultar inclusive em alterações morfológicas e estruturais. Essas respostas podem ser diretas devido à ação do xenobiótico nas glândulas endócrinas e tecidos, ou indireta, via os denominados hormônios do estresse. Catecolaminas e cortisol, os principais hormônios produzidos pelos eixos neuro-endócrinos hipotálamo-sistema nervoso simpáticos-células cromafins (HSC) e hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) respectivamente, aumentam significativamente no plasma após estresse agudo induzindo uma série de respostas secundárias que podem ou não sobrepor aos efeitos diretos causados pelo xenobiótico (WENDERLAAR BONGA, 1997). As catecolaminas são secretadas e produzidas pelas células cromafins distribuídas em grupos ao longo da veia cardinal próximo ao rim anterior após estímulo via sistema simpático (PICKERING, 1981, REID *et al.*, 1998) e o cortisol é sintetizado pelo tecido interrenal, situado no rim anterior, após estímulo via hormônio hipofisário adrenocorticotrópico (ACTH) (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Entretanto, os efeitos associados à exposição a baixos níveis de xenobiótico são ainda pouco entendidos e, embora estudos recentes tenham gerado importantes contribuições quanto às respostas fisiológicas e bioquímicas de peixes aos xenobióticos, muitos estudos em laboratório não proporcionam evidências conclusivas sobre a ativação do eixo HHI em peixes expostos a baixos níveis de xenobiótico e a redução do nível de cortisol após semanas de exposição a esses compostos (HONTELA,

1998; GUNDERSEN *et al.*, 2000). Novos protocolos, incluindo estudos *in vitro* (BENGUIRA & HONTELA, 2000) e alterações morfológicas do tecido interrenal tem sido sugerido como alternativa da ativação do eixo HHI uma vez que alterações morfológicas podem indicar o nível de atividade celular.

Considerando que o principal produto da atividade das células interrenais é o cortisol e que esse hormônio tem importante papel na mobilização de açúcares e gorduras e assim fornece precursores mais simples como lactato, piruvato e aminoácidos para a gliconeogênese hepática nos peixes (MOMMSEN *et al.*, 1999), a análise dos intermediários metabólicos além de indicar possíveis alterações no metabolismo animal após exposição ao MP pode, ainda, fornecer indícios da ativação do eixo HHI.

1.4.2. As Brânquias – Importância e Função

A organização geral das brânquias baseia-se em um sistema progressivo de subdivisões, dando origem primeiramente, às fendas branquiais, as quais são separadas por um septo branquial que contém o arco branquial. Na superfície do arco branquial voltada para a cavidade opercular, inserem-se duas fileiras de filamentos branquiais (holobrânquias), cujas superfícies dão origem a uma série de dobras que constituem as lamelas, as quais são os sítios primários das trocas de gases na maioria dos peixes (SAKURAGUI, 2000).

As brânquias dos peixes são órgãos multifuncionais que desempenham um grande número de funções tais como a troca de gases (O_2/CO_2), a regulação iônica e osmótica, o equilíbrio ácido-base, os quais são continuamente ajustados em função de

oscilações internas e externas de pH, íons dissolvidos e a excreção de produtos nitrogenados (LAURENT & PERRY, 1991; PERRY & LAURENT, 1993; FERNANDES & PERNA-MARTINS, 2001; MORON *et al.*, 2003; SAKURAGUI *et al.*, 2003). Esses órgãos possuem extensa superfície que está em contato direto com o ambiente aquático sendo, portanto particularmente sensíveis à presença de contaminantes no meio e considerado como os primeiros órgãos-alvo da maior parte dos poluentes e os primeiros a reagir às condições desfavoráveis de um ambiente (MAZON *et al.*, 2002a,b). A extensa superfície desses órgãos, a reduzida distância entre o meio externo (água) e interno (sangue) (3-10 μ m) e o grande volume de água que flui sobre o epitélio branquial durante o ciclo respiratório favorecem a absorção de substâncias tóxicas que podem causar danos à sua estrutura e função (MALLAT, 1985; CERQUEIRA & FERNANDES, 2002; FANTA *et al.*, 2003; BOEGER *et al.*, 2003; ROMÃO *et al.*, 2006).

As resposta às oscilações físico-químicas da água, incluindo a presença de contaminantes conduz a alterações do tecido branquial (FERNANDES & MAZON, 1999). Alterações na perfusão das lamelas branquiais e na superfície respiratória, alterações do epitélio branquial tais como proliferação das células mucosas e alterações nas mucossustâncias produzidas, proliferação das células-cloreto (CC) e aumento da superfície apical dessas células está associada a respostas fisiológicas e têm sido consideradas como mecanismos que auxiliam o restabelecimento das condições normais do indivíduo na presença de um agente estressor (WENDELAAR BONGA, 1997). A proliferação das CC no epitélio branquial ocorre estimulada pelo hormônio do estresse, o cortisol (WENDELAAR BONGA, 1997) e a ação de mecanismos adaptativos locais (BALM & POTINGER, 1993).

A análise de algumas variáveis sanguíneas tais como pH, osmolalidade e a concentração de íons Na^+ , Cl^- e K^+ podem fornecer indicações da regulação iônica e, indiretamente, da função branquial.

1.5. Intermediários metabólicos

A variação nas concentrações de intermediários metabólicos pode ocorrer ao longo de uma modificação do meio externo e pode refletir a preferência metabólica nos animais. A glicose sanguínea é um dos fatores mais comumente utilizados na avaliação do estresse agudo, pois a hiperglicemia é uma resposta clássica ao estresse devido à liberação do hormônio adrenalina e, em longo prazo, da liberação do cortisol e pode ocorrer como resposta aos pesticidas (PANT & SINGH, 1983; BARTON & IWAMA, 1991; PINHEIRO, 2004).

As alterações nos teores de lactato e piruvato estão diretamente relacionadas à concentração de glicose resultante de sua mobilização, via glicogenólise e/ou gliconeogênese induzidas pelas catecolaminas e pelo cortisol nas situações de estresse (MOMNSEN *et al.*, 1999; IWAMA *et al.*, 2004)

Em peixes, o catabolismo protéico é preferencial ao de açúcar (WEBER & HAMAN, 1996) e estima-se que, quando em repouso 80% do substrato energético utilizado sejam oriundos das proteínas (JÜRS & BASTROP, 1995). Considerando-se que a amônia é o produto final do catabolismo das proteínas e reflete reações de transaminação, sua concentração pode indicar se os aminoácidos estão sendo catabolizados (MOYES & WEST, 1995; BALLANTYNE, 1995). A análise da

concentração de amônia no fígado e plasma pode fornecer um indicativo do catabolismo dos aminoácidos.

1.6. O Matrinxã, *Brycon cephalus* – Características Gerais

De acordo com GODOY (1975), a espécie ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Sub-Classe: ACTINOPTERYGII

Superordem: OSTARIOPHYSI

Ordem: CHARACIFORME

Família: CHARACIDAE

Sub-Família: BRYCONICAE

Gênero: *Brycon*

No gênero *Brycon* há várias espécies com grande potencial para a piscicultura (CEPTA, 1994). Segundo CASTAGNOLLI (1992), o matrinxã, *Brycon cephalus* (Figura 2) tem sido muito bem sucedido na piscicultura por ser uma espécie rústica, apresentar rápido crescimento em cativeiro e fácil aceitação de ração comercial. A espécie possui hábito alimentar onívoro, tem importância comercial e encontram-se entre os peixes de escama mais esportivos da Amazônia (VAL & HONCZARIK, 1995). *Brycon cephalus* é nativo das bacias região Amazônica e Araguaia-Tocantins (IZIÉL *et al*, 2004). Em algumas regiões, o desmatamento ciliar, os barramentos dos rios e a poluição têm sido considerados como os principais responsáveis pelo desaparecimento da espécie (MENDONÇA, 1996).



Figura 2. Exemplar de matrinxã, *Brycon cephalus*.

A espécie tem escamas na superfície do corpo, tem coloração cinza prata uniforme com uma mancha escura arredondada na região humeral e nadadeiras alaranjadas, exceto a nadadeira caudal que é geralmente cinza escuro. Os dentes são fortes e multicuspidados, com várias fileiras na maxila superior. Os adultos raramente ultrapassam 80 cm de comprimento e 5 kg em massa corpórea (VAL & HONCZARIK, 1995). O matrinxã pode alcançar 3 a 4 kg e atinge a maturação sexual a partir do segundo e terceiro anos de idade em machos e fêmeas, respectivamente. A espécie migra no período que antecede a reprodução, ou seja, é uma espécie de piracema, desova total, sendo que no ambiente natural a desova ocorre entre os meses de dezembro a fevereiro, na época da cheia (VAL & HONCZARIK, 1995). Em sistema de cultivo extensivo e semi-intensivo, em monocultivo ou de preferência em policultivo com outras espécies pode alcançar de 700g até 1 kg no primeiro ano e 1,3 a 1,6 kg no segundo ano, o que corresponde ao tamanho comercializável já no primeiro ano e, portanto, é uma espécie com potencial para cultivo em cativeiro (VAL & HONCZARIK, 1995).

O matrinxã apresenta capacidade de adaptar seu metabolismo ao tipo de nutriente presente nas dietas, aumentando a atividade das enzimas digestivas em função do substrato de alimento ofertado (proteína, carboidrato ou gordura). Devido a essa característica, o matrinxã pode aproveitar eficientemente gorduras, carboidratos e proteínas como fonte de energia para realizar suas funções biológicas (REIMER, 1982 in IZIÉL *et al*, 2004). Uma dieta contendo 28% de proteína bruta promove um maior ganho de peso, melhor conversão alimentar e mais alto crescimento corporal (IZIÉL *et al*, 2004).

Por ser uma espécie de grande valor comercial e ter sido incorporada em criações experimentais e comerciais é importante a determinação da suscetibilidade desta espécie aos xenobióticos. Estudos de intoxicação por nitrito em matrinxãs mostraram que ocorre uma diminuição nas variáveis hematológicas causada por anemia hemolítica e funcional sugerida pelo aumento nas concentrações de potássio e metahemoglobina (Avilez *et al*, 2004). Redução do hematócrito e número de eritrócitos, aumento nos níveis de metahemoglobina e alterações nas concentrações plasmáticas dos íons Cl^- , K^+ e Na^+ após exposição ao fenol evidenciam alterações no transporte de O_2 e na regulação iônica (HORI, 2005).

A exposição aos pesticidas, como o metil paration, que é comumente utilizado até em tanques de criação de peixes para controle de larvas de insetos predadoras de larvas de peixe (AGUIAR, 2002) necessita ser investigado para avaliação do nível de estresse a que o animal está submetido e quais as conseqüências diretas e indiretas dessa exposição.

Estudo anterior em que o matrinxã foi exposto a concentração subletal de MP mostrou que a espécie suporta até 92% de inibição da acetilcolinesterase, que ocorrem alterações na performance natatória, alterações macroscópicas no fígado quanto a coloração e consistência que sugerem alteração na integridade do órgão, anemia e há evidência de lesão tissular (AGUIAR, 2002). As brânquias de *Brycon cephalus* mostraram ser mais sensíveis ao pesticida e tem baixo potencial antioxidante contra o estresse oxidante induzido pelo metil paration (MONTEIRO, 2006).

2. OBJETIVOS

Considerando a importância da espécie *Brycon cephalus* e o uso do pesticida metilparation na agricultura e em tanques de cultivo de peixes, o presente estudo teve como objetivo avaliar as variáveis sanguíneas, alguns intermediários metabólicos no plasma e fígado e as possíveis alterações morfofuncionais nas células da interrenal e nas brânquias de *Brycon cephalus* exposto a concentração subletal de metilparation.

2.1. Objetivos específicos

1. Determinar se a exposição subletal ao MP estimula o eixo HHI induzindo a liberação de cortisol na corrente sanguínea;
2. Determinar se a exposição subletal ao MP causa alterações morfológicas no tecido branquial e qual o grau de comprometimento da função das brânquias
3. Determinar se a exposição subletal ao MP causa alterações no pH sanguíneo, nas variáveis hematológicas, osmolalidade e íons plasmáticos, uma vez que essas variáveis constituem um reflexo de todos os processos corporais e servem como indicadores das condições gerais do organismo, em particular, das funções do tecido branquial.
4. Determinar se ocorrem alterações metabólicas no plasma e fígado induzidas pela exposição subletal ao MP e avaliar se essas alterações podem estar associadas a estimulação do eixo HHI..

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho, foi utilizada a formulação comercial do inseticida organofosforado metil paration (O, O-dimetil O-4-nitrofenil tiofosfata, $C_8H_{10}NO_5PS$) – Folisuper 600 BR[®] (metil paration 600 g.L⁻¹, Agripec). Todos os reagentes foram de procedência Sigma (St. Louis, MO, USA), LabSynth (São Paulo, BRA), Merck (Darmsdat, ALE) e Agripec (Maracanaú, CE, BRA).

3.1. Procedência e manutenção em laboratório

Exemplares jovens de *Brycon cephalus* (massa corpórea, $M_c = 136,58 \pm 5,3$ g; comprimento total, $L_t = 21,91 \pm 0,3$ cm) foram fornecidos pela Piscicultura Águas Claras, Mococa, SP, Brasil. No laboratório os peixes foram mantidos em tanques com capacidade para 1000 litros, dotados de circulação contínua de água (pH $7,5 \pm 0,2$; dureza $24,5 \pm 0,3$ mgL⁻¹ como CaCO₃; alcalinidade $2,7 \pm 1,9$ mgL⁻¹ como CaCO₃; condutividade $8,3 \pm 0,3$ µS e concentração de íons (em mgL⁻¹): Na⁺ $2,06 \pm 0,03$; K⁺ $2,52 \pm 0,004$; Ca²⁺ $4,00 \pm 0,013$ e Cl⁻ $0,5 \pm 0,04$), aeração constante, temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo 12L:12N, por um período de 45 dias, para a recuperação de estresse decorrente da coleta e do transporte e aclimatação às condições laboratoriais. Durante esse período, os peixes receberam alimentação *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes. Após o período de aclimatação, a alimentação foi suspensa por 24 horas e em seguida os animais foram submetidos aos experimentos.

3.2 Desenho experimental

Exemplares de matrinxã foram distribuídos aleatoriamente em dois aquários de 200 litros totalizando 6 animais/aquário, nos quais permaneceram durante 12h para aclimatação. Após esse período a água foi cuidadosamente renovada; os animais do aquário 1 constituíram o grupo controle (C), cuja água foi mantida sem a presença de metil paration e os do aquário 2 constituíram o grupo (MP) exposto ao metil paration na forma comercial de Folisuper 600[®]BR e concentração final igual a 2mg/L de MP (2ppm; ~ 1/3 da CL₅₀-96h, Aguiar, 2002). Ambos os grupos permaneceram nos aquários durante 96 horas, em sistema semi-estático dotados de aeração constante e temperatura controlada ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$). As características físicas e químicas da água controle e experimental, exceto pela adição de MP no grupo experimental foram semelhantes as do período de aclimatação. Após o período de 96h, os animais foram removidos dos aquários e uma amostra de sangue foi coletada por punção da veia caudal em seringas heparinizadas. Em seguida os animais foram anestesiados com benzocaina 0,01%, medidos, pesados e sacrificados por secção crânio-medular. As brânquias foram removidas e após incisão abdominal, foram removidos o fígado e o rim anterior.

O pH do sangue coletado foi medido e em seguida, foram separadas duas alíquotas de sangue sendo uma para análises hematológicas (hematócrito, contagem de eritrócitos e concentração de hemoglobina) e a outra para o preparo de extensões sanguíneas para a contagem de trombócitos e diferencial de leucócitos. O sangue remanescente foi centrifugado a 12000 rpm por 3 min, o plasma sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos plásticos à -20°C para posterior análise das variáveis fisiológicas: osmolalidade, íons Na^+ , Cl^- e K^+ , intermediários metabólicos e níveis de cortisol e colesterol. Para as determinações plasmáticas de amônia e intermediários metabólicos (glicose, piruvato e lactato) foi utilizado 100 μL de plasma ou

homogeneizado de fígado em 1 mL de TCA 20%. O fígado foi homogeneizado em um (Homogeneizador Beltec 05801) a 1000 rpm por 3 min em banho de gelo após adição de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% na proporção de 1mL para cada 100 mg de tecido. O homogeneizado foi centrifugado por 3 min a 1000 rpm e o sobrenadante armazenado em tubos plásticos à -20°C que posteriormente foi utilizado nas determinações de intermediários (glicose, piruvato e lactato), sendo o precipitado descartado.

As brânquias e o rim anterior foram fixados para estudos histológicos em glutaraldeído (GTA) 2,5% em tampão fosfato 0,1M, $\text{pH} = 7,3$ e posteriormente armazenados em GTA 0,5% no mesmo tampão.

3.3 Análises sanguíneas e hepáticas

O pH foi medido imediatamente após a coleta de sangue utilizando pHmetro QUIMIS.

As análises hematológicas foram realizadas imediatamente após a coleta do sangue. O hematócrito (Hct) foi determinado em tubo capilar de vidro heparinizado preenchido por sangue e sedimentado em centrífuga de microhematócrito (FANEM). O hematócrito foi calculado a partir de um cartão de leituras padronizado e os valor expresso em % de eritrócitos (GOLDENFARB, 1971). A concentração de hemoglobina total (Hb) foi determinada utilizando solução de Drabkin (DRABKIN, 1948) e leitura em espectrofotômetro (TECNAL SP 1105) em 540nm. A contagem de eritrócitos (RBC) foi efetuada adicionando 10 μL de sangue a 2 mL de solução isotônica de formol citrato, tendo sido utilizados 10 μL desta solução para a contagem do RBC em uma câmara de Neubauer sob microscópio de luz (Olympus CBA-K).

Os índices hematimétricos foram calculados a partir dos dados de hematócrito, concentração de Hb e número de eritrócitos. O volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{VCM } (\mu\text{m}^3) = \text{hematócrito } (\%) \times \text{RBC } (\text{milhões}/\text{mm}^3)$$

$$\text{HCM } (\text{pg}) = \text{Hb } (\text{g}/\text{dL}) \times 10 / \text{RBC } (\text{milhões}/\text{mm}^3)$$

$$\text{CHCM } (\%) = \text{Hb } (\text{g}/\text{dL}) \times 100 / \text{hematócrito } (\%)$$

A contagem diferencial de leucócitos foi efetuada em extensões sangüíneas coradas com panótico (Laborclin) de acordo com o método descrito por MCKNIGHT (1966). Os leucócitos e trombócitos de cada animal foram contados em microscópio de luz (Olympus BX-51) utilizando software C.A.S.T. System. Um total de 5000 células foi contada incluindo eritrócitos, diferentes tipos de leucócitos e trombócitos e, em seguida, foi calculado o número total de leucócitos e trombócitos e a porcentagem diferencial de leucócitos.

A osmolalidade plasmática foi quantificada por congelamento de alíquotas de 50 μL de plasma em um semi-microsmômetro ($\mu\text{OSMETTE}$ Precision System). A concentração dos íons cloreto (Cl^-) foi determinada em leitora de microplaca Dynex MRX, utilizando kit Labtest para cloreto (REF 49) de acordo com uma curva padrão feita previamente no dia da análise e as concentrações dos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram determinadas em fotômetro de chama Digimed DM-61 após diluição 1:100 do plasma.

Para a determinação da concentração de glicose foram utilizados 100 μL de desproteínizado de plasma ou 2 μL de homogeneizado ácido do fígado; o volume foi completado para 500 μL com água destilada, sendo adicionado 0,5 mL de fenol 4,1% e 2

mL de ácido sulfúrico concentrado. O conteúdo de glicose foi dosado como açúcar reduzido a 480nm (DUBOIS *et al.*, 1956).

Os níveis de lactato foram determinados utilizando método descrito por HARROWER & BROWN (1972). Um volume de 20µL de homogenato do fígado, ou 20µL de plasma desproteínizado foi adicionado a um meio de reação contendo 20µL de $\text{CuSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})$. A seguir 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado foram lentamente adicionados ao tubo de ensaio. Os tubos foram agitados e fervidos por 5 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 80 µL de p-fenilfenol (1,5 g de p-fenilfenol em 100 mL de solução aquosa de NaOH 2%). Os tubos foram agitados em vortex e encubados, em repouso, por 1 hora. Posteriormente, os tubos foram novamente fervidos (90segundos) para retirar o excesso de p-fenilfenol e, após resfriamento em banho de gelo, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (TECNAL SP 110) a 570nm.

Os níveis de piruvato foram determinados pelo método descrito por LU (1939). Um volume de 150 µL de homogeneizado de fígado ou 500 µL de plasma desproteínizado de foi adicionado a um meio de reação contendo 250 µL de dinitrofenilhidrazina 0,1% (em HCl 2N). Após 30 minutos em banho Maria foi adicionado 3 mL de NaOH 1,3N. Os tubos foram então resfriados e a leitura feita em espectrofotômetro (TECNAL SP 110) a 440nm.

A amônia foi determinada por nesslerização (GENTZKOW & ASEN, 1942). Um volume de 200µL de plasma desproteínizado ou 30µL de homogeneizado de fígado foi transferido para um tubo de ensaio e o volume completado para 2,0 mL com água destilada onde eram adicionados 0,5 mL de reativo de Nessler. A leitura óptica foi realizada em espectrofotômetro (TECNAL SP 110) 420nm.

Os níveis de cortisol foram determinados utilizando Kit ACTIVE® cortisol EIA DSL-10-2000. O procedimento segue o princípio básico do imunoenensaio enzimático, no qual há competição entre um antígeno não marcado e um antígeno marcado com enzima por um número fixo de sítios de ligação no anticorpo. A quantidade de antígeno marcado com enzima ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da substância não marcada que esta sendo analisada na amostra. O material não ligado é removido por decantação e lavagem das cavidades.

3.4 Análises morfológicas.

3.4.1 Células interrenais

Amostras do rim anterior foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 desidratadas em série crescente de álcoois (70% e 95%) e incluídas em Histo-resina (Leica). Posteriormente foram efetuados corte (3 μm) das amostras de rim anterior em micrótomo HM 360 (MÍCRON) e as lâminas histológicas foram secas em estufa (37°C) por 12 horas. Os cortes obtidos foram corados com Azul de Toluidina (1min) e Fucsina básica (15-20 segundos) e analisadas em microscopia de luz com aumento de 40x e 100x utilizando microscópio Olympus BX 51 As imagens foram capturadas com câmera digital JVC TK-C 1380 e gravadas em computador.

Foram analisadas 50 células interrenais (área celular e nuclear) de cada animal em objetiva de 1000x para a determinação das medidas das áreas (μm^2) do núcleo e da célula. Para essas determinações foi utilizado o software C.A.S.T. System com a função “2D nucleator IUR” (Figura 3) para as medidas de área resultando em uma planilha para a posterior análise estatística.

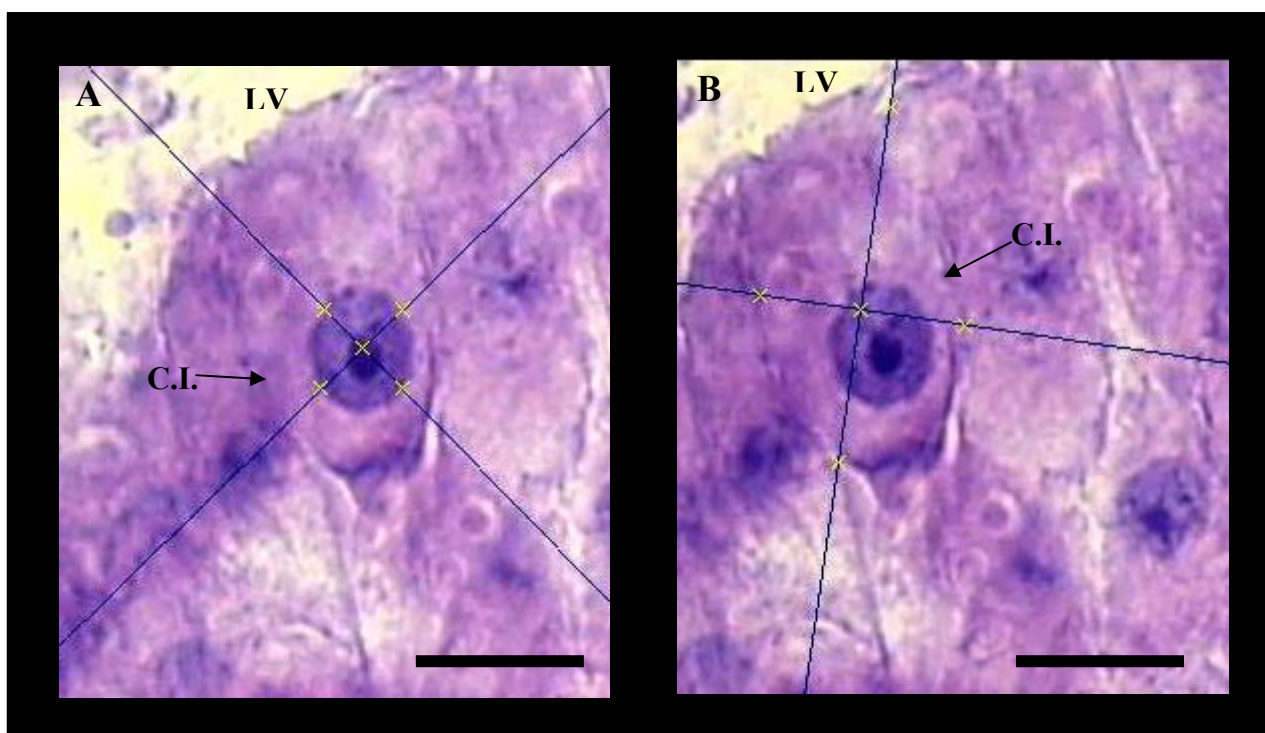


Figura 3. Corte mostrando o sistema de vetores-teste que foi utilizado para marcação dos limites do núcleo (A) e da célula (B). Região próxima à luz de vaso (LV) exibindo uma região com células interrenais (CI). Observe 4 raios marcados à partir das proximidades do centro do núcleo para cálculo das áreas do núcleo e da célula. Barra de escala = 10 μ m. Coloração: Azul de Toluidina e Fucsina Básica.

3.4.2. Brânquias

Amostras dos arcos branquiais contendo 4 – 5 lamelas foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 desidratadas em série crescente de álcoois (70% e 95%) e incluídas em Historesina (Leica). Cortes sagitais seriados de 3 μ m foram corados com azul de toluidina por 5 – 6 minutos e analisados em microscópio de luz Olympus BX-51 dotado de câmera digital JVC TK-1380 e acoplado a um computador que possui o software C.A.S.T. System para a realização das medidas. A proliferação de células foi quantificada, medindo-se a altura do epitélio do filamento e da lamela, a altura das lamelas e a distância interlamelar foram determinadas

considerando a medida da distância entre a base de duas lamelas consecutivas escolhidas ao acaso ($n= 20$ amostras) para cada animal. A área das células cloreto, pavimentosas e mucosas foi medida em 20 células aleatórias para cada amostra. A contagem de células-cloreto e células mucosas nos filamentos e nas lamelas foi realizada em um total de 100 campos aleatórios para cada animal.

As lesões causadas no tecido branquial pela exposição ao MP foram classificadas de acordo com POLEKSIC E MITROVIC–TUTUNDIZIC (1994) modificada por CERQUEIRA & FERNANDES (2002) em 4 grupos, baseados no tipo e localização das lesões. *G1*: hipertrofia e hiperplasia do epitélio branquial e alterações relacionadas a essas patologias, *G2*: alterações nas células mucosas e cloreto, *G3*: alterações nos vasos sanguíneos e *G4*: fibroses e necroses, e em 3 estágios progressivos, baseados na possibilidade de restauração do tecido após a remoção do agente causador da lesão, *EI* alterações que não danificam drasticamente o tecido branquial; *EII* alterações mais severas que cujos efeitos afetam a função do órgão e *EIII* quando a restauração da estrutura das brânquias não é possível.

A severidade e a reversibilidade das lesões foram avaliadas de acordo com os critérios propostos por POLEKSIC & MITROVIC–TUTUNDZIC (1994), utilizando o cálculo do índice de alterações histológicas (*I*) segundo a fórmula:

$$I = 10^0 \sum_{i=1}^a a_i + 10^1 \sum_{i=1}^b b_i + 10^2 \sum_{i=1}^c c_i$$

onde: *a* = total de alterações histológicas no primeiro estágio; *b* = total de alterações histológicas no segundo estágio; e *c* = total de alterações histológicas no terceiro estágio.

O índice de alterações foi calculado individualmente em animais de cada grupo: controle e exposto ao MP 96 horas e, obtido um índice médio (0-100) que divididos em categorias indicaram o grau de reversibilidade dos danos (POLEKSIC & MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994): 0-10 funcionamento branquial normal; 11-20 alterações leves para moderadas; 21-50 alterações moderadas para graves; 51-100 alterações graves; > 100 alterações branquiais irreparáveis.

3.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa “Instat for DOS” (Graphpad Software, San Diego, CA). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinar se a população da amostra segue uma distribuição de Gauss e, em seguida, foi aplicado o teste t de Student com intervalo de confiança 95% ($p < 0,05$) para verificar se as diferenças entre o grupo controle e exposto ao metil paration foram significativas.

4. RESULTADOS

Não houve mortalidade no grupo controle e exposto ao MP. A diminuição da performance natatória foi observada em todos os animais expostos ao MP, os quais permaneceram imóveis nos aquários, distantes uns dos outros e não apresentavam resposta ao toque, inclusive não apresentando resistência no momento da coleta ao término das 96h de exposição, diferentemente dos animais do grupo controle que apresentavam comportamento bastante arredo, típico da espécie.

4.1. Análises Morfológicas e Morfométricas das Células Interrenais e das Brânquias

4.1.1. Células Interrenais

Na região do rim anterior (Figura 4) estão localizadas as células interrenais de matrinxã, *B. cephalus* que apresentam uma distribuição difusa ou em pequenos grupos (Figura 5). Essa região do rim contém também células cromafins e tecido linfóide. As células interrenais estão associadas a veia cardinal posterior e encontram-se concentradas próximas à luz dos vasos sanguíneos (Figura 5). As células interrenais são, em geral, poliédricas, mas a sua forma pode variar de esférica a alongada como mostra a Figura 5. O núcleo é arredondado e o nucléolo é facilmente identificado no interior do núcleo (Figura 5).

Após a exposição à concentração subletal de MP, ocorreu um aumento significativo no tamanho das células da interrenal (Figura 6A) e de seu núcleo (Figura 6B). A razão entre a área do núcleo dividido pela área da célula teve aumento significativo (Figura 6C).

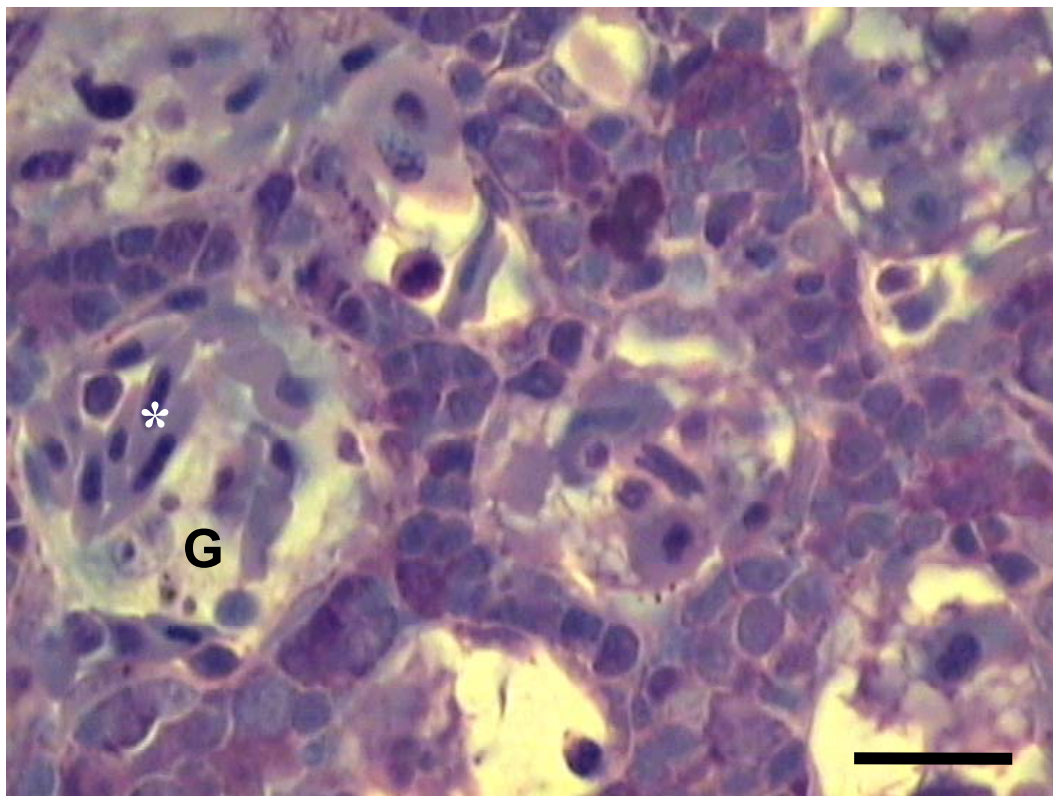


Figura 4. Rim anterior de *B. cephalus* do grupo controle mostrando o tecido ricamente irrigado (*). G, glomérulo. Barra de escala = 10 μ m. Coloração: Azul de Toluidina e Fucsina Básica.

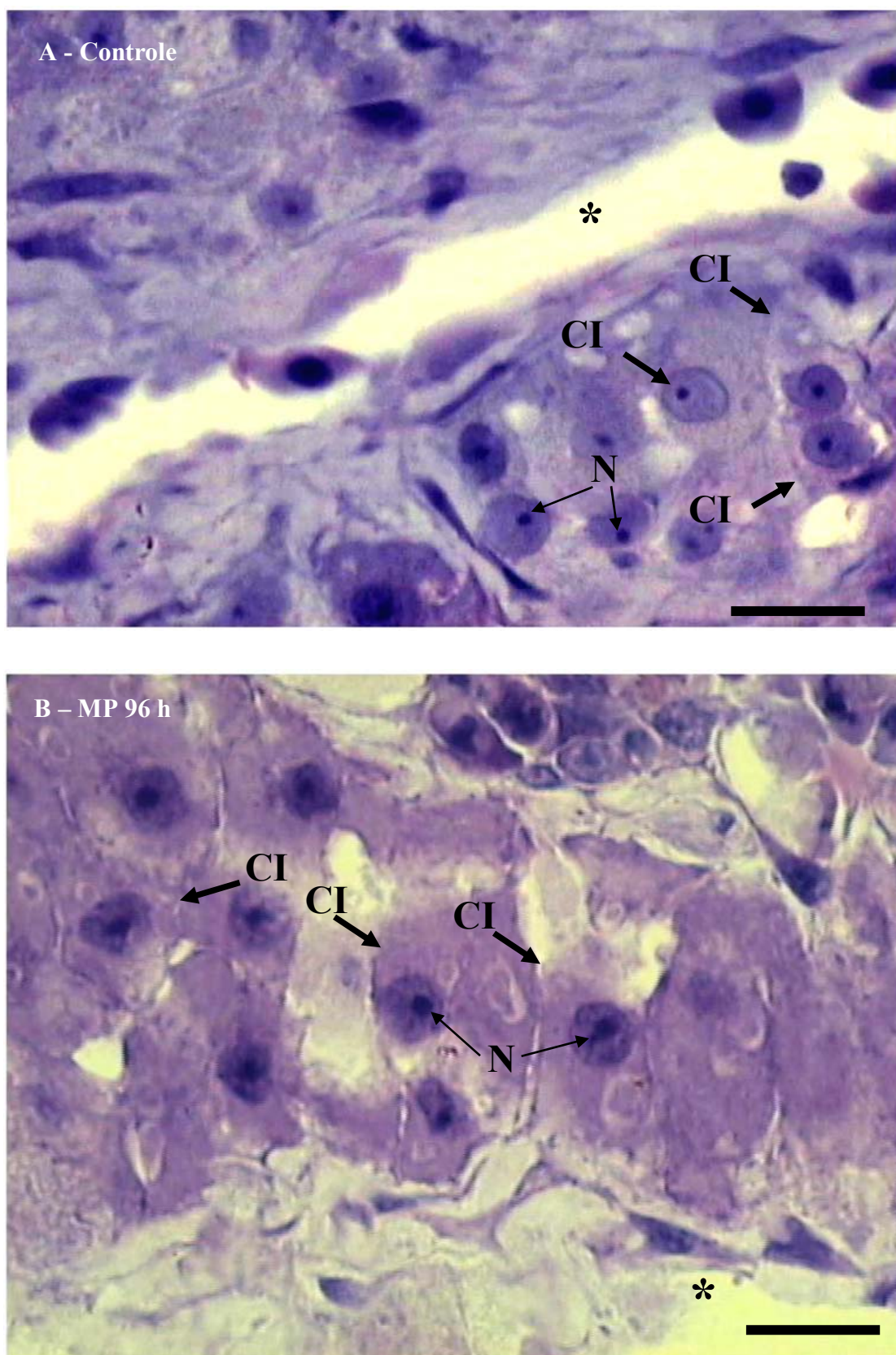


Figura 5. Rim anterior de *B. cephalus* do grupo controle (A) e do grupo MP 96 h (B) mostrando células interrenais (CI) próximas a um capilar (*). Note o nucléolo (N) corado mais intensamente dentro do núcleo. Barra de escala = 10 μ m. Coloração: Azul de Toluidina e Fucsina Básica.

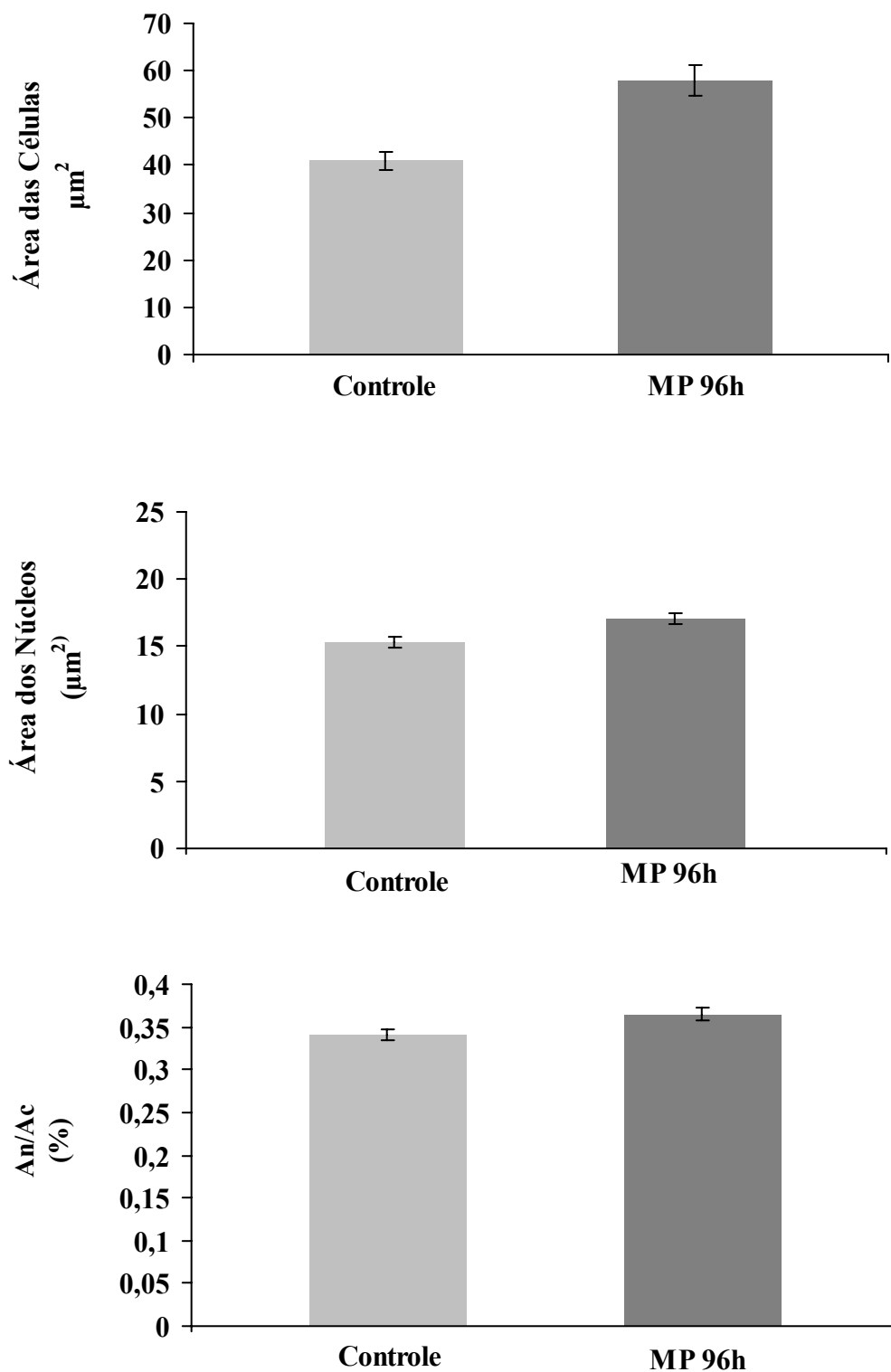


Figura 6. Valores médios (\pm SEM) da área das células interrenais (Ac) (A); da área dos núcleos dessas células (An) (B); e razão área dos núcleos/área das células (An/Ac) (C) de *B. cephalus* do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

4.1.2. Brânquias

O matrinxã, *B. cephalus*, como a maioria dos teleósteos, possui quatro pares de arcos branquiais em cada lado da faringe. Em cada arco branquial estão inseridas 2 fileiras de filamentos branquiais alternados entre si. O septo interbranquial, região que caracteriza a junção desses filamentos no arco branquial e onde se encontram as artérias primárias aferentes, músculos abdutores e terminações nervosas, é curto (aproximadamente 1/3 do comprimento do filamento branquial).

Acima e abaixo dos filamentos branquiais elevam-se a intervalos regulares as lamelas que constituem a maior parte da superfície branquial e onde ocorrem as trocas gasosas (Fig. 7A). Cada lamela é constituída por duas camadas de células pavimentosas (epitélio respiratório) apoiadas sobre a membrana basal que recobre as células pilares (Fig. 7A). As células pilares possuem prolongamentos ou flanges, que em contato com os prolongamentos das células pilares adjacentes formam os espaços por onde circula o sangue. Células-cloreto raramente são encontradas nas lamelas secundárias.

O epitélio do filamento branquial (não respiratório) é estratificado e formado por 3 a 4 camadas de células; a camada de células mais externa é constituída principalmente por células pavimentosas onde podem ser encontradas células-cloreto (Fig. 7A) e mucosas (Fig. 7B). As células-cloreto estão localizadas no epitélio de filamento próximas a base das lamelas e no epitélio do filamento entre as lamelas. As células-cloreto são globosas, tem núcleo central e a superfície apical em contato com a água ambiental é, em geral, pequena (Fig. 7A). As células mucosas (Fig. 7B), em geral, encontram-se distribuídas nas bordas externa e interna do filamento branquial, sendo raramente encontradas na região interlamelar. As células mucosas, embora possam ter formato variado, são geralmente elípticas em *B. cephalus*. O núcleo dessas células é

deslocado para a região basal da célula devido ao acúmulo de vesículas contendo muco que ocupam praticamente todo o citoplasma da célula.

A exposição de *B. cephalus* a 2ppm de MP durante 96 horas causou alterações no tecido branquial (Tabela 1) que foram classificadas como leves a moderadas (Tabela 2). A intensidade das alterações histopatológicas encontradas nas brânquias do grupo controle e grupo exposto ao MP está indicada na Tabela 1, de acordo com o tipo de lesão e estágio funcional. Houve predominância da hiperplasia do epitélio do filamento branquial e das lamelas (Tabela 1, Figura 8, 9A, B) o que contribuiu para a redução do espaço interlamelar (Tabela 1, Fig. 9C) e diminuição da altura das lamelas (Tabela 1, Fig. 9D). A proliferação das células do epitélio dos filamentos não chegou a provocar fusão completa das lamelas adjacentes sendo que a fusão parcial de algumas lamelas ocorreu apenas em poucos filamentos branquiais (Tabela 1). O deslocamento do epitélio do filamento e lamelas foi pouco freqüente e nestes locais não foi observada a presença de leucócitos.

As células mucosas não apresentaram alterações quanto à freqüência no epitélio do filamento, entretanto houve um aumento significativo no número das células-cloreto (Tabela 1, Fig. 8). Hipertrofia das células-cloreto foram evidentes após exposição ao MP, as células passaram a ocupar uma área significativamente maior quando comparada a área dessas células no grupo controle; as células mucosas não apresentaram hipertrofia. (Fig. 10A, B). A área das células pavimentosas foi significativamente reduzida (Fig. 10C).

Não foram observados aneurismas apicais ou em toda a extensão lamela (Tabela 1). Entretanto, uma redução nos espaços sangüíneos formado pelas expansões citoplasmáticas (flanges) das células pilares foi evidente nos animais expostos ao MP

incluindo o canal marginal (Fig. 11A,B). Rompimento de epitélio das lamelas foi raro (Fig. 11B).

Necrose não foi encontrada nos filamentos e nas lamelas (Tabela 1).

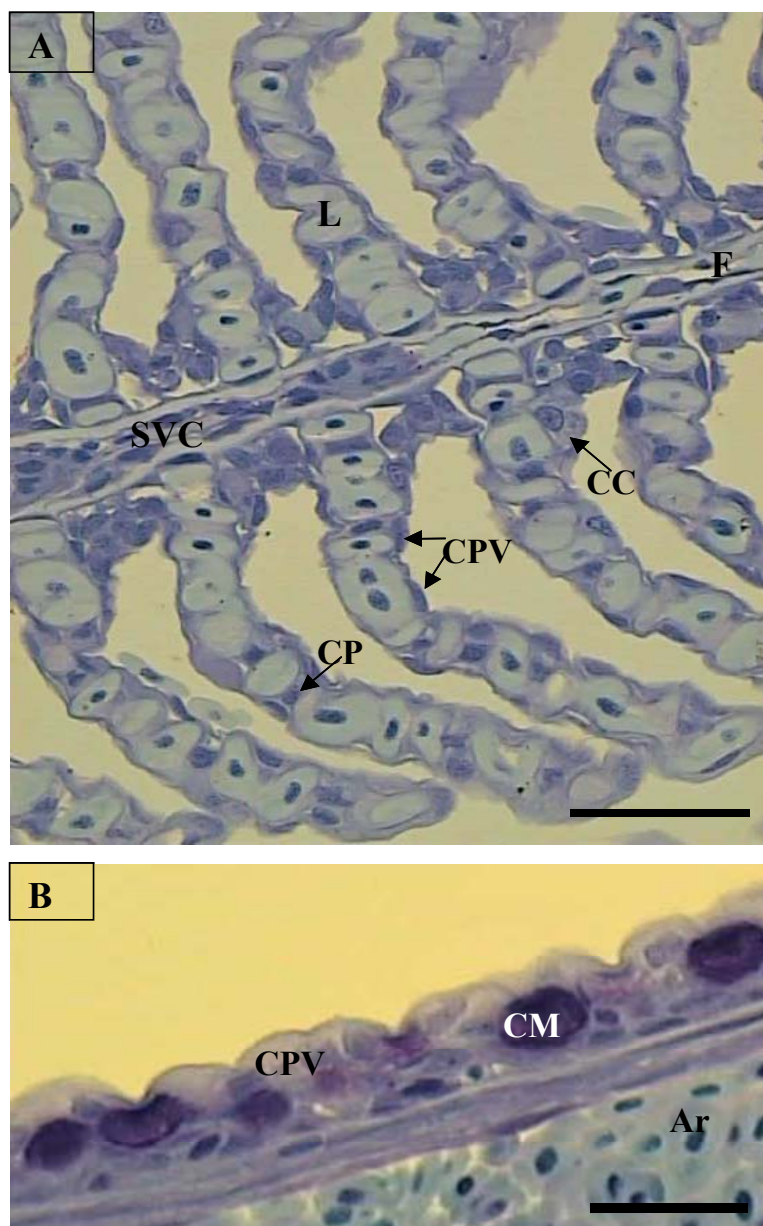


Figura 7. (A) Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* do grupo controle mostrando as lamelas (L) no filamento branquial (F). Note o epitélio estratificado do filamento e o epitélio bicamada das lamelas. CC - Células-cloreto, CPV - célula pavimentosa, CP - célula pilar, SVC - seio venoso central; Barra de escala = 50 μ m. (B) Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* do grupo controle mostrando a localização das células mucosas (CM) na borda do filamento. Note a ausência de lamelas nessa região. CPV - célula pavimentosa, Ar – artéria. Barra de escala = 30 μ m.

Tabela 1 – Histopatologia das brânquias de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2ppm de MP durante 96 horas, indicando a classificação das lesões em estágios de acordo com Poleksic and Mitrovic–Tutundizic (1994) e modificado por Cerqueira e Fernandes (2002).

Lesões	Estágio	Controle	Exposição ao MP
G1. Hipertrofia e hiperplasia do epitélio branquial			
Hiperplasia do epitélio do filamento	I	±	+++
Hiperplasia do epitélio da lamela	I	0	+++
Decréscimo do espaço interlamelar	I	0	+++
Deslocamento do epitélio do filamento	I	0	+0
Deslocamento do epitélio da lamela	I	0	+
Fusão incompleta das lamelas	I	0	++
Fusão completa de algumas lamelas	II	0	0
Fusão completa de todas as lamelas	II	0	0
Ruptura e descamação do epitélio do filamento	II	+	++
Ruptura do epitélio da lamela	II	0	+
G2. Alterações nas células mucosas e cloreto			
Hiperplasia das células mucosas	I	0	+
Células mucosas totalmente vazias ou ausentes	I	0	0
Hipertrofia e hiperplasia das células cloreto	I	0	+++
G3. Alterações nos vasos sanguíneos			
Aneurisma lamelar apical (canal marginal)	I	0	0
Dilatação de vasos sanguíneos	I	0	+0
Hemorragias com ruptura do epitélio	II	0	+
Aneurisma lamelar (espaços entre as cel. pilares)	II	0	0
G4. Estágio terminal			
Necrose	III	0	0

(0 = ausente, +0 = raramente presente, + = pouco freqüente, ++ = freqüente, +++ = muito freqüente)

Tabela 2 – Índice médio e erro padrão da média (\pm SEM) das histopatologias encontradas nas brânquias de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm do organofosforado MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Grupo	Índice Médio	Alteração
Controle	$3,2 \pm 0,58$	Funcionamento branquial normal
Exposição ao MP	$14,6 \pm 2,20$	Leve para moderada

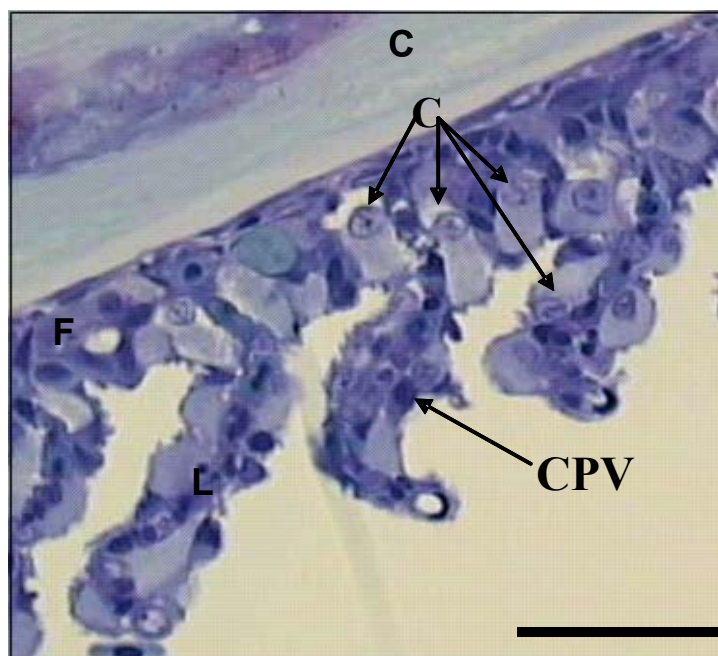


Figura 8. Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* exposto a 2 ppm de MP durante 96h. Note a espessura das lamelas e o número das células-cloreto (CC) no epitélio do filamento (F) e lamelas (L). CPV - célula pavimentosa. Barra de escala = 50 μ m.

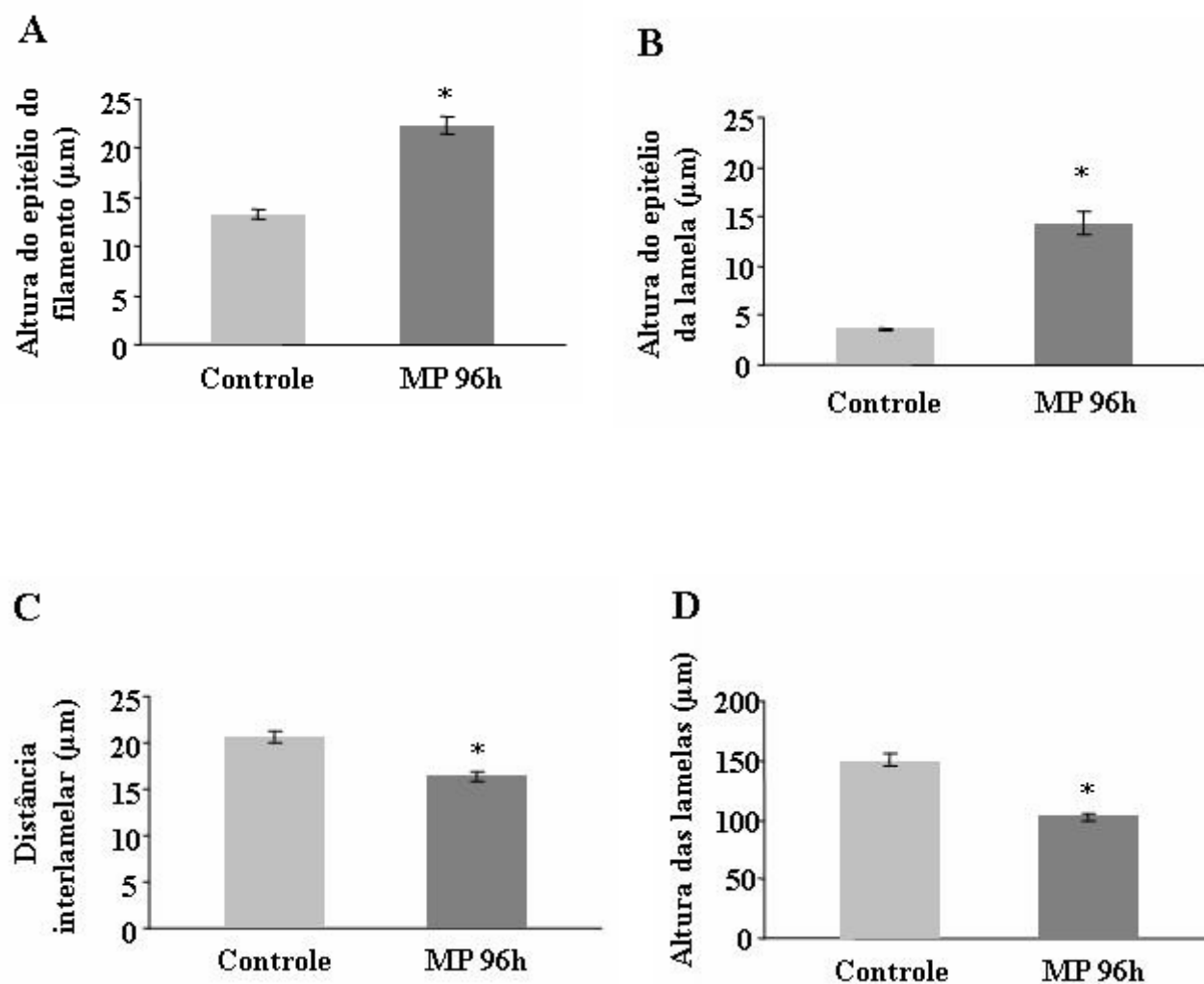


Figura 9. Valores médios (\pm SEM) da altura do epitélio do filamento branquial (A) e das lamelas (B), da distância interlamelar (C) e da altura da lamela (D) de *B. cephalus* ($n = 6$) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

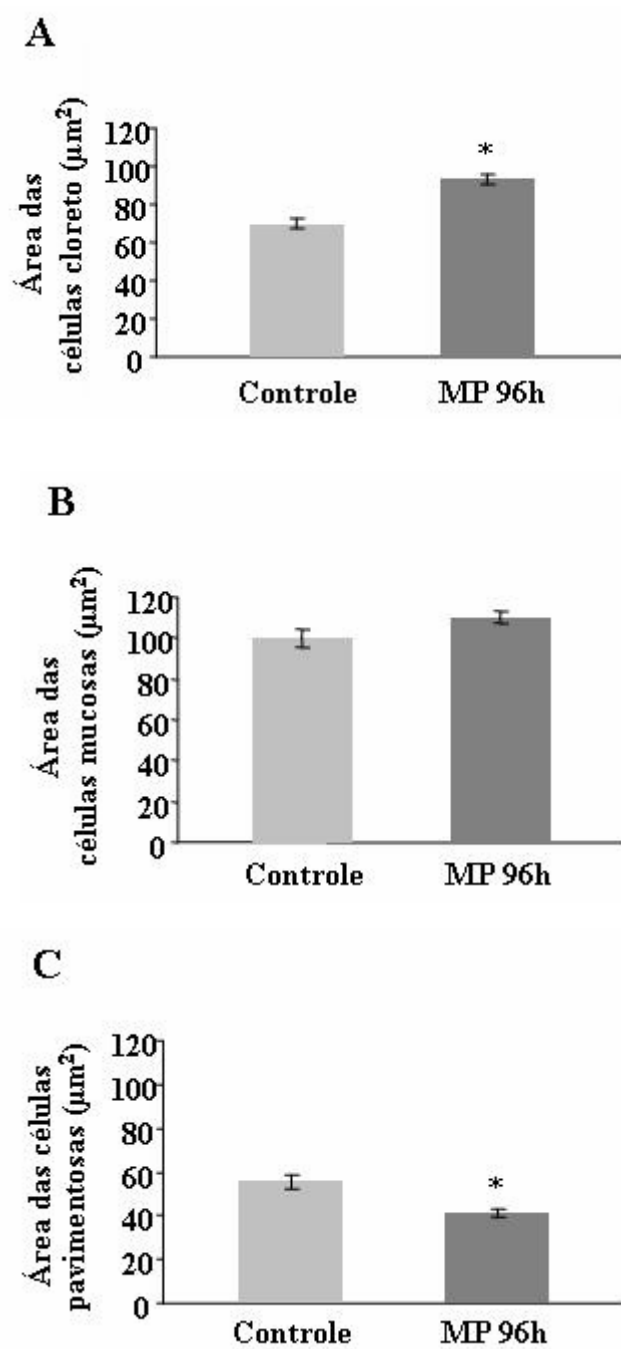


Figura 10. Valores médios (\pm SEM) da área das células-cloreto (**A**); das células mucosas (**B**); das células pavimentosas (**C**) nos filamentos branquiais de *B. cephalus* ($n = 6$) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

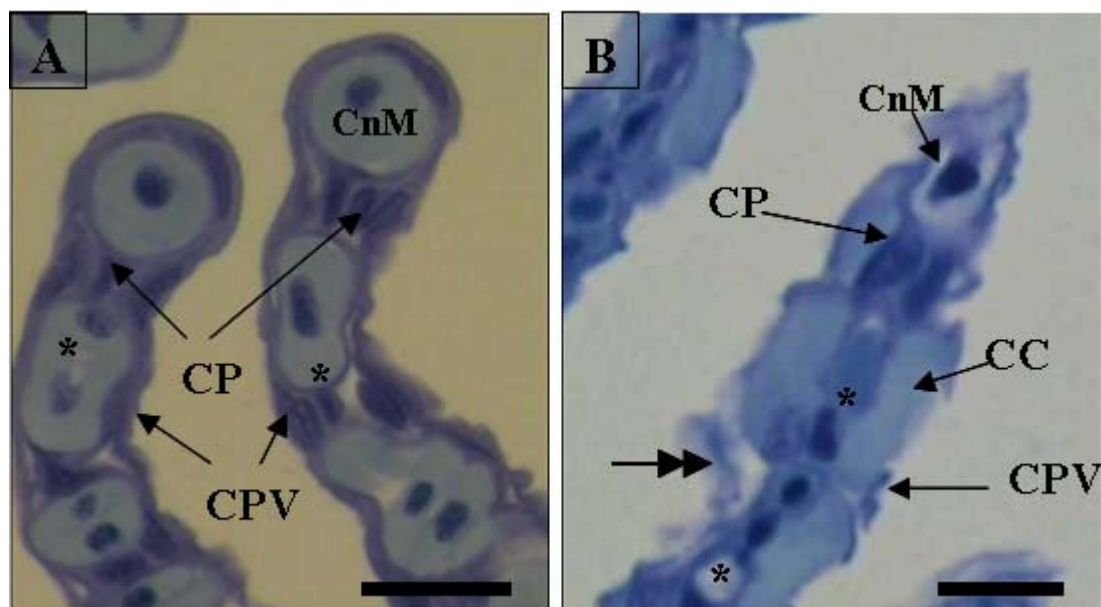


Figura 11. Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* do grupo controle mostrando as lamelas. Note o epitélio da lamela e os espaços sangüíneos (*) formados pelas flanges das células pilares (CP) e o canal marginal (CnM) formado pela flange da célula pilar e célula endotelial., CPV - célula pavimentosa (A). Barra de escala = 10 μ m; Corte sagital do filamento branquial de *B. cephalus* exposto a 2 ppm de MP durante 96h. Note a redução dos espaços sangüíneos (*) e canal marginal (CnM). CC - célula-cloreto, CP - célula pilar, CPV - célula pavimentosa. A seta dupla indica deslocamento e ruptura do epitélio da lamela.(B) Barra de escala = 10 μ m.

4.2. Análises sangüneas

A tabela 3 mostra os valores médios (\pm S.E.M.) das variáveis hematológicas dos animais do grupo controle e expostos a 2 ppm de MP durante 96 horas. O hematócrito nos animais controle correspondeu a $39,42 \pm 2,4\%$ do sangue total, a concentração total de hemoglobina foi de $9,81 \pm 1,34\text{g/dL}$ e o número de eritrócitos (RBC) foi de $2,59 \pm 0,15 \times 10^6$ células por mm^3 (figura 13 A, B e C). Os valores das variáveis hematológicas dos animais expostos a 2 ppm de MP durante 96 horas foram ligeiramente mais altos que as do grupo controle, porém o aumento não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$). Os índices hematimétricos (figura 14), VCM, HCM e CHCM, que nos animais do grupo controle foi $155,88 \pm 14,77\mu\text{m}^3$, $37,7 \pm 4,40$ pg/eritrócito e $25,5 \pm 0,43\%$, respectivamente, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) em relação aos índices hematimétricos calculados para os animais expostos ao MP embora estes tenham mostrado uma tendência a aumentar.

Nas extensões sangüneas de *B. cephalus* foram identificados monócitos, linfócitos, células granulocíticas especiais e trombócitos além dos eritrócitos (Tabela 4, Fig. 16) e não houve diferenças significativas entre o grupo controle e os animais expostos ao MP. Os linfócitos são células que tem forma predominantemente arredondada e tamanho variado, citoplasma fortemente basofílico e sem granulações visíveis no citoplasma (Fig. 12A). O núcleo possui forma arredondada, cromatina densa e ocupa praticamente todo o volume celular. Essas células representaram $73,74 \pm 5,32\%$ do total de leucócitos no grupo controle. Os monócitos são células grandes tem forma variável e citoplasma basofílico, apresentando algumas vezes, vacuolização; possuem núcleo excêntrico e geralmente alongado, ocasionalmente esférico (Fig. 12B). No grupo controle os monócitos representaram $22,63 \pm 4,85\%$. As células granulocíticas especiais

(G) (Fig. 12C) são células geralmente grandes com muitos grânulos acidófilos no citoplasma, núcleo periférico. Essas células no grupo controle representaram $3,63 \pm 1,04\%$ do total de leucócitos.

Os trombócitos (Fig. 12D) são células predominantemente fusiformes com citoplasma acidófilo e sem granulações, o núcleo também é fusiforme e se cora intensamente. No grupo controle havia $7,56 \pm 0,93 \times 10^4$ trombócitos por milímetro cúbico de sangue e ocorreu uma tendência a aumentar no grupo exposto ao MP ($8,13 \pm 1,29 \times 10^4$) (Tabela 3, Figura 15).

A osmolalidade plasmática no grupo controle foi $306,6 \pm 3,17$ mOsmol/kgH₂O e aumentou significativamente no grupo exposto ao MP ($334,2 \pm 6,57$) enquanto o pH sangüíneo diminuiu (grupo controle: pH = $7,41 \pm 0,07$ e grupo exposto ao MP: $7,17 \pm 0,08$) (Fig. 17A, B; Tabela 5). As concentrações dos íons cloreto ($104,7 \pm 19,83$ mEq/L), sódio ($182 \pm 13,84$ mEq/L) e potássio ($6,22 \pm 0,38$ mEq/L) (Fig. 14A, B, C) não foram alteradas significativamente em *B. cephalus* expostos a 2 ppm de MP (Tabela 5, Figura 18).

Tabela 3 –Valores médios (\pm SEM) das variáveis hematológicas de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm do organofosforado MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Variável	Controle	MP-96h
Eritrócitos		
Hematócrito(%)	39,42 \pm 2,4	45,42 \pm 1,34
Hb (g/dL)	9,81 \pm 1,34	12,11 \pm 0,74
RBC (erit./mm ³)	2,59 \pm 0,15 x10 ⁶	2,71 \pm 0,10 x10 ⁶
VCM (μ m ³)	155,88 \pm 14,77	169,68 \pm 8,38
HCM (pg/cél.)	37,7 \pm 4,40	44,71 \pm 1,38
CHCM (%)	25,5 \pm 4,3	26,7 \pm 1,7
Leucócitos (cél./mm³)	5,34 \pm 0,76 x10 ⁴	5,66 \pm 0,8 x10 ⁴
Trombócitos (cél./mm³)	7,56 \pm 0,93 x10 ⁴	8,13 \pm 1,29 x10 ⁴

Tabela 4 – Porcentagem de leucócitos (\pm SEM) de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm do organofosforado MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Leucócitos	Controle	MP 96h
Monócitos(%)	22,63 \pm 4,85	14,37 \pm 2,98
Linfócitos(%)	73,74 \pm 5,32	79,07 \pm 3,66
G (%)	3,63 \pm 1,04	6,54 \pm 1,37

Tabela 5 –Valores médios (\pm SEM) da osmolalidade, pH e concentração de íons plasmáticos de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm do organofosforado MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Variável	Controle	MP 96h
Osmolalidade (mOsmol/kgH ₂ O)	360,6 \pm 3,17	385,3 \pm 18,03*
pH	7,41 \pm 0,07	7,17 \pm 0,03*
Cl ⁻ (mEq/L)	104,7 \pm 19,82	93,27 \pm 7,68
Na ⁺ (mEq/L)	182 \pm 13,84	153,66 \pm 9,19
K ⁺ (mEq/L)	6,22 \pm 0,37	5,75 \pm 0,49

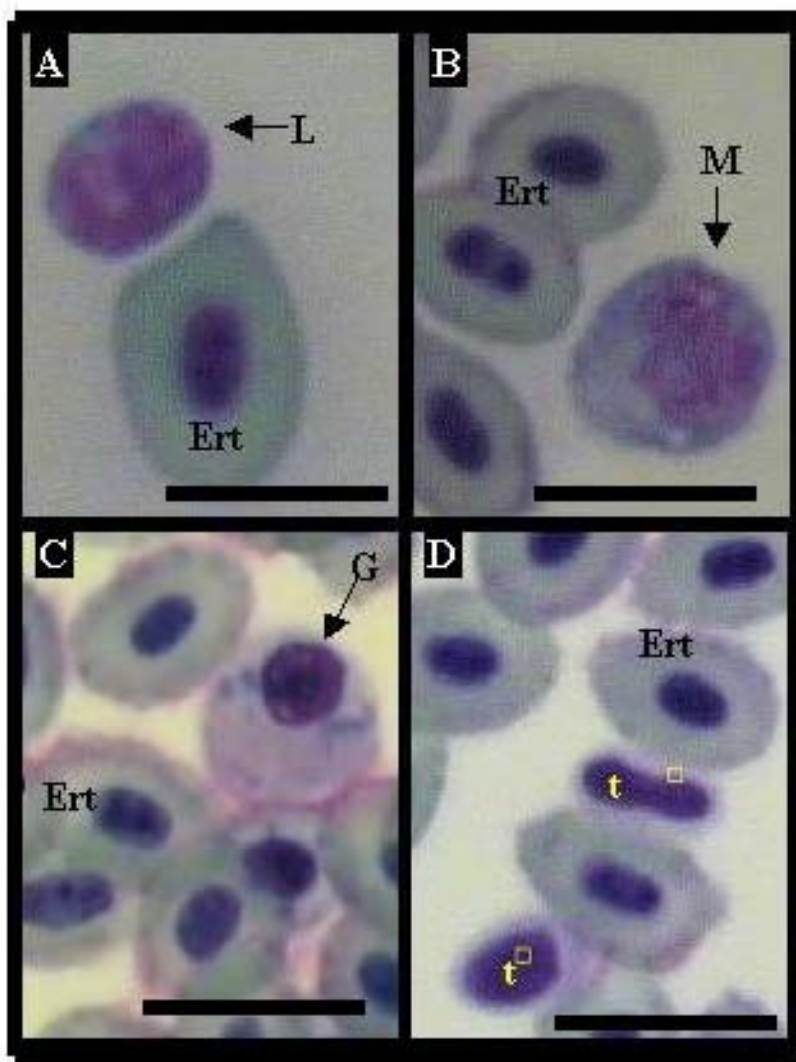


Figura 12. Células sanguíneas de *B. cephalus*. **A.** Linfócito (L) e eritrócito (Ert); **B.** Monócito (M); **C.** Célula Granulocítica Especial (G); **D.** Trombócito (t); Barra de escala = 10 μ m.

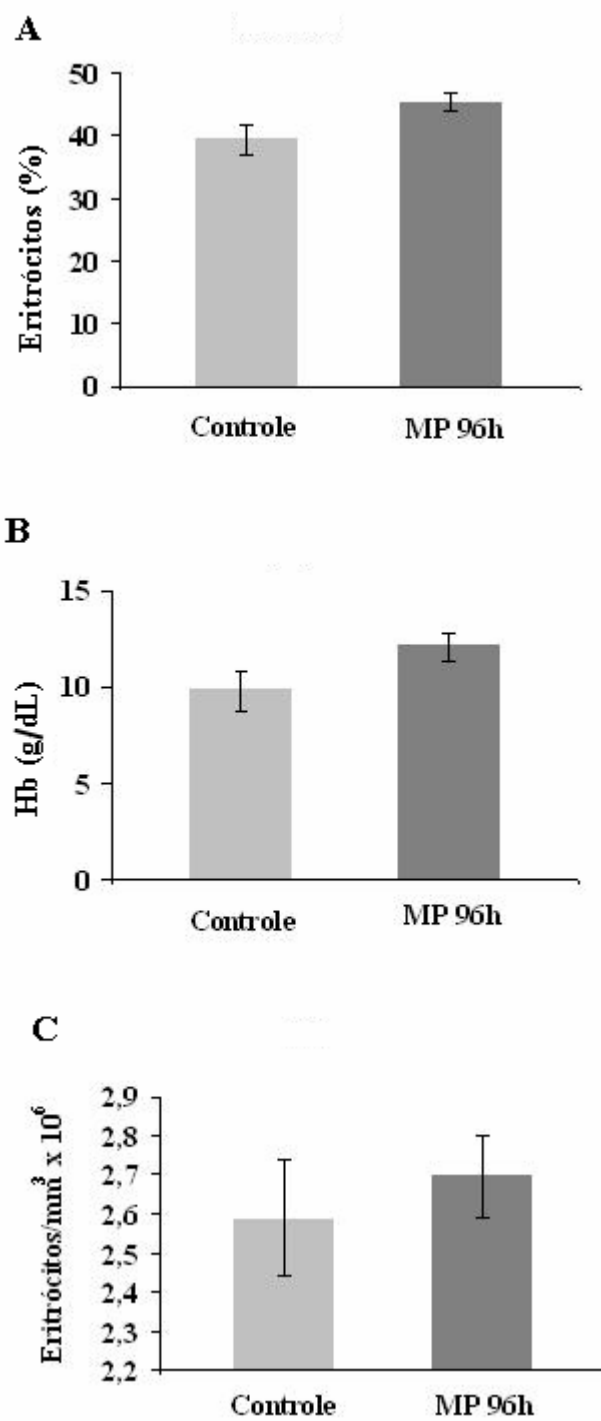


Figura 13. Valores médios (\pm SEM) do hematócrito (A); da concentração de hemoglobina (B); e da contagem de eritrócitos (C) do sangue de *B. cephalus* (n = 6) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

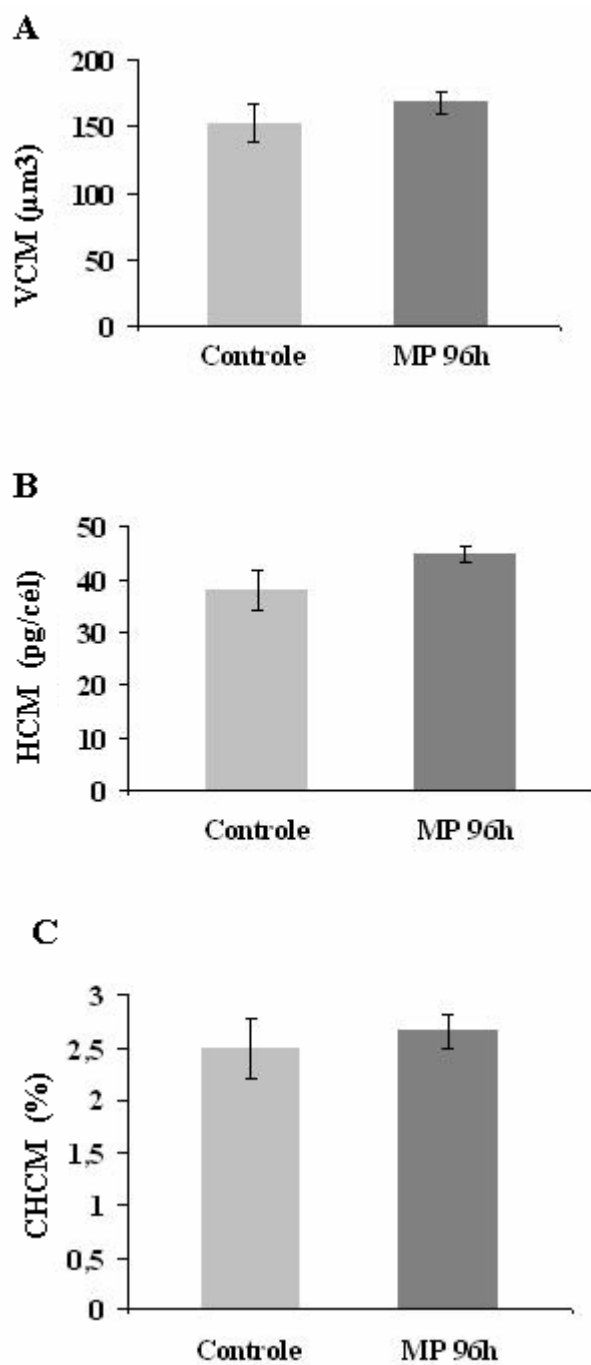


Figura 14. Valores médios (\pm SEM) do volume corpuscular médio, VCM, (A); da hemoglobina corpuscular média, HCM, (B); e da concentração de hemoglobina corpuscular média, CHCM, (C) do sangue de *B. cephalus* ($n = 6$) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

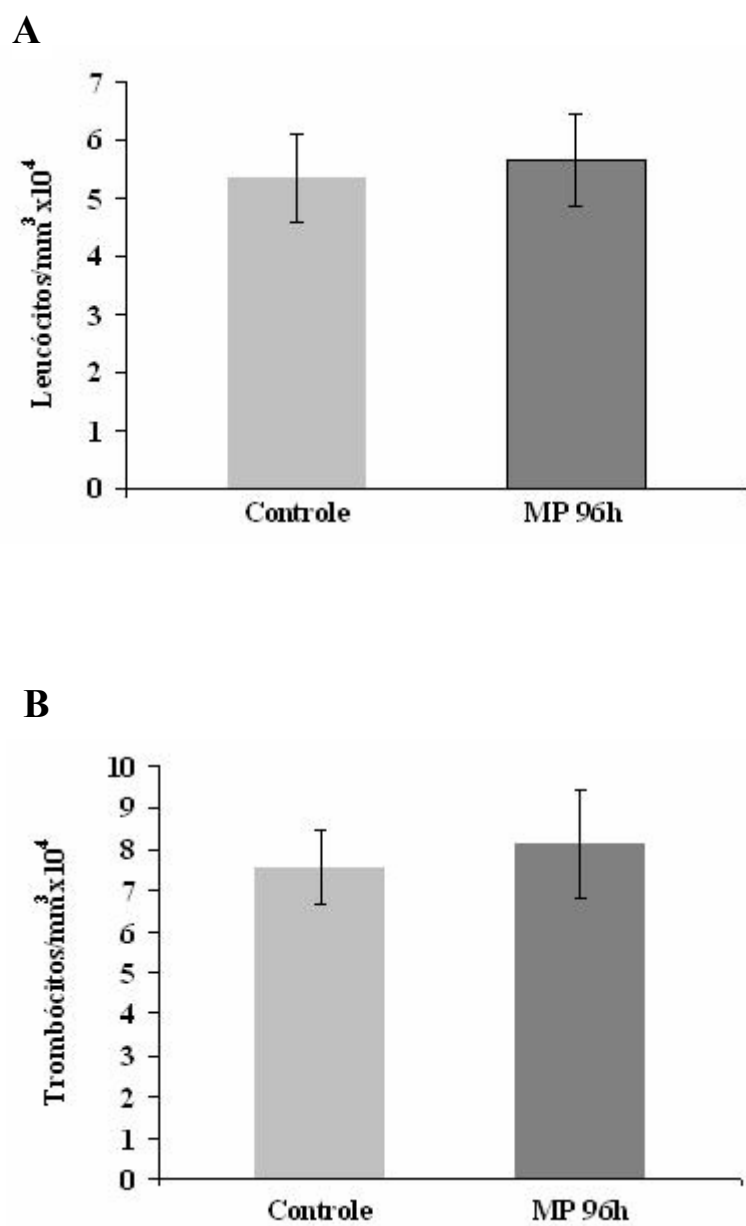


Figura 15. Valores médios (\pm SEM) da contagem de Leucóцитos (**A**); e da contagem Trombóцитos (**B**) do sangue de *B. cephalus* (n = 6) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

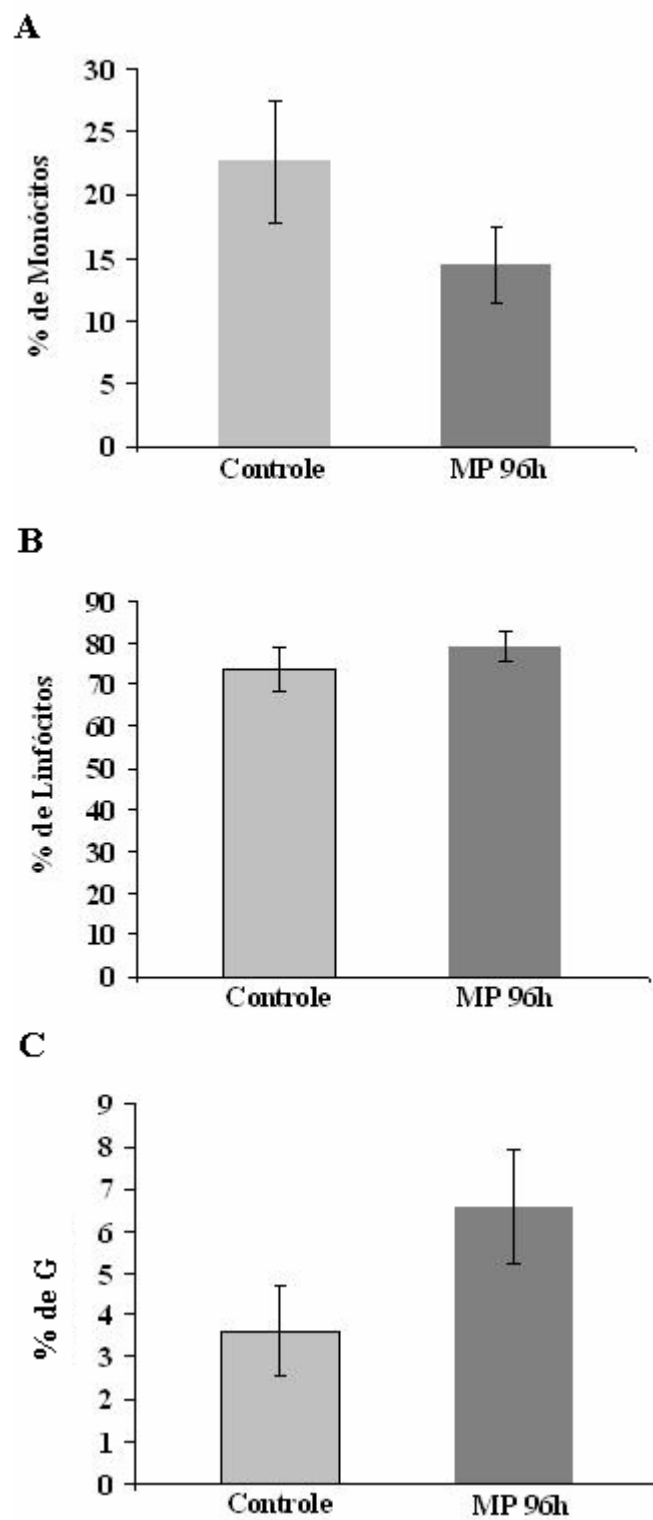


Figura 16. Valores médios (\pm SEM) da porcentagem de Monócitos (**A**); da porcentagem de Linfócitos (**B**); e da porcentagem de Células Granulocíticas Especiais, G (**C**) do sangue de *B. cephalus* ($n = 6$) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96 horas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

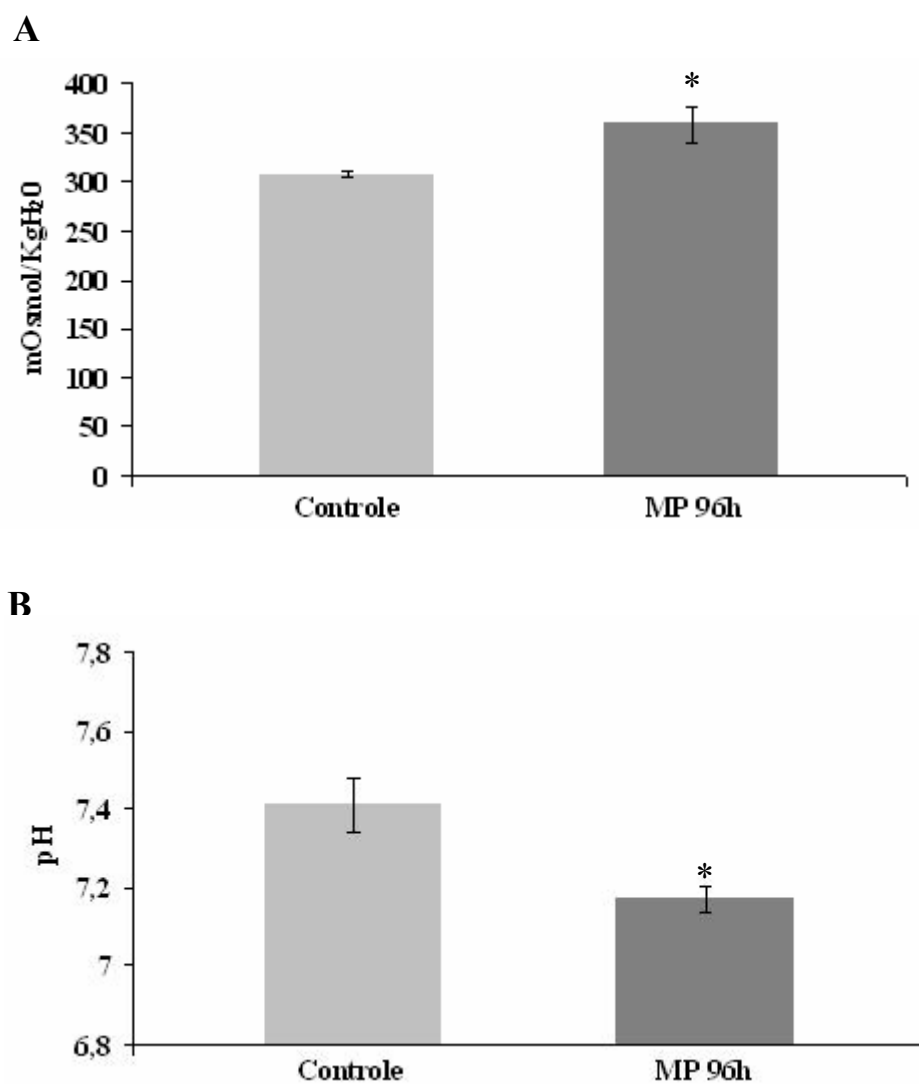


Figura 17. Valores médios (\pm SEM) da osmolalidade (mOsmol/KgH₂O) plasmática (**A**) e pH do sangue (**B**) de *B. cephalus* (n = 6 em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

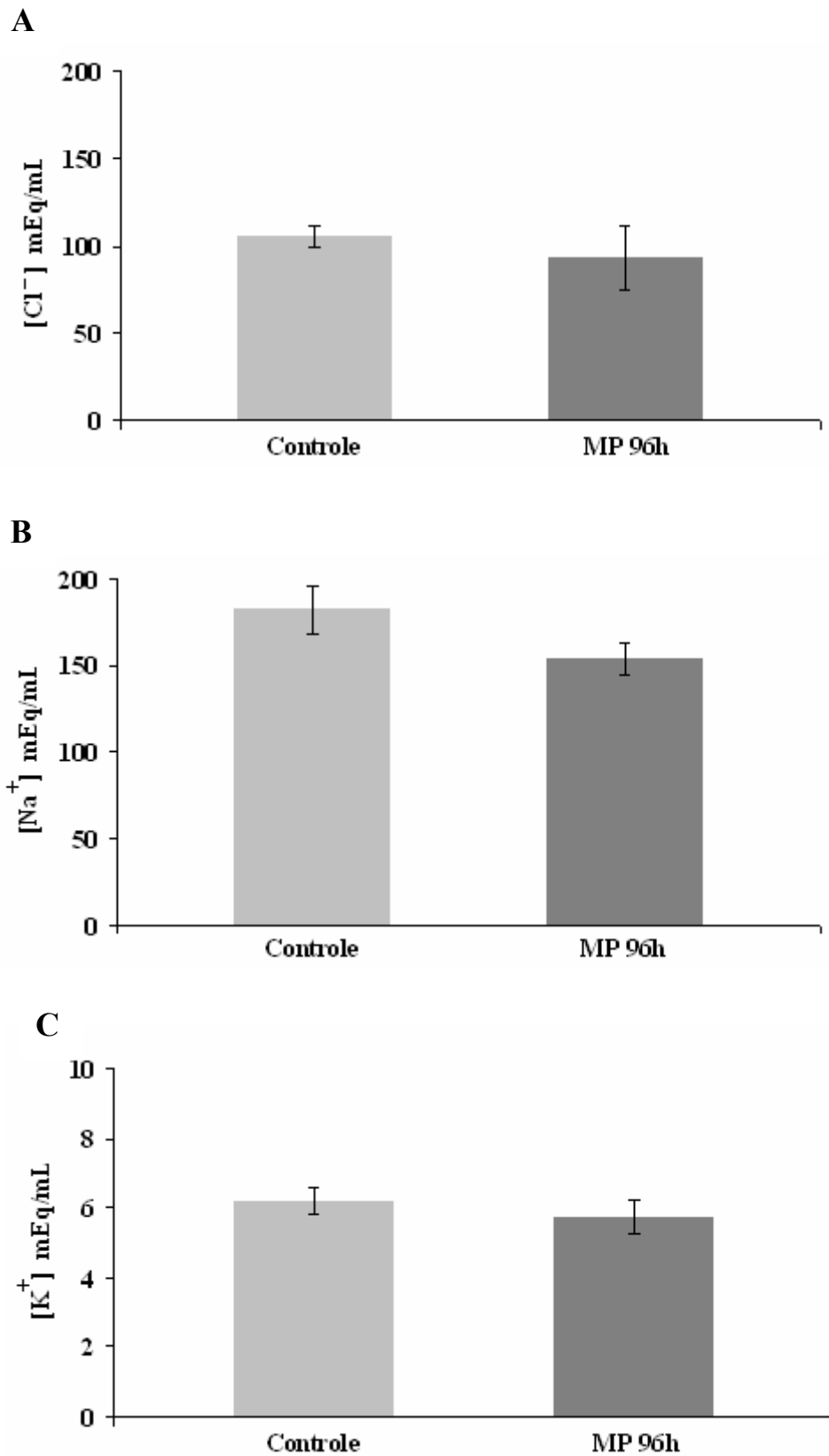


Figura 18. Valores médios (\pm SEM) da concentração plasmática de Cl⁻ (mEq/mL) (A), de Na⁺ (mEq/mL) (B) e de K⁺ (mEq/mL) (C) de *B. cephalus* (n = 6 cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

4.3. Intermediários metabólicos

A concentração de cortisol no plasma no grupo controle foi 8.05 ± 0.69 $\mu\text{g/dL}$ e houve alteração significativa ($p < 0,05$) após 96h de exposição a concentração subletal de MP ($9,9 \pm 0,58$ $\mu\text{g/dL}$) (Tabela 6, Figura 19). A concentração de glicose plasmática foi de $3,85 \pm 0,07$ $\mu\text{M/mL}$ no grupo controle e no grupo experimental ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) em 96 horas ($5,68 \pm 0,45$ $\mu\text{M/mL}$) de exposição ao MP o que representou um aumento de 47,53% em relação ao controle (Tabela 6). As concentrações médias de lactato e piruvato no grupo controle foram $71,77 \pm 11,7$ e $0,04 \pm 0,003$ $\mu\text{M/mL}$ respectivamente, e a exposição ao MP causou redução significativa ($p < 0,05$) na concentração do lactato ($15,24 \pm 3,15$ $\mu\text{M/mL}$) e não alterou a de piruvato (Tabela6).

A concentração média de amônia plasmática no grupo controle foi de $3,03 \pm 0,27$ $\mu\text{M/mL}$ e ocorreu aumento no grupo exposto 96 horas ao MP (Tabela 6).

As concentrações médias de glicose, lactato e piruvato no fígado são mostradas na Tabela 7. A concentração de glicose no grupo controle foi de $500,72 \pm 98,4$ $\mu\text{M/g}$ e após 96h de exposição ao MP diminuiu 60% ($298,47 \pm 59,77$ $\mu\text{M/g}$). A concentração média de lactato e piruvato hepático no grupo controle foi $10,7 \pm 0,8$ e $2,74 \pm 0,14$ $\mu\text{Mol/g}$. Ocorreu uma diminuição de aproximadamente 85% na concentração de lactato após 96h de exposição ao MP ($1,61 \pm 0,16$ $\mu\text{Mol/g}$, $p < 0,05$) e, como observado no plasma, a concentração de piruvato também não foi alterada.

A concentração de amônia hepática no grupo controle foi $117,66 \pm 6,01$ $\mu\text{M/g}$, e em 96 horas detectou-se um aumento significativo de 44,44% ($169,96 \pm 6,58$ $\mu\text{M/g}$) em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Tabela 6. Valores médios \pm S.E.M de cortisol, glicose e lactato plasmático de matrinxã, *B. cephalus* exposto a 2ppm de metil paration durante 96h. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança ($p < 0,05$).

Parâmetros	Controle	MP 96 horas
Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	$8,05 \pm 0,69$	$9,9 \pm 0,58$ *
Glicose ($\mu\text{M/mL}$)	$3,85 \pm 0,07$	$5,68 \pm 0,45$ *
Piruvato ($\mu\text{M/mL}$)	$0,4 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,02$
Lactato ($\mu\text{M/mL}$)	$71,77 \pm 11,7$	$15,24 \pm 3,15$ *
Amônia ($\mu\text{M/mL}$)	$3,03 \pm 0,27$	$4,37 \pm 0,15$ *

Tabela 7. Valores médios \pm erros padrões dos parâmetros bioquímicos hepáticos de matrinxã exposto a 2ppm de metil paration durante 96h. * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança ($p < 0,05$).

Parâmetros	Controle	96 horas
Glicose($\mu\text{M/g}$)	$500,72 \pm 98,4$	$298,47 \pm 59,77$ *
Piruvato($\mu\text{M/g}$)	$2,74 \pm 0,14$	$2,97 \pm 0,29$
Lactato($\mu\text{M/g}$)	$10,7 \pm 0,8$	$1,61 \pm 0,16$ *
Amônia($\mu\text{M/g}$)	$117,66 \pm 6,01$	$169,96 \pm 6,58$ *

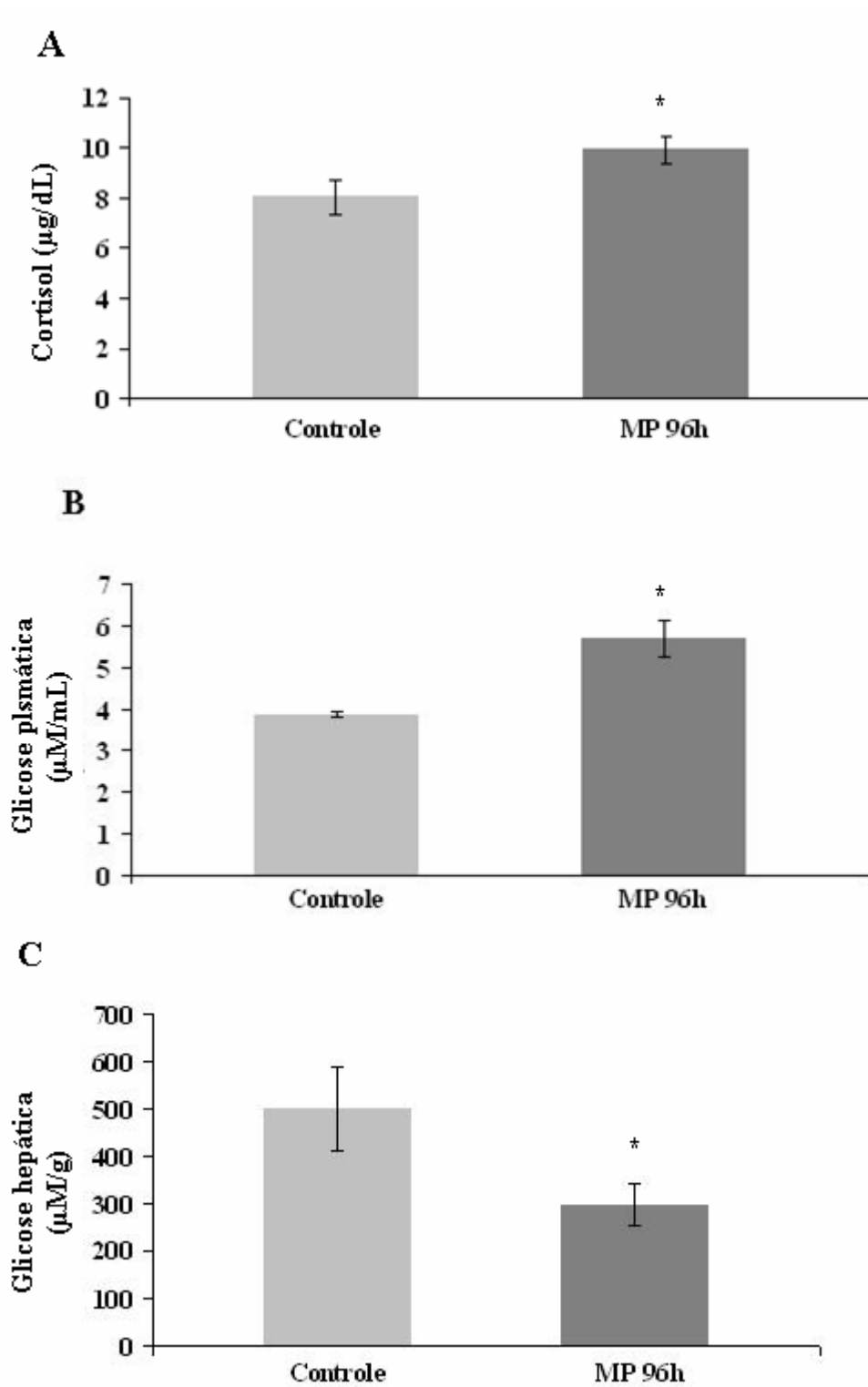


Figura 19. Valores médios (\pm SEM) da concentração de cortisol plasmático (A), glicose plasmática (B) e da concentração de glicose hepática (C) de *B. cephalus* ($n = 6$ em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

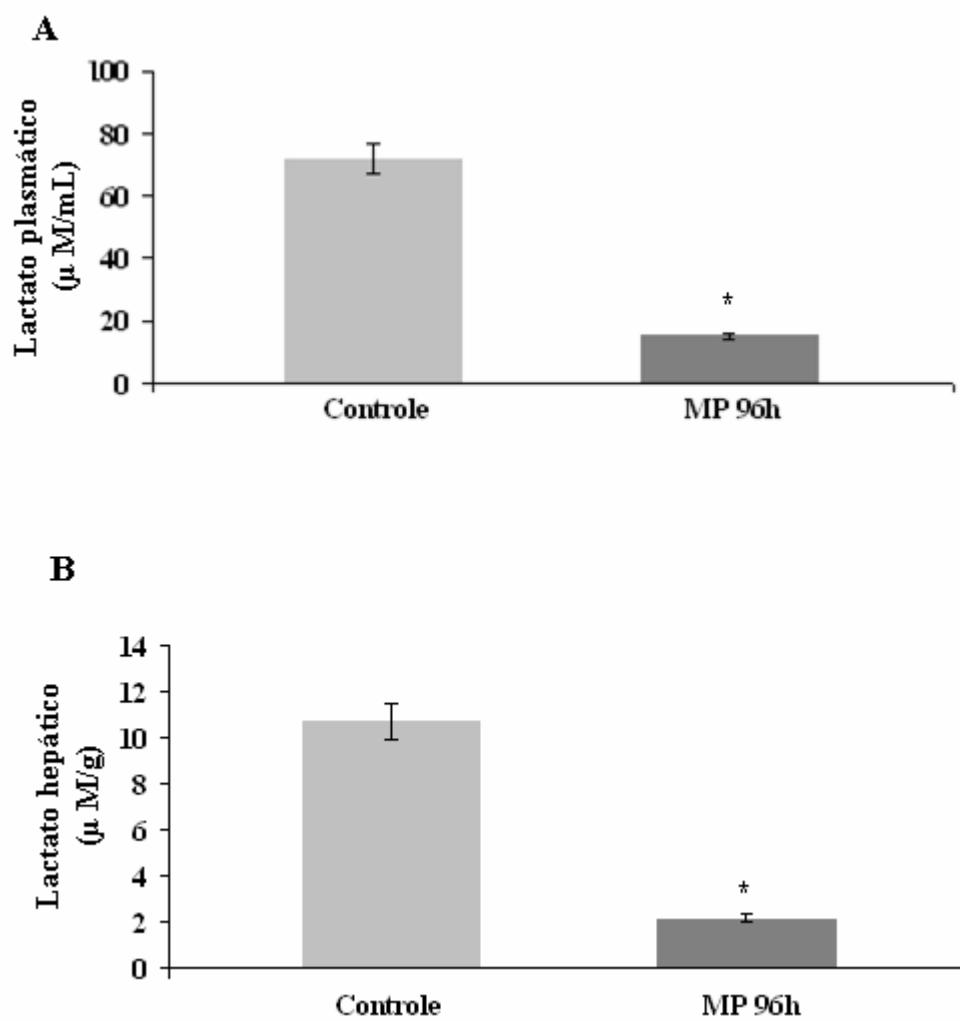


Figura 20. Valores médios (\pm SEM) da concentração do lactato plasmático (**A**) e da concentração do lactato hepático (**B**) de *B. cephalus* ($n = 6$ em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

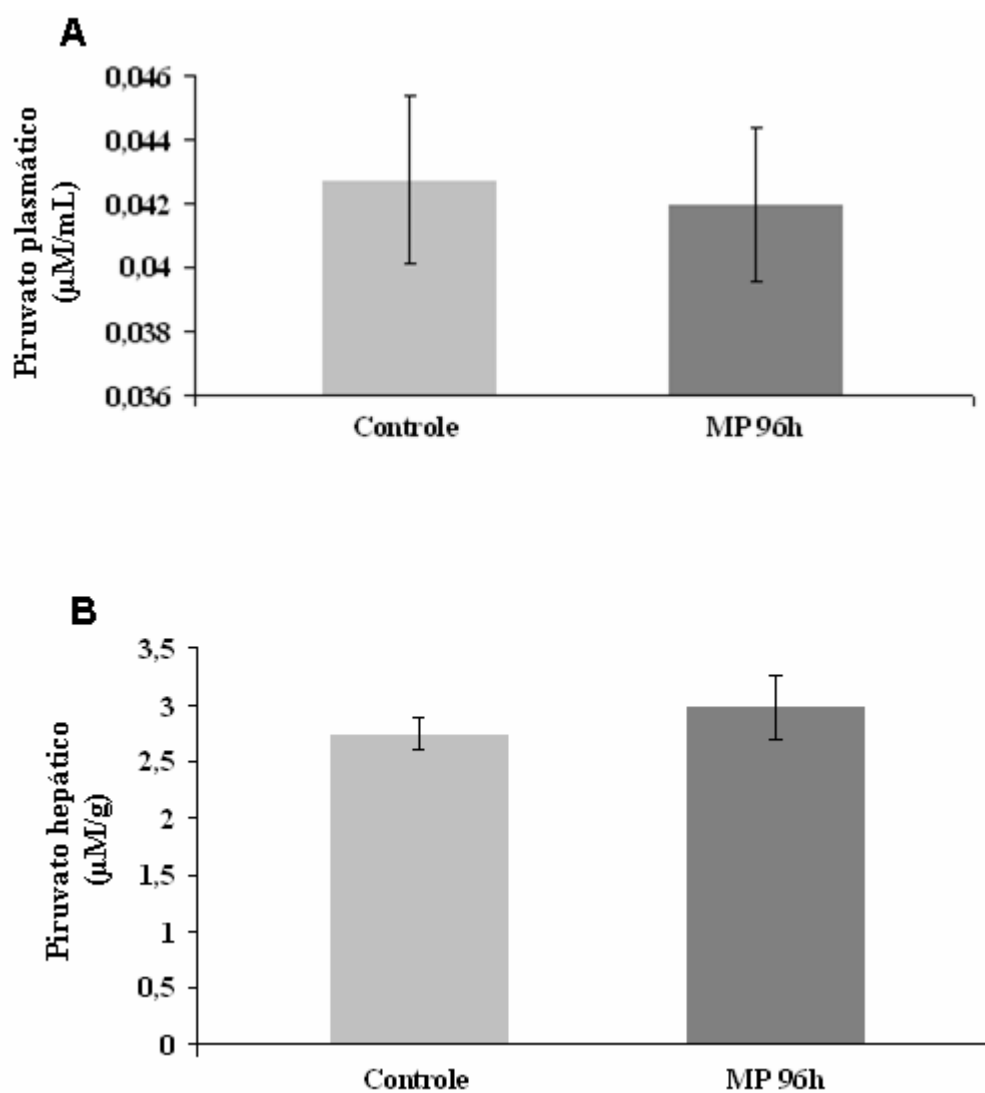


Figura 21. Valores médios (\pm SEM) da concentração de piruvato plasmático (**A**) e da concentração de piruvato hepático (**B**) de *B. cephalus* ($n = 6$ em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

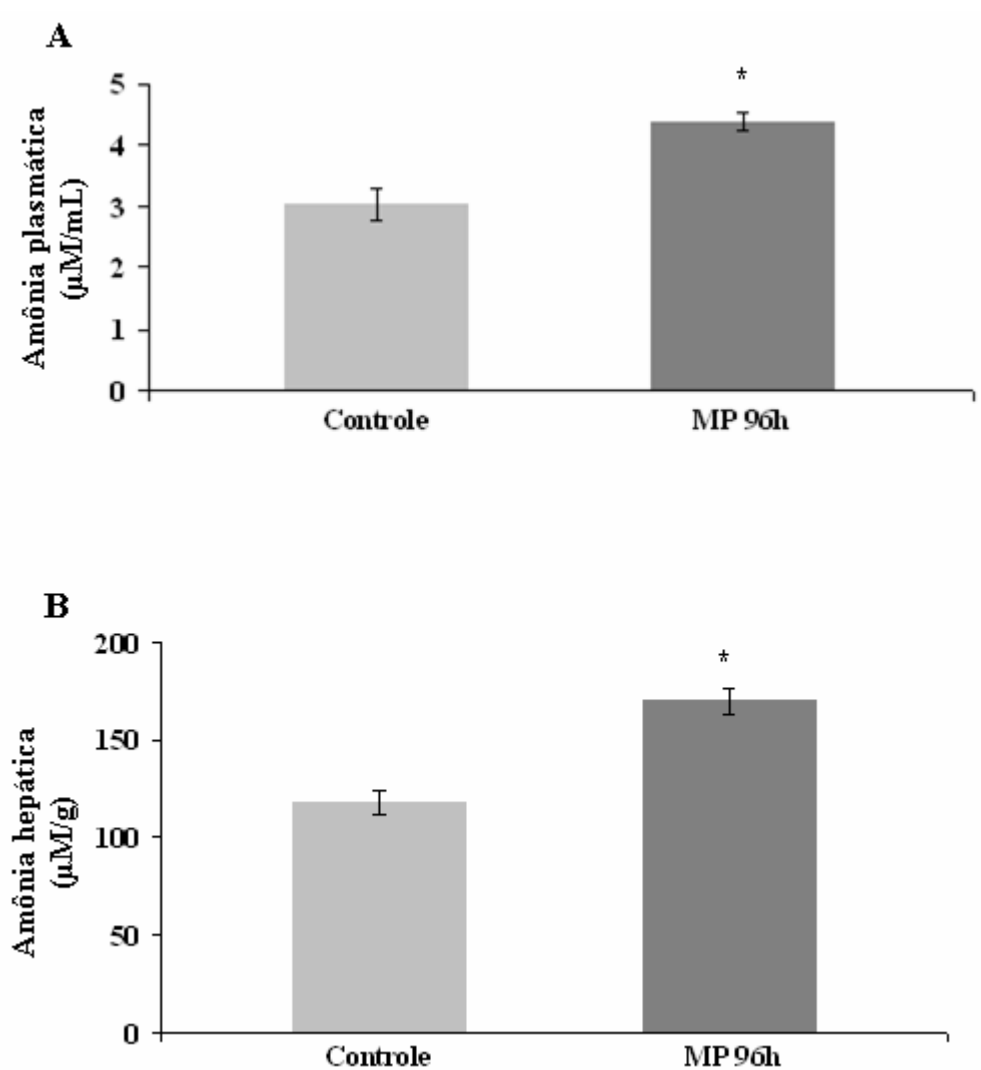


Figura 22. Valores médios (\pm SEM) da concentração de amônia plasmática (A) e da concentração de amônia hepática (B) de *B. cephalus* ($n = 6$ em cada grupo) do grupo controle e grupo exposto a 2 ppm de MP durante 96h. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A ausência de mortalidade de *B. cephalus* durante a exposição a 2 ppm de metil paration (MP) (correspondente a 1/3 da CL_{50-96h} ($CL_{50-96h} = 6,54 \pm 0,87$ ppm a 25°C, $pH_{\text{água}} = 6,82-7,83$, AGUIAR, 2002) corrobora com os estudos anteriormente desenvolvidos nesta espécie (AGUIAR, 2002, AGUIAR *et al.*, 2004, MONTEIRO *et al.*, 2006) confirmando que esta concentração é subletal para a mesma. AGUIAR *et al.* (2004) demonstraram que o MP causa toxicidade moderada em *B. cephalus* nas condições de temperatura e pH da água descrita acima e que a diminuição ou o aumento do pH da água implica em um aumento da toxicidade do MP (avaliada pela inibição da acetilcolinesterase) sendo que em água com pH ácido a toxicidade deste composto é maior que em pH alcalino (AGUIAR, 2002).

Embora a exposição a 2 ppm de MP não cause mortalidade em *B. cephalus*, a exposição a essa concentração de MP durante 4 horas causa inibição da atividade da acetilcolinesterase no cérebro e plasma e lesão no fígado e coração (AGUIAR *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005). Recentemente, MONTEIRO *et al.* (2006) estudando o nível de peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidantes no fígado, brânquias e músculo branco em *B. cephalus* expostos à mesma concentração de MP verificou que ocorreu estresse oxidativo nestes tecidos sendo que as brânquias e os músculos foram os órgãos mais sensíveis sugerindo que provavelmente estes órgãos possuem potencial antioxidante menor que o fígado.

As alterações morfológicas são conseqüências de alterações bioquímicas que alteram a função da célula e podem ocorrer devido à ação direta de um agente tóxico ou, indireta, vias hormônios do estresse, principalmente o cortisol (NOLAN, 2000). As alterações histológicas representam uma resposta intermediária a estressores sub-letais considerando sua localização relativa dentro do nível biológico de organização (Figura

23) e a histologia representa um método rápido e de baixo custo para detectar os efeitos de estressores in vários tecidos e órgãos (BERNET *et al.*, 1999; SILVA & MARTINEZ, 2006).

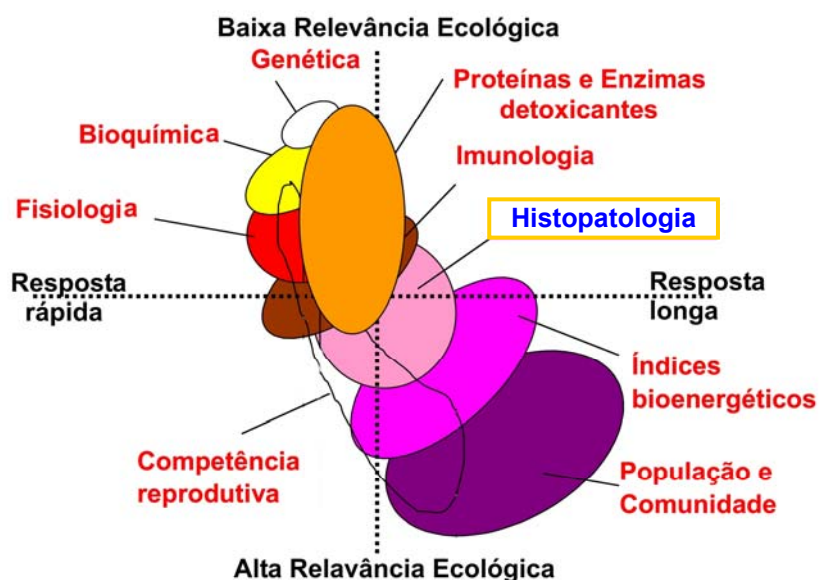


Figura 23. Organização biológica indicando o nível dos processos ou sistemas envolvidos em respostas rápidas e resposta a longo prazo no organismo e a relevância ecológica de acordo com ADAMS (2002).

O rim anterior está integrado ao sistema endócrino dos peixes devido a presença das células cromafins, que podem ser estimuladas pelo eixo HSC, e das células interrenais, que pode ser estimulada pelo eixo HHI, que estão associadas a esse órgão (DONALDSON, 1981; WENDELAAR BONGA, 1997). As células interrenais secretam corticosteróides, principalmente o cortisol, o hormônio do estresse. O aumento da concentração de cortisol no plasma em resposta a um estressor como, por exemplo, o MP implica em aumento da atividade da interrenal, que pode ser avaliada via medidas da área dessas células e do seu núcleo (DONALDSON, 1981; YANG & ALBRIGHT, 1995 *in* QUINTANA, 2002). Estresse crônico, em geral relacionado à exposição

subletal a um xenobiótico, pode resultar em hipertrofia das células interrenais em peixes (NORRIS *et al.*, 1997; QUABIUS *et al.*, 2000).

DONALDSON (1981) mostrou que há um aumento do diâmetro do núcleo das células interrenais em salmonídeos expostos a vários contaminantes e segundo YANG & ALBRIGHT (1995) uma forma de se avaliar a atividade secretora das células interrenais é realizar a medida do diâmetro dos núcleos e do tamanho das células. Aumento do diâmetro e área dessas células foram observadas em *Salmo trutta* provenientes de ambientes contaminados por metais pesados (NORRIS *et al.*, 1997), em *Polyodon spathula* exposto a PCBs (GUNDERSEN *et al.*, 2000), em *Astyanax altiparanae* coletados em rio impactado pela atividade humana (SILVA & MARTINEZ, 2006).

O aumento da área dos núcleos e das células interrenais de exemplares de *B. cephalus* expostos à concentração subletal de MP pode estar relacionado a hiperatividade dessas células e pode indicar uma possível estimulação crônica pelo eixo HHI. Todavia, o nível de cortisol plasmático em *B. cephalus* após 96h de exposição ao MP mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle. O hipotálamo através do CRF (fator liberador de corticotrofina) controla a síntese de ACTH na hipófise, assim o eixo HHI é ativado e termina por aumentar os níveis de cortisol circulante (Rotllant *et al.*, 2000; Clements *et al.*, 2002; Quintana, 2002; Engelsma *et al.*, 2002). Em *B. cephalus* expostos ao MP os níveis de glicose no plasma e no fígado, respectivamente mais alto e mais baixo que no grupo controle possivelmente estão relacionados à mobilização de energia uma vez que alterações bioquímicas e enzimáticas foram demonstradas em exemplares desta espécie expostos à mesma concentração de MP (AGUIAR *et al.*, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2006). Além disso, a

recuperação das alterações morfológicas observadas nas brânquias de *B. cephalus* implica em gasto de energia.

As alterações morfológicas induzidas por xenobióticos nas brânquias dos peixes, em geral, correspondem a dois tipos de respostas: defesa (respostas inflamatórias) e compensatória (proliferação celular, secreção de muco) (MALLATT, 1985; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995; MAZON *et al.*, 2002a, CERQUEIRA & FERNANDES, 2002). Ambas as respostas auxiliam a bloquear a entrada do agente tóxico no organismo ou impedir que este alcance a corrente sangüínea e, indiretamente, reduzir a ação tóxica destes agentes no tecido branquial. As alterações do epitélio branquial parecem ser uma resposta generalizada à maioria dos agentes tóxicos (MALLATT, 1985) e pode comprometer a função do órgão. Considerando que as brânquias são os principais sítios de trocas gasosas e tem importante papel na regulação iônica e ácido-base e que o epitélio branquial é, portanto, um tecido dinâmico e metabolicamente ativo (MUELLER *et al.*, 1991; MARTINEZ, 2004), as lesões no tecido branquial podem implicar em disfunção respiratória e hidroeletrolítica.

No presente estudo, o MP não provocou resposta inflamatória no tecido branquial como observado pela ausência de leucócitos nos raros locais onde ocorreram os deslocamentos do epitélio lamelar. Respostas inflamatórias são comuns quando ocorrem lesões no tecido branquial principalmente aquelas causadas por exposição em água contaminada com bactérias ou outros microrganismos ou água contendo material sólido em suspensão (MAGOR, 1988).

As alterações identificadas nas brânquias de *B. cephalus* expostos à concentração subletal de MP como a hiperplasia do epitélio do filamento com fusão parcial de algumas lamelas secundárias e o deslocamento do epitélio lamelar são respostas que podem reduzir a difusão do MP como ocorrem em outras espécies

expostas a diferentes xenobióticos (MAZON *et al.*, 2002a; KRUYNSKI, 2004). Respostas semelhantes, porém mais severas, foram relatadas por FANTA *et al.* (2003), após exposição de *Corydoras paleatus* a níveis subletais de Folidol 600[®] em água ou administrados via ração. Em apenas 1 hora de exposição os animais já apresentaram alterações significativas nas lamelas, após 4 horas apresentaram edemas e deslocamento do epitélio da lamela e após 8 horas de exposição foram observados focos de necroses no tecido branquial. No presente estudo, focos de necrose não ocorreram nas brânquias de *B. cephalus*.

A proliferação das células-cloreto no epitélio do filamento e das lamelas e a hipertrofia dessas células são consideradas como respostas compensatórias para manter o equilíbrio iônico que, em geral, é alterado durante o estresse causado pelo agente estressor (WENDERLAAR BONGA 1997, DANG *et al.*, 2000, MAZON *et al.*, 2002a,b, SAKURAGUI *et al.*, 2003). Em peixes de água doce as catecolaminas liberadas durante o estresse provocado pela exposição a um agente tóxico aumentam o fluxo sanguíneo nas brânquias e favorece a perda de íons do sangue para o meio aquático enquanto que o cortisol estimula a proliferação de células-cloreto e o aumento de unidades de Na⁺/K⁺-ATPase nas células-cloreto (DANG *et al.*, 2000) e, conseqüentemente a absorção ativa de íons. Entretanto, quando o agente estressor causa inibição direta na atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase ou induz necrose ou ainda indiretamente, via hormonal, reduz o ciclo celular, a hiperplasia e hipertrofia das células-cloreto pode não ser suficiente para restaurar o equilíbrio iônico. Neste estudo, a indução da proliferação e hipertrofia das células-cloreto e a possível manutenção da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase pelo MP pode explicar a manutenção dos níveis de íons Na⁺ e Cl⁻ plasmáticos. O aumento da osmolalidade plasmática nos animais expostos ao MP pode ter ocorrido devido ao aumento de outras substâncias no plasma como

conseqüências de lesão celular em outros tecidos. AGUIAR (2002) relatou aumento da atividade da enzima alanina aminotransferase no plasma e diminuição no fígado de matrinxã exposto ao MP sugerindo lesão hepática com extravasamento da enzima alanina amino transferase (AAT) para o plasma. Por outro lado, a redução do pH sanguíneo em matrinxã exposto ao MP evidencia um desequilíbrio ácido-base talvez causado por uma redução na capacidade das brânquias de eliminar H^+ .

A interferência na função respiratória devido à proliferação e hipertrofia das células-cloreto nas lamelas que causam um aumento da espessura da lamela e da distância de difusão água-sangue do O_2 e CO_2 tem sido amplamente documentado por causar redução na PO_2 arterial (BINDON *et al.*, 1994; GRECO *et al.*, 1995; SAKURAGUI *et al.*, 2003) e na tensão crítica de O_2 (BOECK *et al.*, 1995). Além disso, a redução da distância entre as lamelas secundárias e da altura da lamela implica em redução da superfície respiratória e alteração no fluxo de água sobre as lamelas diminuindo o tempo de difusão de gases, durante o ciclo respiratório. Redução na transferência de O_2 da água para o sangue pode gerar hipóxia interna e induzir a liberação de eritrócitos na corrente sanguínea, via catecolaminas, ou aumento no volume dos eritrócitos. A ausência de aumento significativo das variáveis hematológicas (Hct, RBC e concentração de Hb) em matrinxã expostos ao MP evidencia que, embora tenha ocorrido proliferação das células-cloreto nas lamelas dessa espécie e uma possível redução da superfície respiratória, essas alterações parecem não terem sido intensas o suficiente para induzir hipóxia celular.

Os estudos realizados nesta espécie por AGUIAR (2002), Aguiar e colaboradores (2004) mostraram que matrinxã exposto à concentração subletal de MP durante 96h não apresentaram aumento na concentração de lactato no plasma, fígado e músculo o que corrobora com a hipótese de que o suprimento de O_2 aos tecidos foi

mantido. No presente estudo os níveis de lactato plasmático e hepático diminuíram, sugerindo a ausência de metabolismo anaeróbico.

Embora não tenha ocorrido hipertrofia das células mucosas no epitélio do filamento, o aumento discreto na frequência dessas células sugere que houve um aumento na produção de muco. Segundo MITTAL *et al.* (1994) o muco secretado pelas células mucosas é constituído por macromoléculas complexas que possuem natureza diversificada dentre as quais se encontram as glicoproteínas. Alterações na área e frequência das células mucosas nas brânquias tem sido considerada como uma resposta às alterações na composição iônica (LAURENT & HEBIBI, 1989, MORON, 2002, MORON *et al.*, 2003), concentração de cálcio (PERRY & WOOD, 1985) e presença de agentes tóxicos no meio aquático (WENDELAAR BONGA *et al.*, 1989). Em geral, o muco forma uma barreira que diminui a difusão dos agentes tóxicos do meio aquático para o sangue tendo uma função de proteção do tecido branquial (HANDY *et al.*, 1989). Além disso, segundo HANDY & EDDY (1989) próximo ao muco há uma maior concentração de Na^+ e Cl^- do que na água circundante o que pode reduzir a perda de íons por difusão na superfície branquial e favorecer a absorção desses íons. Assim, neste estudo, o aumento na produção de muco, como sugerido pela hiperplasia das células mucosas, pode, até certo ponto, ter reduzido a perda de íons por difusão e favorecido a absorção ativa, além de aumentar a distância de difusão do MP, dificultando a entrada deste xenobiótico na corrente sanguínea.

Embora as células sanguíneas possam ser afetadas por inúmeros fatores tais como alterações sazonais, idade, sexo e maturidade sexual entre outros, estas células são consideradas importantes indicadores de alterações fisiopatológicas em peixes proporcionando informações sobre a resposta do organismo a um estressor. A análise de leucócitos, considerados as células de defesa do organismo, e dos

trombócitos que tem um papel na coagulação sangüínea e cuja função em peixes como parte do sistema de defesa (fagocitose e agregatória) ainda é muito discutida (HILL & ROWLEY, 1996, BURROWS *et al.*, 2001), evidenciou que dentre os leucócitos, os linfócitos, células associadas à resposta imune, foram os mais freqüentes em *B. cephalus* como relatado em outros teleósteos (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995, TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). Os monócitos, importantes devido a sua elevada atividade fagocítica quando transformados em macrófagos em tecidos danificados devido à reação inflamatória ou infecção bacteriana, e as células granulocítica especial (G), também denominadas como neutrófilos tipo I (ALAYE-RAHY, 1993; VEIGA *et al.*, 2000) foram menos freqüentes como em outros teleósteos. No sangue de matrinxã não foram encontrados basófilos e eosinófilos que são raros em sangue de peixes (POWELL *et al.*, 1990). Embora tenha ocorrido uma tendência a diminuição da porcentagem dos monócitos e aumento na de G, estes dados sugerem que as lesões nos tecidos de *B. cephalus* devido a exposição subletal ao MP não foram severas.

Os trombócitos são comparáveis às plaquetas dos mamíferos e tem papel importante na coagulação sangüínea evitando hemorragia. Segundo MAZON *et al.*, (2002b) as lesões severas do tecido branquial como ruptura do epitélio lamelar, degeneração celular e resposta inflamatória nas brânquias são, em geral, acompanhadas por alterações na porcentagem de leucócitos e número de trombócitos, o que não ocorreu em *B. cephalus* exposto à concentração subletal de MP, embora tenha ocorrido uma tendência a diminuição da porcentagem dos monócitos e aumento na de G. A ausência de modificações significativas nestas células sangüíneas sugere que a exposição à concentração subletal esse organofosforado não causou lesões severas nas brânquias ou em outros tecidos desta espécie.

O maior nível de amônia em um tecido pode ser devido a um aumento do catabolismo de proteínas como resultado do aumento da demanda energética como relatado no fígado e músculo de *Leporinus obtusidens* exposto ao herbicida glifosato Roundup (GLUSCZAK *et al.*, 2006) e em *Clarias batrachus* expostos ao herbicida carbamato, Carbofuran (BEGUM, 2004). Em *B. cephalus* o nível de amônia no plasma e no fígado estava maior, provavelmente por um aumento da demanda metabólica. O fígado é o principal órgão de detoxificação e está diretamente envolvido no metabolismo de agentes tóxicos (SANCHO *et al.*, 1998).

Os resultados do presente estudo mostraram que embora a exposição à concentração de 2 ppm de MP durante 96h cause inúmeras alterações enzimáticas (AGUIAR, 2002, AGUIAR *et al.*, 2004, ALMEIDA *et al.*, 2005, MONTEIRO *et al.*, 2006) e metabólicas (AGUIAR, 2002) em *B. cephalus*, as alterações morfológicas induzidas nas brânquias foram principalmente do tipo compensatória e considerada leve para moderada de forma que as funções do órgão foram parcialmente mantidas. Entretanto, a hipertrofia das células interrenais corroboram com o aumento no nível de cortisol plasmático. Este hormônio promove redução da proteína celular devido a diminuição da síntese protéica e aumento do catabolismo protéico nas células e pode promover aumento do transporte de aminoácidos para o interior das células hepáticas onde podem servir de substrato para a produção de glicose. O lactato produzido no músculo também pode chegar ao fígado trazido pelo sangue onde também pode ser convertido em glicose. O aumento do cortisol e da glicemia do plasma com diminuição da glicose hepática, redução nos níveis de lactato plasmático e hepático juntamente com a manutenção dos níveis de piruvato sugere um quadro de neoglicogênese para suprir a demanda metabólica dos tecidos e os processos de desintoxicação frente às inúmeras alterações enzimáticas e metabólicas citadas acima. Portanto, é importante enfatizar que

se a exposição ao MP persistir por tempo prolongado ou, no caso de exposição a concentrações mais elevadas, as lesões no tecido branquial poderão ser mais severas ocasionando uma disfunção na troca de gases e no equilíbrio eletrolítico. Considerando a disfunção da interrenal, o gasto de energia envolvido na restauração das alterações enzimáticas, fisiológicas e morfológicas que ocorreram após exposição ao MP, há possibilidade de ocorrer redução de outras funções como o crescimento e reprodução.

6. CONCLUSÕES

- O metil paration provoca alterações na atividade natatória de matrinxã à concentração de 2 ppm de MP durante 96h.

- As medidas das células interrenais mostraram que as mesmas estavam mais ativas que as células do grupo controle, sugerindo a ativação do eixo – HHI o que foi confirmado pelo aumento do cortisol plasmático.

- A concentração de 2 ppm de MP durante 96h em *B. cephalus* causa alterações nas brânquias, principalmente do tipo compensatórias em grau leve para moderada e algumas funções do órgão foram parcialmente mantidas.

- Os resultados hematológicos e a redução da concentração de lactato durante exposição à 2 ppm de MP por um período de 96h não induziu hipóxia em *B. cephalus*.

- O metabolismo do tecido hepático foi afetado pelo metil paration, com diminuição da concentração de lactato, manutenção da concentração do piruvato e aumento da glicemia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. (2002) Biological indicators of aquatic ecosystems stress: Introduction and overview. In biological indicators of aquatic ecosystems stress (Adams, M ed.), p. 1-11. Am. Fish. Sc, Bethesda.
- AGUIAR, L.H., (2002) Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (FOLIDOL 600®) sobre o teleosteo de água doce, matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869): Aspectos do metabolismo intermediário. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, 96p.
- AGUIAR, L.H., MORAES, G., AVILEZ, I. M., ALTRAN, A. E., CORRÊA, C. F. (2004) Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environmental Research** v. 95, p. 224 – 230.
- ALAYE-RAHY, N., (1993). Hematologia de aterinidos de águas dulces: gênero *Chirostoma* spp. del lado de Patzcuaro, Mich. **Cien Pesquera** v. 10, p. 97 – 109.
- ALMEIDA, L. C., AGUIAR, L. H., MORAES, G., (2005). Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Cienc. Rural** v. 35, 1-6.
- AVILEZ, I.M., ALTRAN, A. E., AGUIAR, L.H., MORAES, G., (2004). Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.**, v. 139, p. 135 – 139.
- BALLANTYNE, J.S. (1995). Metabolic organization of thermogenic tissues of fishes. In: HOCHACHKA, P. W. & MOMMSEN, T.P. (Eds.). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and molecular Biology of fishes.** Elsevier Science, Amsterdam. v. 4, pp.241 – 258.
- BALM, P. H. M. & POTTINGER, T. G. (1993). Acclimation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to low environmental pH does not involve an activation of the pituitary–interrenal axis, but evokes adjustments in branchial structure. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** v. 50, p. 2532 – 2541.
- BARTON, B. A. and IWAMA G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Rev. Fish.** v. 1, pp. 3 – 26.

- BEGUM, G., (2004) Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. **Aquat. Toxicol.** v. 66, p. 83 – 92.
- BENGUIRA, S, HONTELA, A. (2000) Adrenocorticotrophin and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate- stimulated cortisol secretion in interrenal tissue of rainbow trout exposed in vitro to DDT compounds. **Environ. Toxicol.Chem.**, v. 19, p. 842 – 847.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T., (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis.** v. 22, p. 25 – 34.
- BINDON, S.D., GILMOUR, K.M., FENWICK, J.C., PERRY, S.F., (1994). The effect of branchial chloride cell proliferation on gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **J. Exp. Biol.** v. 197, p. 47 – 63.
- BOECK, G., SMET, H., BLUST, R., (1995). The effect of sublethal levels of copper on the oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquat Toxicol.** v. 32, p. 127 – 141.
- BOEGER, W.; OSTRENSKY, A.; GUIMARÃES, A. T. B., ROMÃO S., (2003). Histopathology as an approach to evaluate the effect of the oil spill on fishes of the rivers Saldanha, Barigui, and Iguaçú (Brazil). Proc. Int. Oil Spill Conf.
- BRACCO, J. E., DALBON, M., MARINOTTI, O., BARATA, J. M. S. (1997) Resistência a inseticidas organofosforados e carbonatos em população de *Culex quinquefasciatus*. **Rev. Saúde Pública.** V. 31, n. 2, p. 183 – 183.
- BURROWS, A.S., FLETCHER, T.C., MANNING, M.J. (2001). Haematology of turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. **J. Appl. Ichthyol.** v. 17, p. 77 – 84.
- CAMPOS, J., ANDRADE, C. F. S. (2003) Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. **Rev. Saúde Pública.** v. 37, n. 4, 523 – 527.
- CASTAGNOLLI, N. (1992) **Criação de peixes de Água doce.** UNESP, Jaboticabal, 189 p.

- CAVALIERE, M. J., CALORE, E. E., PEREZ, N. M., PUGA, F. R., (1996) Miotoxicidade por organofosforados. **Rev. Saúde Pública**, v. 30, n. 3, 276 – 72.
- CEPTA (1994) I Seminário sobre criação de espécies do gênero *Brycon*. Anais, Purassununga, 82p .
- CERQUEIRA, C.C.C., FERNANDES, M.N., (2002) Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicol. Environ. Safety** v. 52, p. 83 – 91.
- CLEMENTES, S., SCHRECK, C. B., LARSEN, D. A., DICKHOFF, W. W. (2002) Central administration of corticotropin-releasing hormone stimulates locomotor activity in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) **General and Comparative Endocrinology**. v. 125, p. 319 – 327.
- CUNHA BASTOS, J., CUNHA BASTOS, V. L. F., ROSSINI, A., FORTINI, H., CASTRO FARIA, M. V., (1992) Activation of parathion by liver of *Hypostomus punctatus*, a Brazilian benthic fish (cascudo). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 94, Part C, 683–689.
- DABÉS, M. B. G. e S. & SANTOS, G. B. & RATTON, T. F. & MEDEIROS, G. R. (2001) Estudo da ictiofauna na barragem do rio do juramento, Juramento/MG, Brasil. **Unimontes Científica**. v. 1, n. 1, p. 105 – 16.
- DANG, Z., FLIK, G., WENDELAAR BONGA, S.E., LOCK, R.A.C., (2000). Cortisol increases Na^+/K^+ -ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **J. Exp. Biol.** v. 203, p. 2349 – 2355.
- DAS, B.K., MUKHERJEE, S.C., (2000). Sublethal Effect of Quinalphos on Selected Blood Parameters of *Labeo rohita* (Ham.) **Fingerlings Asian Fish**. Sc. 13, 225-233.
- DE LA VEGA SALAZAR, M.Y., TABCHE, L.M., GARCIA, C.M., (1997). Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez Dam in México. **Ecotox. Environ. Safety** v. 38, p. 53 – 62.
- DELGADO, I, F., PAUMGARTTEN, F. J. R. (2004) Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil **Cad. Saúde Pública** n. 20, v. 1, p. 180 – 186.

- DONALDSON, E.M., (1981). The pituitary–interrenal axis as indicator of stress in fish. **In: Pickering, A.D. (Ed.), Stress and Fish.** Academic Press, London, UK, pp. 11 – 47.
- DRABKIN, D.L., 1948. The standardization of hemoglobin measurement. **A. J. Med. Sci.** v. 215, p. 110 – 111.
- DUBOIS, M., GILES, K.A., HAMILTON, J.K., ROBERTS, P.A., SMITH, F., (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350 – 358.
- ENGELSMA, M. Y., HUISING, M. O., VAN MUISWINKEL, W. B., FLIK, G., KWANG, J., SAVELKOUL, H. F. J., VERBURG-VAN KEMENADE, L. V. (2002) Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v. 87, n. 3-4, p. 467 – 479.
- EROS, S.K., MILLIGAN, C.L. (1996). The effect of cortisol on recovery from exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): potential mechanisms of action. **Physiol. Zool.** v. 69, p. 1196 – 1214.
- ERWIN, W. M. R., KEIJZERS, R., CORNELIS, A.M., (2003). Acetylcholinesterase inhibition and increase food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to paration. **Aquat. Toxicol.** v. 64, p. 451 – 460.
- FANTA, E.; RIOS, F.S., ROMÃO, S.; VIANNA, A.C.C., FREIBERGER, S., (2003). Histopathology of fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotox.. Environ. Safety.** v. 54, p. 119-130.
- FERNANDES, M. N. & MAZON, A. F. (1999). Toxicity and Differential Tissue Accumulation of Copper in the Tropical Freshwater Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 6, p. 324 – 331.
- FERNANDES, M. N. ; PERNA MARTINS, S. A. (2001) . Epithelial gill cells in the armored catfish *Hypostomus cf. plecostomus* (Loricariidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 1, p. 69 – 78.
- FIGUEIREDO, G. M., SENHORINI, J.A., (1990). Influência de biocidas no desenvolvimento da carpa comum (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) e sobre o zooplâncton, durante o período de larvicultura. **Bol. Tec. CEPTA.** v. 31, p. 5-21.

- FRAGOSO, D. B., GUEDES R. N.C., LADEIRA, J. A. (2003) Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**. v. 32, n. 2, 329 – 34.
- GALLI, A., DE SOUZA, D., GARBELLINI, G. S., COUTINHO, C. F. B., MAZO, L. H., AVACA, L. A., MACHADO, S. A. S. (2006) Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Quim. Nova**. v. 29, n. 1, 105 – 112.
- GALVÃO, J. A. (2004) Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP. Piracicaba. Dissertação (Mestrado) – ESALQ/USP, 109 p.
- GENTZKOW, C. J., MASEN, J. M. (1942) An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol.Chem.** v. 143, p. 531 – 544.
- GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., CRESTANI, M., FONSECA, M.B., PEDRON, A.F., DUARTE, M.F., VIEIRA, V.L.P. (2006) Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol. Environm. Safety** v. 65 p. 237 – 241.
- GODOY, M. P. (1975) Peixes do Brasil – Subordem Ostariophysi – Bacia do Rio Mogi Guaçu. Editora Franciscana, Piracicaba.
- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIUS, E., (1971). Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Amer. J. Clin. Patthol.** v. 56, p. 35 – 39.
- GOUVÊA, S. P. (2004) O papel dos polissacarídeos algais extracelulares na dinâmica de metais no reservatório de Barra Bonita. São Carlos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 97p.
- GRECO, A.M., GILMOUR, K.M., FENWICK, J.C., PERRY, S.F., (1995). The effects of softwater acclimation on the respiratory gas transfer in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Exp. Biol.** v. 198, p. 2557 – 2567.
- GUERESCHI, R. M. (2004) Macroinvertebrados bentônicos em córregos da Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP: subsídios para monitoramento ambiental. São Carlos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlo, 82p.

- GUNDERSEN, D.T., MILLER, R., MISCHLER, A., ELPERS, K., MIMS, S.D., (2000). Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl and chlordancontaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 19, p. 2275 – 2285.
- HANDY, R.D., EDDY, F.B., ROMAIN, G., (1989). In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminum and zinc toxicity. **J. Fish Biol.** v. 35, p. 737 – 747.
- HANDY, R.D., EDDY, F.B., (1989). The absence of mucus on the secondary lamellae of unstressed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish Biol.** v. 38, p. 153 – 157.
- HARROWER, J.R., BROW, C.H., (1972). Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. **J. Appl. Physiol.** v. 32, p. 224 – 228.
- HILL, D.J., ROWLEY, A.F., (1996). The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **Brit. J. Haematol.** v. 92, p. 200 – 211.
- HONTELA, A. (1998) Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. **Env. Toxicol. Chem.**, v. 17, p. 44 – 48.
- HORI, T.S.F., (2005). Impacto da exposição crônica ao fenol no metabolismo, fisiologia e resposta ao estresse de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*: Teleostei; Characidae). São Carlos. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos, 119p.
- HOWARD, P.H., (1989). **Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals, v. III: Pesticides**. Lewis Publishers, Chelsea.
- IWAMA, G.K., AFONSO, L.O.B., VIJAYAN, M.M. (2004). Stress in fish. Aquanet workshop on fish welfare. Campbell River, B.C. Canada, p. 1-9.
- IZIÉL, A. C. U., PEREIRA-FILHO, M., MELO, L. A. S., MACÊDO, J. L. V. (2004) Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) **Acta Amazônica**. v. 34, n. 2, p. 179 – 184.
- JÜRSS, K.A. & BASTROP, R., (1995). Amino acid metabolism in fish. In: HOCHACHKA, P. W. & MOMMSEN, T. P. (eds.). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and molecular biology of fishes**. Elsevier Science, Amsterdam. v. 4, pp. 159 – 160.

- KRUZYNSKI, G.M., FARRELL, A.P., TIERNEY, K.B., SANDERS, S.M., BIRTWELL, I.K., (2004). Gill morphometry and hematology of juvenile chinook salmon chronically exposed to treated (elemental chlorine-free) bleached kraft pulp mill effluent at low temperature to simulate winter exposure. **Can. J. Zool.** v. 82, 1187 – 1193.
- LANDIS, W.G., MING-HO YU, (1995). **Introduction to Environmental Toxicology – Impacts of Chemicals upon Ecological Systems.** New York, Boca Raton, Florida, Lewis Publishers.
- LAURENT, P., HEBIBI, N., (1989). Gill morphometry and fish osmoregulation. **Can. J. Zool.** v. 67, p. 3055 – 3063.
- LAURENT, P., PERRY, S.F., (1991). Environmental effects on fish gill morphology. **Physiol Zool.** v. 64, p. 4 – 25.
- LI, H. AND ZHANG, S. (2002) In vitro cytotoxicity of the organophosphorous insecticide methylparathion to FG-9307, the gill line of flounder (*Paralichthys olivaceus*) **Cell Biology and Toxicology.** v. 18, p. 235 – 241.
- LU, G. D. (1939) The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.** v. 33 p. 249 – 254.
- MAGOR, B.G.,(1988). Gill histopathology of juvenile *Oncorhynchus kisutch* exposed to wood debris. **Can. J. Zool.** v. 66, p. 2164 – 2169.
- MALLAT, J., (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 42, p. 630-648.
- MARTINEZ, C.B.R., NAGAE, M.Y., ZAIA, C.T.B., ZAIA, D.A.M., (2004). Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Braz. J. Biol.** v. 64, p. 797 – 807.
- MATSUMURA, F., Toxicology of insecticides. 2 ed. New York: Plenum Press, 1985
- MAZON, A. F., CERQUEIRA, C.C.C., FERNANDES, M.N. (2002a). Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Environ. Res. A** v. 88, p. 52 – 63.

- MAZON, A. F., MONTEIRO, E.A.S., PINHEIRO, G.H.D., FERNANDES, M.N. (2002b). Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Braz. J. Biol.** v. 63, p. 621 – 631.
- MCKNIGHT, I. M. (1966). A hematological study on the mountain whitefish, *Prosopium williamsoni*. **J. Fish. Res. B. Can.** v. 23, p. 45 – 64.
- MEDONÇA, J. O. J. (1996) O gênero *Brycon*. Aquicultura, São Paulo, Brzazil, 153 p.
- MITTAL, A. K., UEDA, T., FUJIMORI, O., YAMADA, K. (1994). Histochemical analysis of glycoproteins in the unicellular glands in the epidermis of na Indian freshwater fish, *Mastacembelus pancalus* (Hamilton). **Histochem. J.** v. 26, p. 666 – 677.
- MOHAMMAD, A., RANJIBAR, A., SHAHIM, S., NIKFAR, S., REZAIE, A., (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. **Méd. Sci. Monit.** v. 10, p. 141 – 147.
- MOMMSEN, T., VIJAYAN, M., MOON, T. (1999). Cortisol in teleost: dynamics, mechanism of action and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries.** v. 9, p. 211 – 268.
- MONTEIRO, A. M. (2006) Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (Folisuper 600) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água matrinxã, *Brycon cephaus*, (Günther, 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos. 163 p.
- MONTEIRO, A.M., ALMEIDA, J.A., RANTIN, F.T., KALININ, A.L., (2006). Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorous insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp. Biochem. Physiol. C,** v. 143, p. 141-149.
- MOREIRA, J. C., *et al.* (2002) Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, Rio de Janeiro. **Ciênc. Saúde Colet.**, v. 7, n. 2, p. 299 – 311.
- MORON, S.E., (2002). Efeito das concentrações de íons Na⁺, Ca²⁺ e Cl⁻ na morfometria branquial e nos parâmetros fisiológicos de *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae). Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, 82p.

- MORON, S.E., OBA, E. T., ANDRADE, C.A. & FERNANDES, M.N. (2003). Chloride cells responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **J. Exp. Zool.**, 278A p. 93-104.
- MOYES, C. D. & WEST, T. G. (1995). Exercise metabolism of fish. In: HOCHACHKA, P. W. & MOMMSEN, T. P. (eds.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and molecular biology of fishes*. Elsevier Science, Amsterdam. v. 4, pp. 367 – 392.
- MUELLER, M.E., SANCHEZ, D.A., BERGMAN, H.L., MCDONALD, D.G., RHEM, R.G., WOOD, C.M., (1991). Nature and time course of acclimatation to aluminum in juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). II. Histology. **Can J. Fish Aquat. Sci.** v. 48, p. 2016 – 2017.
- MURTY, A.S., (1986). **Toxicity of pesticides to fish**. Vol II. CRC Press, Inc. Boca Ranton, Florida, 143p.
- NIMMO, D.R., (1984). Pesticides. In: Rand, G.M.; Petrocelli, S.M. (eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology Methods and Applications*. **McGraw-Hill International Book**, p. 335-373.
- NOLAN, D.T. (2000). Skin Responses of Fish to Stressors. Ph D Thesis. Katholoeke Universiteit Nijmegen, p. 173.
- NORRIS, D.O., FELT, S.B., WOODLING, J.D., DORES, R.M., (1997). Immunocytochemical and histological differences in the interrenal axis of feral Brown trout, *Salmo trutta*, in metal-contaminated waters. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 108, p. 343 – 351.
- PINHEIRO, G.H.D. (2004). Repostas fisiológicas ao estresse em *Prochilodus scrofa* durante a exposição ao cobre e subsequente recuperação em água sem cobre. São Carlos – UFSCar, Dissertação de Mestrado p. 51.
- PERRY, S.F., LAURENT, P., (1993). Environmental effects on fish gill structure and function. In: Rankin, J.C.; Jensen, F.B. (eds), *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London., p. 231 – 264.
- PERRY, S.F., WOOD, C.M., (1985). Control and coordination of gas transfer in fishes. **Can J. Zool.** v. 67, p. 2961 – 2970.

- PICKERING, A., (1981). The concept of biological stress. **In Pickering, A.Ed. Stress and fish** Academic Press, London. p. 1 – 9.
- POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDIZIC, V., (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. **In Müller, R., Lloyd, R. (eds.), Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish.** University Press, Cambridge. p.339 – 352.
- POWELL, M.D., WRIGHT, G.M., BURKA, J.F., (1990). Eosinophilic granule cells in the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: evidence of migration? **J. Fish biol.** v. 37, p. 495 – 497.
- QUABIUS, E.S., NOLAN, D.T., ALINN, C.J., WENDELAAR BONGA, S.E., (2000). Influence of dietary exposure to polychlorinated biphenyl 126 and nutritional state on stress response in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environ. Toxicol. Chem.** v. 19, p. 2892 – 2899.
- QUINATANA, C. F. (2002) Respostas neuroendócrinas al estrés em peces teleósteos. **Ver. Ictiol.** v. 10, n. 1 e 2, p. 57 – 78.
- REID, S., BERNIER, N., PERRY, S. (1998) The adrenergic stress response in fish: control of catecholamines storage and release. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.** v. 120, p. 1 – 27.
- RODRIGUES, F. A. C., WEBER, O. L. S., DORES, E. F. G. C., KLATAU-GUIMARÃES, M.N., TIDON, R., GRISÓLIA, C. K. (2005) Ecogenotoxicologia dos agrotóxicos: avaliação comparativa entre ecossistema agrícola e área de proteção ambiental. **Revista de ecotoxicol. e meio ambiente.** v. 15, p. 73 – 84.
- ROMÃO, S., DONATTI, L., FREITAS, M. O.; TEIXEIRA, J., (2006). Kusma, J. Blood Parameter Analysis and Morphological Alterations as Biomarkers on the Health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 49, n. 3, p. 441-448.
- ROTLANT, J., BALM, P. H. M., RUANE, N. M., PÉREZ-SÁNCHEZ, J., WENDELAAR-BONGA, S. E., TORT, L. (2000) Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and α -melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. **General and Comparative Endocrinology.** v. 119, p. 152 – 163.

- SAKURAGUI, M.M., SANCHES, J.R., FERNANDES, M.N. (2003). Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. **J. Comp. Physiol. B** v. 173, p. 309 – 317.
- SAKURAGUI, M. M. (2000) Respostas respiratórias e adaptações fisiológicas de traíra, *Hoplias malabaricus* (Telostei, Erythrinidae) submetidos à hipóxia durante exposição à água deionizada. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos. 88 p.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., FERNANDEZ, C., ANDREU, E., (1998). Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 41, p. 168 – 175.
- SILVA FILHO, M.V., OLIVEIRA, M.M., SALLES, J.B., CUNHA BASTOS, V.L.F., CASSANO, V.P.F., BASTOS, J.C., (2004). Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. **Toxicol Let.** v. 153, p. 247 – 254.
- SILVA, A.G., MARTINEZ, C.B.R. (2006) Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. **Environm. Toxicol. Pharmacol.** no prelo.
- SILVA, H.C., MEDINA, H.S.G., FANTA, E., BACILA, M., (1993). Sub-lethal effects on the organophosphate Folidol 600 (Methyl paration) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei). **Comp. Biochem. Physiol., Part C** v. 105, 197-201.
- SOLBERG, Y., BELKIN, M., (1997) The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning. **Trends and Pharmacological Sciences.** v. 18, n. 6, p. 183 – 185.
- SUAREZ, R.K., MOMMSEN, T.P. (1987). Gluconeogenesis in teleost fishes. **Can. J. Zool.** v. 65, p. 1869–1882.
- SULTATOS, L. G. Mammalian toxicology of organophosphorous pesticides. **J. Toxicol. Environ Health**, v. 43, p. 271 – 289, 1995.
- TAKASHIMA, F., HIBIYA, T., (1995). An Atlas of Fish Histology. Normal and Patological Features. 2nd ed. Kodansha Ltd, Tokyo, Japan, p. 195.
- TAVARES-DIAS, M., MORAES, F.R., (2004). Hematologia de Peixes Teleósteos. Ribeirão Preto, 140.

- VAL, A. L., HONCZARYK, A. (1995) **Criando peixes na amazônia**. Manaus, AM: INPA, 160p.
- VEIGA, M.L., EGAMI, M.I., RANZANI-PAIVA, M.J.T., RODRIGUES, E.L., (2000). Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salvelinus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). **Rev. Chil. Anat.** v. 18, p. 245 – 250.
- WEBER, J. M. & HAMAN, F. (1996). Pathways for metabolic fuels and oxygen in high performance fish. **Comp. Biochemistry and Physiology.** v.113, pp. 33 – 38.
- WENDELAAR BONGA, S.E., VAN DER MEIJ, C.J., (1989). Degeneration and death, by apoptosis and necrosis the pavement and cells the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*. **Cell Tiss. Res.** v. 255, p. 235 – 243.
- WENDERLAAR BONGA, S.E., (1997). The stress response in fish. **Physiol. Rev.** v. 77, p. 591 – 625.
- YANG, C., ALBRIGHT, L. (1995). Elevation of plasma cortisol and hipertrophic response of Inter.-renal and cromaffin tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the harmful diatom *Chaetocerus concavicornis*. **Journal of Fish Disease**, v. 18, p. 165 – 174.
- ZAVATTI, L. M. S., ABAKERLI, R. B. (1999) Resíduos de agrotóxicos em frutos de tomate. **Pesq. agropec. bras.** v. 34, n. 3, p. 473 – 480.