



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ANDRESSA DAS GRAÇAS SILVA

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DE PEIXES COMO
BIOMARCADORES DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA**

Londrina
2004

ANDRESSA DAS GRAÇAS SILVA

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DE PEIXES COMO
BIOMARCADORES DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Zoologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2004

ANDRESSA DAS GRAÇAS SILVA

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DE PEIXES COMO
BIOMARCADORES DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Marisa Narciso Fernandes

Ana Paula F. R. L. Bracarense

Londrina, 21 de julho de 2004.

SILVA, Andressa das Graças. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática.** 2004. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

RESUMO

Muitos dos ribeirões das grandes metrópoles estão contaminados com efluentes industriais, domésticos e agrícolas. O despejo indiscriminado e a liberação de substâncias consideradas de risco dentro destes ribeirões podem levar a distúrbios no ambiente aquático que podem ser considerados como uma grande fonte de estresse para a comunidade biótica. Os poluentes podem causar lesões nos tecidos e órgãos dos peixes que vivem em ambientes degradados. Assim, as análises histopatológicas são consideradas ferramentas sensíveis para detectar a presença e os efeitos de compostos químicos em órgãos alvo. Neste trabalho, duas espécies de lambaris do gênero *Astyanax* (Characidae, Tetragonopterinae) foram coletadas em pontos diferentes de um ribeirão urbano. A ocorrência de alterações histopatológicas foram avaliadas nas branquias, no fígado e no rim de *A. scabripinnis* coletados em cinco pontos do ribeirão e para *A. altiparanae*, coletados em três pontos do mesmo ribeirão, foram realizada análise histopatológica renal e análise morfométrica das células interrenais. O estudo histopatológico revelou alterações severas nas duas espécies estudadas. *A. scabripinnis* apresentaram nas branquias: elevação epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais das lamelas e do filamento, fusão lamelar e aneurisma; no fígado: depleção de glicogênio, vacuolização nuclear e citoplasmática, hipertrofia nuclear e citoplasmática, hiperemia e degeneração celular e nuclear das células hepáticas; e no rim: vacuolização citoplasmática, associada com degeneração granular e hialina, e necrose nos túbulos proximais e distais, novos néfrons e alterações no corpúsculo renal como a presença de hemácias e a redução do espaço de Bowman. Os lambaris da espécie *A. altiparanae* apresentaram as mesmas alterações no rim que *A. scabripinnis* e a análise morfométrica das células interrenais destes peixes revelou um aumento na área da célula e do núcleo e no diâmetro do núcleo, demonstrando estarem hipertrofiadas quando comparadas com as células interrenais dos peixes de um local referência. Estes resultados mostram a incidência de alterações histopatológicas nos órgãos dos *A. scabripinnis*, assim como no rim de *A. altiparanae*, e sugerem a estimulação crônica do eixo hipotálamo - hipófise - células interrenais dos lambaris que vivem no ribeirão urbano, indicando claramente o comprometimento da saúde destes peixes em decorrência da presença de agentes tóxicos na água. Os parâmetros analisados mostraram-se ferramentas sensíveis, que podem ser empregados como biomarcadores para avaliação da contaminação aquática em programas de monitoramento ambiental.

Palavras-chaves: Histopatologia. Peixe. Brânquias. Fígado. Rim. Contaminação aquática.

SILVA, Andressa das Graças. **Fish histopathological alterations as biomarkers of water contamination.** 2004. 85p. Dissertation (Master's Degree in Biological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2004.

ABSTRACT

Several streams from big cities are contaminated with industrial, domestic and agricultural effluents. The indiscriminated sewage and the release of substances considered risky into these streams may lead to damages in the water environment that may be considered as a great source of stress for the biotic community. The pollutants may cause lesions in the tissues and organs of fish that live in degraded environments. Thus, the histopathological analyses are considered sensitive tools to detect the presence and effects of chemical compounds in organs-aim. In this work, two species of tetra fish of the genus *Astyanax* (*Characidae*, *Tetragonopterinae*) were collected in different points of an urban stream. The occurrence of histopathological alterations were evaluated in the gills, liver and kidney of *A. scabripinnis* collected in five points of the stream and for *A. altiparanae*, collected in three points of the same stream. Renal histopathological analysis and morphometric analysis of the interrenal cells were carried out. The histopathological study showed severe alterations in both species studied. *A. scabripinnis* showed alterations in the gills: epithelial lifting, hyperplasia and hypertrophy of the epithelial cells of the lamella and the filament, lamellar fusion and aneurism; in the liver: glycogen depletion, nuclear and cytoplasmic vacuolization, nuclear and cytoplasmic hypertrophy, hyperemia and cell and nuclear degeneration of liver cells; and in the kidney: cytoplasmic vacuolization associated with granular and hyaline degeneration, and necrosis in the proximal and distal tubules, new nephrons and alterations in the renal corpuscle with the presence of red blood cells and the reduction of Bowman's space. The tetra fish of the species *A. altiparanae* showed the same alterations in the kidney as the *A. scabripinnis*' and the morphometric analysis of the interrenal cells of these fish showed an increase in the cell and the nucleus area as well as in the nucleus diameter, showing to be hypertrophied when compared with the interrenal cells of the fish from a reference location. These results show the incidence of histopathological alterations in the *A. scabripinnis*' organs, as well as in the *A. altiparanae*'s kidney, and suggest a chronic stimulation of the axis hypothalamus – hypophysis – interrenal cells of the tetra fish that live in the urban stream, showing clearly the impairment of the health of these fish due to the presence of toxic agents in the water. The parameters analyzed showed to be sensitive tools that may be used as biomarkers for the evaluation of the water contamination in environmental monitoring programs.

Keywords: Histopathology. Fish. Gills. Liver. Kidney. Water contamination.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	6
1 POLUIÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO	6
1.1 RIBEIRÃO CAMBÉ - CIDADE DE LONDRINA.....	6
2 PEIXES COMO BIOINDICADORES DA QUALIDADE DA ÁGUA	9
3 FORMAS DE AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS XENOBIÓTICOS	10
4 RESPOSTA DE ESTRESSE EM TELEÓSTEOS E AS CÉLULAS INTERRENAIS	12
5 BIOMARCADORES DE ESTRESSE QUÍMICO	14
5.1 Biomarcadores histopatológicos.....	14
6 ÓRGÃOS ALVO PARA OS POLUENTES	16
6.1 BRANQUIAS	16
6.2 FÍGADO	18
6.3 RIM.....	19
7 OBJETIVOS DESTE TRABALHO	22
ARTIGOS	23
Artigo 1	24
Artigo 2	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

APRESENTAÇÃO

1 POLUIÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO

Atualmente, com tanta interferência do homem na natureza, a poluição e a contaminação do meio ambiente vêm aumentando devido à crescente carga de efluentes lançados no ar, na água e nos solos. O ecossistema aquático é considerado o mais suscetível à poluição e contaminação (BERTOLETTI, 1990). A poluição aquática está comumente associada com a descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas (MANSON, 1996) e pode ocorrer de forma intencional ou acidental, a partir de fontes naturais ou em decorrência da atividade humana (JOBILING, 1995). Existem centenas, talvez milhares de poluentes que afetam o ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes, a compreensão detalhada dos efeitos destes diferentes tipos de efluentes nos corpos d'água receptores é essencial para o controle da poluição (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

1.1 RIBEIRÃO CAMBÉ - CIDADE DE LONDRINA

A cidade de Londrina, localizada no norte do Estado do Paraná, possui 81 fundos de vale que formam os corredores naturais para as águas de 73 córregos e 8 ribeirões que se distribuem em 7 microbacias hidrográficas. A do ribeirão Cambé é considerada a mais importante de todas e a ação do homem utilizando como suporte seus recursos naturais, resultou em adaptações como os quatro lagos (Igapó I, II, III e IV) e a represa do Parque Arthur Thomas. Atualmente, estes lagos desempenham importante papel integrador das atividades de lazer, esporte e recreação para população local e regional (FOLHA DE LONDRINA, 1999).

Em Londrina a expansão urbano-industrial se deu, exatamente, na cabeceira do ribeirão Cambé, cujo curso d'água corta parte da cidade. A microbacia do ribeirão Cambé apresenta uma área aproximada de 75,8 km², nasce a noroeste

do município de Londrina e divide os municípios de Cambé e Londrina. Recebe água de aproximadamente vinte e nove tributários até desaguar no ribeirão Três Bocas, um afluente do rio Tibagi (SANTOS, 1984; GOMINHO, 2000).

O ribeirão Cambé vem sofrendo constante degradação em consequência das atividades humanas, que exercem influências negativas em suas águas. A poluição industrial, agrícola e doméstica, e o tratamento de esgoto deficiente, permitem que grandes quantidades de substâncias químicas sejam lançadas neste ecossistema. (GOMINHO, 2000; WINKALER *et al.*, 2001). Alterações no traçado original da bacia do Cambé, bem como construções de barragens, canalização, desmatamento e ausência de mata ciliar promoveram mudanças na hidrologia da bacia e alterações no hábitat (GOMINHO, 2000).

Sua nascente está dentro de algumas propriedades rurais com plantações próximas às margens, o que pode permitir o influxo de agrotóxicos e outros efluentes agrícolas. Além disto, próximo a nascente foi instalado um parque industrial de onde provêm os mais diversos efluentes, lançados muitas vezes sem tratamento adequado. Ao longo do ribeirão localizam-se bairros dotados de infraestrutura precária e existem também residências dentro dos vales, sendo que algumas liberam esgoto diretamente no ribeirão enquanto outras utilizam fossas muito próximas e em nível topográfico pouco superior ao do ribeirão, o que favorece infiltrações e a contaminação das águas (SANTOS, 1984; GOMINHO, 2000).

Os efluentes sólidos e líquidos lançados no ribeirão Cambé e em seus afluentes são, em sua maior parte, matéria orgânica, metais de origem industrial e esgoto doméstico. As indústrias despejam seus dejetos quase "*in natura*", pois na grande maioria o sistema de tratamento de esgoto é deficiente ou ainda inexistente (SANTOS, 1984; YABE; OLIVEIRA, 1998).

Praticamente não há mata ciliar ao longo dos ribeirões da bacia, o que acelera os processos erosivos nas encostas dos vales. Além da poluição, o ribeirão Cambé também vem sofrendo processos erosivos associados à implantação de equipamentos urbanos, como arruamentos, galerias de esgoto, área de lazer e outros, bem como à terraplanagem para instalação de indústrias e condomínios. Muitos destes problemas erosivos são originados pela falta de planejamento urbano (SOUSA, 1990).

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos por discentes e docentes da Universidade Estadual de Londrina, ao longo deste ribeirão, na tentativa de

avaliar o impacto que poluição vem causando neste ecossistema (SANTOS, 1984; SOUSA, 1990; YABE; OLIVEIRA, 1998; GOMINHO, 2000; SILVA, 2001; WINKALER, 2001; ALMEIDA, 2001; WINKALER *et al.*, 2001).

2 PEIXES COMO BIOINDICADORES DA QUALIDADE DA ÁGUA

Quando peixes e outros organismos são expostos a ambientes muito degradados, os efeitos dos poluentes podem ser dramáticos. No caso de poluição severa pode haver mortalidade quase instantânea. Longos períodos de exposição a ambientes menos degradados podem resultar na morte de alguns indivíduos dentro de uma população, ou ainda em prejuízos bastante visíveis. Por outro lado, a curta exposição a estressores ambientais pode resultar em alterações que, mesmo não sendo letais, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (RAND; PETROCELLI, 1985; JOBLING, 1995).

É muito comum a utilização de invertebrados no monitoramento ambiental por serem componentes majoritários dos ecossistemas e apresentarem abundância populacional (MARTINEZ *et al.*, 1992; PÉQUEUX, 1995). Entretanto, é crescente o número de trabalhos onde peixes são empregados como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (OVERSTREET, 1988; TEH *et al.*, 1997; SCHWAIGER *et al.*, 1997; GUNDERSEN *et al.*, 2000; PACHECO; SANTOS, 2002; THOPHON *et al.*, 2003; BARCAROLLI; MARTINEZ, 2004). Os peixes ocupam os mais diversos ambientes aquáticos (VAZZOLER, 1996; LOWE-MC CONNELL, 1999) e são de grande importância comercial, já que fazem parte da dieta em muitos países e, em vários outros, são a principal fonte de proteínas da população (Silva Filho *et al.*, 2000). Vários trabalhos fazem uso destes animais para avaliar o efeito do estresse causado por variações no ambiente aquático (OVERSTREET, 1988; TEH *et al.*, 1997; GUNDERSEN *et al.*, 2000; SCHWAIGER, 2001), entretanto, ainda são poucos trabalhos com espécies neotropicais (AMEIDA, 2001; SILVA, 2001; WINKALER, 2001; WINKALER *et al.*, 2001; MARTINEZ; CÓLUS, 2002; BARCAROLLI; MARTINEZ, 2004).

3 FORMAS DE AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS XENOBIÓTICOS

Os xenobióticos são definidos como substâncias químicas estranhas ao sistema biológico. Muitos dos xenobióticos que são despejados dentro dos corpos de água podem ser tóxicos para os organismos aquáticos. Se a exposição a um xenobiótico será ou não letal vai depender da concentração da substância na água, das características da água em relação ao pH, dureza, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade, e do tempo de duração da exposição do peixe ao agente tóxico (JOBILING, 1995).

Para se conhecer os efeitos dos xenobióticos para a biota aquática, nas últimas décadas têm sido utilizados testes de toxicidades com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e/ou de campo (MARTINEZ; CÓLUS, 2002). Os testes em laboratório estão envolvidos com a investigação dos efeitos do tempo de exposição e da concentração dos xenobióticos, por exemplo, diferentes concentrações de uma substância química e o tempo de exposição do grupo de peixes a esta substância (JOBILING, 1995).

As coletas em campo também são componentes importantes para a avaliação e compreensão dos efeitos biológicos e/ou ecológicos de agentes químicos sob condições naturais (WINKALER *et al.*, 2001). Sob condições de campo, os organismos são expostos a uma multiplicidade de estressores químicos e físicos, que ocorrem naturalmente com flutuações sazonais, que são potencialmente estressores para o organismo (MAYER *et al.*, 1992). As principais vantagens dos estudos de campo referem-se a incorporação de exposição realistas, que vão determinar diretamente os efeitos observados e a utilização de ambientes naturais, que evitam a necessidade de extrapolação dos resultados para o ecossistema (GRANEY *et al.*, 1995).

Entretanto, pesquisas de campo apresentam alguns problemas. Nas regiões temperadas estes problemas são principalmente devido ao fato de que as condições ambientais variam marcadamente com as diferentes estações, como as condições de luz, onde se têm dias mais longos no verão e mais curtos no inverno, além das condições de temperatura que pode variar de 0 a 20 °C. Nas regiões tropicais as variações nas condições de luz e temperatura são mais brandas, entretanto se tem uma variação na quantidade de chuvas, alterando a velocidade da

correnteza nos ambientes lóticos e também interferindo no carreamento de poluentes para os sistemas aquáticos. Estes fatores em conjunto, influenciam o estado fisiológico dos peixes e contribuem para o que é freqüentemente chamado de interferências externas ou "background noise". Fatores biológicos, como variação no estado nutricional, também aumentam as dificuldades de interpretação e diferenciação dos dados fisiológicos de peixes coletados em locais poluídos e não poluídos. A diferença de tempo entre os peixes coletados no começo ou no fim da coleta também pode contribuir para a variabilidade dos dados e então, um maior número de peixes é necessário para fornecer material suficiente para as análises estatísticas (JOHNSEN *et al.* 1998).

De maneira geral, poucas pesquisas têm sido realizadas sobre o impacto dos poluentes nos ecossistemas tropicais. No Brasil ainda são poucos os estudos de campo que avaliam as respostas biológicas de espécies nativas aos eventuais contaminantes presentes no ambiente (WINKALER *et al.*, 2001). Assim sendo, a ecotoxicologia tropical necessita de mais estudos sobre os efeitos de contaminantes em organismos aquáticos nativos da região (LACHER Jr.; GOLDSTEIN, 1997; AMEIDA, 2001; SILVA, 2001; WINKALER, 2001; WINKALER *et al.*, 2001; MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

4 RESPOSTA DE ESTRESSE EM TELEÓSTEOS E AS CÉLULAS INTERRENAIS

Uma das principais características de um animal saudável é a sua habilidade de reagir na presença de estressor, pois as respostas gerais aos estímulos estressores são necessárias para o animal sobreviver e enfrentar as variáveis ambientais (LAPPIVAARA; OIKARI, 1999).

O estresse é definido como uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo, chamado de homeostase, é ameaçado ou perturbado como resultado das ações de estímulos intrínsecos ou extrínsecos, comumente definidos como estressores (WENDELAAR BONGA, 1997). Os estressores podem agir produzindo efeitos que ameaçam ou perturbam o equilíbrio homeostático do organismo, desencadeando um conjunto de respostas fisiológicas. Estas respostas podem ser específicas para um determinado tipo ou um grupo de estressores semelhantes e envolvem tipicamente todos níveis de organização do animal, do molecular ao orgânico (JOBILING, 1995; WENDELAAR BONGA, 1997).

Para peixes são considerados estímulos estressores as alterações rápidas e extremas do ambiente físico (temperatura, turbidez e salinidade); as interações intra ou interespecíficas (predação, parasitismo, intensa competição por espaço, alimento ou parceiro sexual); a interferência humana, que inclui a prática de aquicultura (coletas em redes, manipulação, transporte e aglomeração) e a poluição da água (presença de contaminantes como metais e compostos orgânicos tóxicos). As substâncias químicas podem ter efeitos tóxicos em nível tecidual e celular e acima de um certo limiar, promover uma resposta integrada do estresse (WENDELAAR BONGA, 1997).

A resposta integrada ao estresse se distingue entre resposta primária, secundária e terciária. As respostas primárias são ativações dos centros cerebrais, resultando na liberação das catecolaminas e corticosteróides, enquanto que as respostas secundárias são resultantes das ações destes hormônios, que levam ao aumento do débito cardíaco, tomada de oxigênio, mobilização de substratos energéticos e distúrbios no balanço hidromineral. As respostas terciárias estendem-se para o nível do organismo e da população e incluem inibição do crescimento, da reprodução e das respostas imunes, que reduzem a capacidade do

animal para tolerar estressores adicionais (DONALDSON, 1981; WENDELAAR BONGA, 1997).

Em peixes teleósteos a resposta ao estresse envolve o tecido endócrino e mostra muita similaridade com a resposta dos vertebrados terrestres (QUABIUS *et al.*, 2000). Estas respostas são mediadas pelo eixo hipotálamo - hipófise - células interrenais (HPI) e pelo eixo hipotálamo - sistema nervoso autônomo - células cromafins (HSC) (DONALDSON, 1981; WENDELAAR BONGA, 1997). A exposição crônica aos agentes tóxicos ou águas de baixa qualidade pode promover distúrbios nas funções fisiológicas relacionadas às respostas de estresse (LAPPIVAARA; OIKARI, 1999). O sistema endócrino regula funções fisiológicas hormônio - dependentes necessárias para sobrevivência do organismo e da espécie. Este sistema é um alvo em potencial para os xenobióticos e sua vulnerabilidade deve-se em parte à precisão dos mecanismos através dos quais o sistema endócrino opera (HONTELA, 1998). Xenobióticos podem ter efeitos adversos diretos sobre as glândulas e tecidos endócrinos, ou seus efeitos podem ser indiretos através da alteração da homeostase e atividade dos órgãos não endócrinos (DONALDSON, 1981).

As células interrenais, localizadas no rim anterior, liberam os corticosteróides, sendo o mais importante o cortisol, também chamado de hormônio do estresse. O aumento da concentração de cortisol no plasma, em resposta a algum estímulo estressor, indica aumento da atividade das células interrenais, que pode ser avaliado através de medidas da área da célula e do núcleo e do diâmetro do núcleo das células interrenais (DONALDSON, 1981; NORRIS *et al.*, 1997; QUABIUS *et al.*, 2000; BARTON, 2000). O estresse crônico pode causar hiperplasia e hipertrofia das células interrenais de teleósteos (HONTELA *et al.*, 1996; NORRIS *et al.*, 1997; HONTELA *et al.*, 1997; QUABIUS *et al.*, 2000; SLOMAN *et al.*, 2001).

5 BIOMARCADORES DE ESTRESSE QUÍMICO

O estresse químico pode alterar a capacidade do peixe de realizar várias funções fisiológicas que, uma vez caracterizadas, podem ser utilizadas como biomarcadores de poluição aquática (JOBILING, 1995). Biomarcadores podem ser definidos como alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente e podem ser usados para identificar sinais iniciais de danos aos peixes e sugerir relações de causa e efeito entre a exposição aos contaminantes e os efeitos observados no organismo, e documentar os efeitos integrados do estresse químico nos peixes (WALKER *et al.*, 1996).

Em estudos de toxicidade, biomarcadores em nível sub-orgânico (bioquímico, fisiológico e histológico) têm sido utilizados e considerados mais viáveis para avaliar as respostas aos estressores. Estes biomarcadores podem permitir uma avaliação mais rápida da saúde dos organismos e podem ser indicadores da exposição ou dos efeitos dos poluentes (MAYER *et al.*, 1992). Atualmente biomarcadores histopatológicos vêm sendo utilizados para documentar e quantificar tanto a exposição quanto o efeito dos poluentes (WINKALER *et al.*, 2001; PACHECO; SANTOS, 2002; VEIGA *et al.*, 2002; MELETTI *et al.*, 2003).

5.1 BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS

Alterações histopatológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON *et al.*, 1992). As alterações histopatológicas em tecidos de peixes são biomarcadores do efeito da exposição aos estressores do meio ambiente. Esta categoria de biomarcadores permite um exame específico dos órgãos e das células alvo, e como eles são afetados sob condições *in vivo*. Além disso, em avaliação de campo, a histopatologia é um método eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (HINTON *et al.*, 1992).

Características histopatológicas são específicas de cada organismo e podem expressar as condições de vida do animal e representar o impacto causado

no organismo, pelo poluente. As mudanças histológicas são consideradas mais sensíveis que os parâmetros relacionados apenas com o crescimento ou reprodução do indivíduo (TEH *et al.*, 1997). Biomarcadores histopatológicos vem sendo utilizados em estudos de campo para avaliar o efeito tóxico dos poluentes no ambiente aquático, e têm a capacidade de diferenciar lesões nos órgãos, induzidas por doenças e outros fatores do meio ambiente, daquelas provocadas pela exposição aos poluentes (SCHWAIGER *et al.*, 1997). Assim, as lesões encontradas podem ser utilizadas para monitorar os efeitos dos poluentes (OVERSTREET, 1988; SCHWAIGER, 2001).

6 ÓRGÃOS ALVO PARA OS POLUENTES

Uma vez no ambiente aquático, os poluentes podem ser absorvidos pelos teleósteos por quatro vias, que são: alimentação, branquias, ingestão de água e através da pele, sendo que alimentação e via branquial são as principais. Uma vez incorporados, os poluentes podem ser acumulados nas branquias, no fígado, no rim, no intestino e no músculo. Uma boa parte desses poluentes é transferida para o fígado e rim, para serem biotransformados por meio de enzimas, para se tornar hidrossolúvel e então ser excretada pela pele, através do muco, pelo intestino, através das fezes, pelo rim, através da urina, ou pelas branquias (HEATH, 1997).

Os peixes estão em contato permanente com o ambiente aquático, por meio das branquias, e no caso dos peixes marinhos, também por meio do intestino. Todos ou quase todos os estressores afetam a estrutura branquial e também, direta ou indiretamente, o balanço hidromineral que é uma das principais razões para a vulnerabilidade destes animais em águas poluídas (WENDELAAR BONGA, 1997). Além das branquias, outros órgãos como o fígado e o rim também são indiretamente afetados pelos poluentes, por estarem relacionados com o metabolismo e excreção dos xenobióticos, respectivamente.

6.1 BRANQUIAS

As branquias atuam como órgão alvo dos peixes para os poluentes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma área superficial muito grande, representada pelas lamelas (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994). As branquias exercem funções vitais nos teleósteos, tais como respiração, osmorregulação e excreção e ainda constituem o sítio de tomada e depuração de contaminantes e o local onde a detoxificação e o metabolismo destes agentes tóxicos podem ocorrer. Conseqüentemente, alterações morfológicas podem ocorrer em razão da introdução de poluentes na água e, portanto, estas alterações podem ser utilizadas como parâmetros para o monitoramento ambiental (HEATH, 1987; MEYERS; HENDRICKS, 1985; POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994;

SCHWAIGER *et al.*, 1997; SCHWAIGER, 2001; PACHECO; SANTOS, 2002; VEIGA *et al.*, 2002; MELETTI *et al.*, 2003).

As brânquias dos peixes teleósteos são constituídas por quadro arcos branquiais em cada lado da faringe. De cada arco branquial estendem-se duas fileiras de filamentos branquiais ou lamelas primárias, e acima e abaixo destes filamentos, a intervalos regulares, elevam-se as lamelas secundárias que são sítios de trocas gasosas. Cada lamela secundária é constituída por células pavimentosas apoiadas na membrana basal que revestem as células pilares. As células pilares possuem prolongamentos ou flanges, que em contato com os prolongamentos das células pilares adjacentes formam espaços por onde circula o sangue (MALLATT, 1985; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

Nas brânquias o sangue flui na lamela em direção oposta àquela da água, através de um plexo formado pelas células pilares. Este fluxo contracorrente ajuda na utilização eficiente do oxigênio, pois o sangue que abandona as lamelas está em íntimo contato com a água que apresenta máxima tensão de oxigênio e mínima tensão de dióxido de carbono (SCHMIDT-NIELSEN, 1996; HEATH, 1987). Entretanto, a grande superfície epitelial que está em contato com o meio externo e a alta taxa de perfusão também facilitam a entrada dos poluentes (WENDELAAR BONGA, 1997; MALLATT, 1985; HEATH, 1987). Sendo assim, o epitélio branquial de peixes é um tecido extremamente sensível, altamente dinâmico e metabolicamente ativo (RANKIN *et al.*, 1982; HINTON *et al.*, 1992; POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994;). Por estar em contato direto com o meio externo e representar a barreira entre meio externo e meio interno, este tecido é altamente susceptível às alterações ambientais (HINTON; LAURÉN, 1990; POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Os efeitos dos poluentes sobre a estrutura branquial vêm sendo muito estudados em peixes, coletados em ambientes poluído ou expostos a testes em laboratório, e as alterações histopatológicas encontradas vêm sendo utilizadas como um sensível indicador da contaminação aquática (KARAN *et al.*, 1998; SCHWAIGER, *et al.*, 1997; COUTINHO; GOKHALE, 2000; OJHA, 1999; WINKALER *et al.*, 2001; PACHECO; SANTOS, 2002; MAZON *et al.*, 2002; ROSETY-RODRÍGUEZ *et al.*, 2002; FANTA *et al.*, 2003).

Na presença de poluentes, as brânquias podem exibir modificações que são consideradas respostas de defesa, visto que algumas levam ao aumento da

distância entre o meio externo e o meio interno, diminuindo assim a área da superfície em contato com o poluente. Porém, a dificuldade para a difusão do poluente para o meio interno ao mesmo tempo provoca uma redução na difusão dos gases respiratórios, podendo provocar uma hipóxia no peixe (MALLAT, 1985; FERNANDES; MAZON, 2003).

6.2 FÍGADO

O fígado é um órgão chave quando se considera a ação dos poluentes químicos sobre o peixe. É o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos e provavelmente também para excreção de metais. Assim, muitos metais e outros xenobióticos se acumulam no fígado, de modo que suas células ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes no meio ambiente ou em outros órgãos do peixe (HEATH, 1987).

As células hepáticas têm várias funções vitais além da secreção da bile e metabolismo de xenobióticos. Elas apresentam um importante papel no metabolismo das proteínas, lipídios e carboidratos e, além disso, estão envolvidas na hematopoiese e na produção de anticorpos durante o período larval dos peixes. Sobretudo, elas também servem como local de estocagem para alguns nutrientes (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; PARIS-PALACIOS *et al.*, 2000).

O fígado da maioria dos peixes teleósteos é composto por dois lobos, o lobo direito que está ao lado da vesícula biliar, e o lobo esquerdo próximo ao baço. As células que constituem o fígado são os hepatócitos, as células epiteliais dos ductos biliares, os macrófagos, as células sangüíneas e as células endoteliais (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

As principais células do fígado, os hepatócitos, são células poliédricas com um ou dois núcleos grandes, esféricos e centralmente localizados, com nucléolo evidente, e o citoplasma com granulações e aspecto vacuolizado. O citoplasma das células hepáticas apresenta aspecto variável, dependendo do estado nutricional do indivíduo. Quando este se encontra bem alimentado, os hepatócitos armazenam quantidades significativas de glicogênio e processam grandes quantidades de lipídios (GROMAN, 1982; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). O

metabolismo do glicogênio está vinculado às necessidades de carboidratos de todo o organismo.

Devido a sua função no metabolismo de xenobióticos e sua sensibilidade a poluentes do ambiente, o fígado tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes por agentes químicos orgânicos e inorgânicos (HINTON *et al.*, 1992). Assim, os efeitos hepatotóxicos dos diversos agentes químicos podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação aquática (HINTON *et al.*, 1992; GUNDERSEN *et al.*, 2000). Na presença de poluentes o fígado pode desenvolver alterações histológicas nos hepatócitos que podem ser usadas para o monitoramento de efeitos de contaminantes (HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON *et al.*, 1992; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; ANDERSON; ZEEMAN, 1995; TEH *et al.*, 1997; SCHWAIGER *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 1998; LEADLEY, *et al.*, 1998; JOHNSEN *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 1998; CABALLERO *et al.*, 1999; GUNDERSEN *et al.*, 2000; AMORIM *et al.*, 2000; PARIS-PALÁCIOS *et al.*, 2000; SCHWAIGER, 2001; PACHECO; SANTOS, 2002; THOPHON *et al.*, 2003; FANTA *et al.*, 2003). Assim, alguns parâmetros hepáticos, tais como alterações histopatológicas e depleção de glicogênio, têm sido utilizados em programas de biomonitoramento (SCHWAIGER, *et al.*, 1997; JOHNSEN *et al.*, 1998; PACHECO; SANTOS, 2002; FANTA *et al.*, 2003).

6.3 RIM

Em peixes dulcícolas a principal função do rim é a excreção de uma grande quantidade de urina diluída. Assim, a urina dos peixes de água doce é abundante e com baixa concentração de eletrólitos (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Por receber grande fluxo sangüíneo o rim pode ser considerado, tal como as brânquias, órgão alvo para os poluentes (HINTON *et al.*, 1992; EVANS, 1993).

O rim dos peixes teleósteos localiza-se dorsalmente, junto da coluna vertebral, e é dividido em duas porções: anterior ou rim cefálico e a porção posterior. A porção anterior do rim é homóloga a adrenal de mamíferos e apresenta dois tipos especiais de células, as células interrenais e as células cromafins. A porção

posterior do rim dos teleósteos, em associação com as brânquias e intestino, realiza a excreção e a manutenção da homeostase dos fluídos corporais (EVANS, 1993).

A estrutura morfológica do rim dos teleósteos é em geral, caracterizada por apresentar néfrons com corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de Bowman) e túbulos renais. O túbulo renal é dividido em duas porções uma proximal e uma distal. O rim, quando observado ao microscópio de luz, apresenta-se em geral com abundância de túbulos e uma certa quantidade de glomérulos. No segmento proximal, o epitélio tubular é composto por células cubóides com microvilosidades na membrana apical, que é reconhecida, neste caso, como borda em escova. No segmento distal, as células epiteliais não são providas de microvilos e não apresentam borda em escova. Os glomérulos são desenvolvidos e ricamente vascularizados, juntamente com túbulos proximal e distal, túbulos e ductos coletores (GROMAN, 1982; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; JOBLING, 1995; EVANS, 1993).

Os rins constituem a principal rota de excreção para os metabólitos de vários xenobióticos aos quais o peixe tenha sido eventualmente exposto (HINTON *et al.*, 1992). O rim elimina produtos químicos durante o curso de formação da urina, alguns através da filtração glomerular, outros por reabsorção ou ainda pelos processos de secreção tubular (JOBLING, 1995; EVANS, 1993). Muitos xenobióticos presentes no sangue seriam pequenos o suficiente para ser removidos pela filtração glomerular, no entanto estas substâncias químicas podem ficar ligadas às proteínas plasmáticas, reduzindo assim o processo de eliminação por este caminho, pois as proteínas plasmáticas são retidas no glomérulo. Assim, a excreção pela urina de muitos compostos químicos e metais é impedida pela afinidade as proteínas. Além disso, substâncias químicas apolares no filtrado glomerular podem ser reabsorvidas por difusão passiva através da membrana tubular (SPACIE; HAMELINK, 1995).

Cada estrutura do rim dos teleósteos realiza uma função específica na produção de urina, regulação osmótica e hormonal no animal. Nos teleósteos dulcícolas, os glomérulos, responsáveis pela ultrafiltração do sangue, estão mais concentrados na porção posterior do rim, onde ocorre extensa reposição de íons durante o fluxo do filtrado ao longo dos túbulos renais, produzindo fluido filtrado que dará origem à urina (JOBLING, 1995; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; EVANS, 1993). A elevada taxa de filtração, aliada à reabsorção de solutos orgânicos no túbulo proximal e a reabsorção de cloreto de sódio no túbulo distal e ducto coletor, gera

uma urina com aproximadamente 10% da concentração do plasma (EVANS, 1993; JOBLING, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

Lesões no tecido renal podem ser indicações de toxinas específicas e assim podem ser utilizados como indicadores para o monitoramento de efeitos de contaminantes (OVERSTREET, 1988; HINTON; LAURÉN, 1990; SCHWAIGER *et al.*, 1997). Entretanto, se comparado com as brânquias e o fígado, as alterações histopatológicas renais em peixes vêm sendo utilizadas ainda de forma muito tímida como biomarcadores histológicos da contaminação aquática (HINTON *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1996; SCHWAIGER, *et al.*, 1997; SILVA, 2001; PACHECO; SANTOS, 2002).

7 OBJETIVOS DESTE TRABALHO

Considerando-se a importância dos estudos de campo para o monitoramento ambiental e a necessidade de se conhecer os efeitos da exposição crônica aos poluentes em espécies de peixes neotropicais, o presente trabalho propôs a avaliação da ocorrência, do tipo e da intensidade das eventuais alterações histopatológicas branquiais, hepáticas e renais em uma espécie de lambari (*Astyanax scabripinnis*) e as eventuais alterações no rim anterior e posterior do lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). Para tanto, os animais foram coletados em quatro pontos ao longo do alto do ribeirão Cambé e em dois lagos formados por este mesmo ribeirão, lagos Igapó I e IV. Estes locais estão localizados no perímetro urbano da cidade de Londrina (PR) e têm sofrido muita influência antrópica com o comprometimento da qualidade da água.

As duas espécies de lambaris foram escolhidas para este trabalho por se tratarem de espécies neotropicais, representativas do ribeirão Cambé. Além disto, o fato de *A. altiparanae* e *A. scabripinnis* ocorrerem em diversos tipos de ambiente permite supor que as espécies tenham grande plasticidade ecofisiológica e de utilização de habitats, e ainda sejam tolerantes a um amplo espectro de variação de diversos parâmetros físicos e químicos da água (BERTACO *et al.*, 1998), sendo, portanto adequadas para o monitoramento ambiental.

ARTIGOS

ARTIGO 1

**Alterações histopatológicas nas brânquias, fígado e rim de
Astyanax scabripinnis de um ribeirão urbano**

Andressa das Graças Silva e Claudia B. R. Martinez

Alterações histopatológicas nas brânquias, fígado e rim de *Astyanax scabripinnis* de um ribeirão urbano

Andressa das Graças Silva¹ & Claudia B. R. Martinez
Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas e ¹Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. C.P. 6001. CEP: 86051-990. E-mail:andregracas@hotmail.com

Resumo: Neste trabalho foram avaliadas as alterações histopatológicas nas brânquias, no fígado e no rim de lambaris (*Astyanax scabripinnis* Characidae), coletados em cinco pontos do ribeirão Cambé. Os animais provenientes dos cinco pontos apresentaram alterações histopatológicas severas nos três órgãos analisados. Estas incluem nas brânquias: elevação epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais das lamelas e pavimentosas do filamento, fusão lamelar e aneurisma; no fígado: depleção de glicogênio nos hepatócitos dos lambaris dos pontos A, B e D, vacuolização nuclear e citoplasmática, hipertrofia nuclear e citoplasmática, hiperemia e degeneração celular e nuclear nas células hepáticas; e no rim: vacuolização citoplasmática, associada com degeneração granular e hialina e necrose nos túbulos proximais e distais, alterações no corpúsculo renal tais como a presença de hemácia e redução do espaço de Bowman. A alta incidência de alterações histopatológicas nos órgãos dos lambaris coletados no ribeirão Cambé indica claramente o comprometimento da saúde destes peixes e da qualidade da água destes locais e mostra que os parâmetros analisados podem ser empregados como biomarcadores da contaminação ambiental.

Palavras-chave: histopatologia, rim, brânquias, fígado, peixe, contaminação aquática.

INTRODUÇÃO

Muitos dos ribeirões das grandes metrópoles estão contaminados com efluentes industriais, domésticos e agrícolas. As águas destes ribeirões urbanos normalmente contêm uma variedade de poluentes orgânicos e inorgânicos, incluindo solventes, óleos, detergentes, corantes, metais pesados, pesticidas, plásticos e sólidos em suspensão. O despejo indiscriminado e a liberação de substâncias consideradas de risco dentro dos ribeirões podem levar a distúrbios no ambiente aquático que podem ser considerados como uma grande fonte de estresse para a comunidade biótica (Donaldson, 1981).

O presente estudo enfatiza o uso da histopatologia para avaliar os efeitos da poluição química e outros estressores sobre as condições gerais da saúde de peixes e o uso de pequenos peixes incluídos inteiros para estudos histopatológicos (Pacheco & Santos, 2002). Alterações histopatológicas em peixes têm sido largamente utilizadas como indicadores da poluição química em ambientes marinhos e dulcícolas (Schwaiger *et al.*, 1997; Teh *et al.*, 1997). Biomarcadores histopatológicos têm sido utilizados para descrever a condição da saúde dos peixes de locais poluídos em relação aqueles de locais não poluídos (Overstreet, 1988; Teh *et al.*, 1997; Schwaiger, 2001, Meletti *et al.*, 2003).

As brânquias, o fígado e o rim são órgãos vitais para os peixes, por estarem relacionados com respiração e osmorregulação; metabolismo dos xenobióticos; excreção e manutenção da homeostase dos fluidos corporais, respectivamente. Portanto, alterações nestes órgãos comprometem o funcionamento normal do organismo e podem ser utilizadas como parâmetros para o monitoramento ambiental (Meyer & Hendricks, 1985; Schwaiger, 2001; Gernhofer *et al.*, 2001).

O objetivo deste estudo foi detectar as alterações histopatológicas em órgãos alvo (brânquias, fígado e rim) de uma espécie de lambari (*Astyanax scabripinnis*) coletados durante um ano em diferentes pontos de um ribeirão urbano, que têm sofrido influência antrópica em diferentes níveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos animais

No período de novembro de 2001 a setembro de 2002, lambaris da espécie *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Characiforme Characidae) foram coletados em 5 pontos do ribeirão Cambé (nascente, pontos A, B, C, D), localizados no perímetro urbano de Londrina, norte do Estado do Paraná (Fig.1). A nascente está localizada dentro de propriedades rurais e está sujeita a entrada de agrotóxicos e outros efluentes agrícolas; o ponto A, recebe esgoto doméstico; o ponto B, recebe

efluentes de uma indústria de café solúvel; o ponto C, recebe efluentes de uma cooperativa agroindustrial, além de efluentes domésticos; o ponto D, está sujeito à descarga de esgoto doméstico, industrial além de agrotóxicos. Exemplares adultos de lambaris (massa: $5,3 \pm 2,07$ g; comprimento total: $6,75 \pm 0,91$ cm; $n = 92$) foram coletados em todos os pontos utilizando-se equipamentos de pesca artesanal (tarrafas, puçás, redes de espera e peneiras).

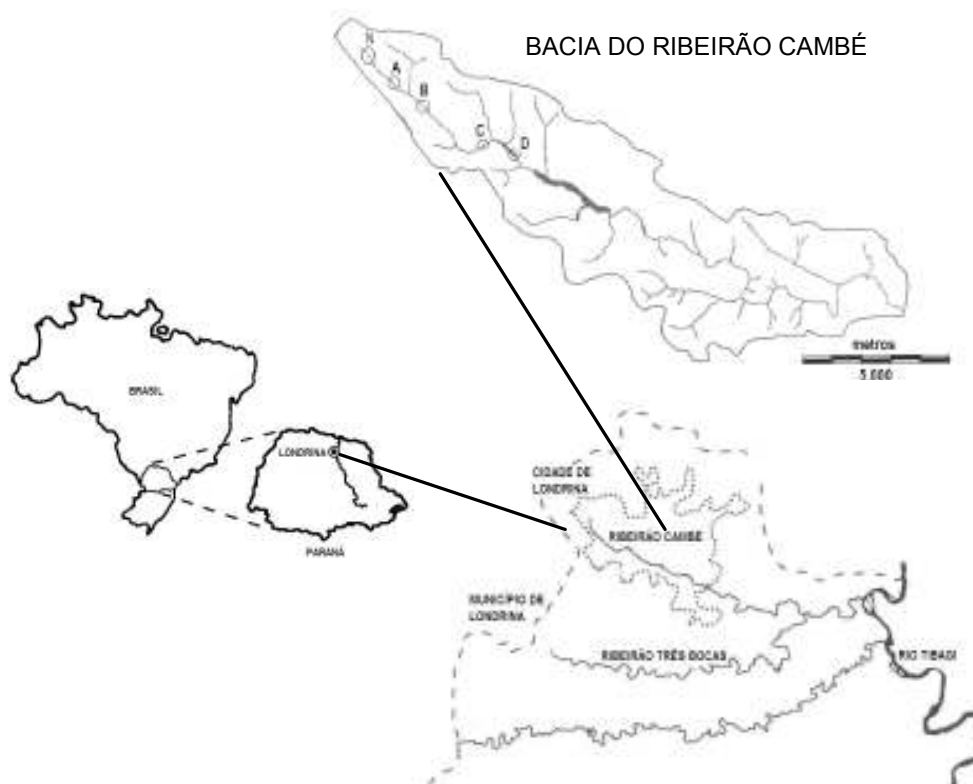


Fig. 1. Mapa mostrando a região do município de Londrina, Estado do Paraná, onde foram realizadas as coletas no alto ribeirão Cambé (N é a nascente e A, B, C e D são os outros pontos de coleta).

Processamento histológico

Dos peixes capturados, aqueles que apresentaram massa corpórea de até 5 g e comprimento total de até 4,5 cm foram incluídos inteiros. Neste caso, o animal foi fixado em solução de Bouin por 20 h, seccionado longitudinalmente em duas metades para a retirada da bexiga natatória e colocado novamente no fixador por mais 4 horas. Após fixação o material foi descalcificado em solução de EDTA 7% submetida a uma corrente elétrica de 80 mA por 48 h. Os peixes maiores tiveram as brânquias, o fígado e o rim retirados, fixados em solução de Bouin por 8 h e incluídos em parafina, assim como os animais inteiros para microscopia de luz comum. Os cortes de 5 μ m de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para descrição morfológica. Alguns cortes do animal inteiro e do fígado foram submetidos à reação de PAS (Periodic Acid Schiff) e contra corados por hematoxilina, segundo Melo (1980).

As alterações histopatológicas foram avaliadas semiquantitativamente de duas formas: a) Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger *et al.* (1997). Para tanto, atribuiu-se um valor numérico para cada animal conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração histopatológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão); b) Cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), com base na severidade de cada lesão. Para tanto, as alterações foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções do órgão: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis, adaptado de Poleksic & Mitrovic – Tutundzic (1994). Um valor de IAH foi calculado para cada animal através da fórmula: $IAH = 10^0 \Sigma I + 10^1 \Sigma II + 10^2 \Sigma III$, sendo I, II e III correspondente ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente. O valor médio de IAH foi dividido em 5 categorias por Poleksic & Mitrovic- Tutundzic (1994): 0-10 = funcionamento normal do tecido; 11-20 = danificação leve para moderada do tecido; 21-50 = modificação moderada para severa do tecido; 51-100 = modificação severa do tecido; maior que 100 = danificação irreparável do tecido. Este índice permitiu a comparação da severidade

das lesões branquiais, hepáticas e renais entre os peixes coletados nos diferentes locais.

Determinação dos metais e matéria orgânica na água e sedimento

Em cada local de amostragem foram determinados alguns parâmetros físicos e químicos da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade) e foram coletadas amostras de água (3 L) e sedimento (50 g) para a determinação da concentração de metais e matéria orgânica. As amostras de água que foram destinadas às análises de metais foram fixadas com ácido clorídrico e resfriadas.

Para análise de metais na água e sedimento, as amostras foram inicialmente concentradas com ácido em placas aquecedoras e mantidas refrigeradas (4°C) até o momento da leitura. As análises da concentração de metais (cromo, cobre, zinco, níquel, alumínio e cobalto) foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica (Varian, Spectr AA-10 plus) em triplicatas.

Para a determinação da matéria orgânica foi utilizado o método gravimétrico, sendo o material resultante da filtração das amostras de água (500 mL) e o sedimento (2 g) incinerados em mufla por 1 hora a 400°C e as análises feitas em triplicatas.

Análise estatística

Os resultados (médias \pm DP) de VMA e IAH obtidos para os animais de cada local estudado, foram comparados entre si utilizando-se teste paramétrico (ANOVA) ou não paramétrico (Kruskall-Wallis), dependendo da distribuição dos dados, seguido de um teste de comparações múltiplas, quando necessário. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados das medidas físico-químicas da água nos pontos de coleta estão apresentados na Tabela 1. Dos locais amostrados o ponto D apresentou o menor valor de OD e o ponto C o maior valor de condutividade.

Tabela 1. Características físico-químicas da água dos locais de coleta.

Locais de coleta	O.D. (mgO ₂ .mg ⁻¹)	Temp. °C	pH	Condutividade uS.cm ⁻¹
Nasc.	5,33 ± 0,21	20,18 ± 1,89	6,47 ± 0,21	66,50 ± 22,63
A	5,28 ± 1,83	22,70 ± 1,37	6,70 ± 0,52	92,88 ± 23,55
B	7,76 ± 10,61	22,42 ± 2,01	7,39 ± 0,44	98,38 ± 17,61
C	7,73 ± 1,18	20,86 ± 2,53	7,59 ± 0,69	214,00 ± 51,79
D	4,59 ± 0,72	22,26 ± 2,00	7,41 ± 0,64	174,83 ± 42,89

Os valores são as médias ± DP das medidas de cada local.

Os resultados da análise da matéria orgânica e dos metais na água e no sedimento dos cinco pontos de amostragem estão apresentados na Tabela 2. Dos metais analisados no sedimento, as concentrações mais elevadas foram observadas no ponto D, com exceção do níquel e cobalto. A concentração de metais na água não pôde ser determinada pois os valores estavam muito abaixo dos níveis de detecção do espectrofotômetro utilizado, razão pela qual os resultados dessa análise não estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração de matéria orgânica na água e sedimento e metais no sedimento dos locais de coleta no ribeirão Cambé.

Local	Matéria orgânica		Metais no sedimento (mg.kg ⁻¹)					
	H ₂ O (mg.dL ⁻¹)	Sed. (mg.g ⁻¹)	Al	Ni	Cu	Zi	Cr	Co
Nasc.	0,005	103	1778,3	5,3	45,5	32,5	2,5	0,3
A	0,004	90	1470,8	3,7	37,8	38,0	2,0	0,6
B	0,003	95	2009,3	4,5	49,5	49,5	1,8	0,8
C	0,003	110	2048,3	5,5	55,3	44,0	4,0	1,0
D	0,003	95	2075,3	1,5	68,3	119,3	4,3	0,7

Análise histopatológica

Uma variedade de alterações histopatológicas foi observada nos órgãos examinados dos lambaris dos cinco pontos de coleta.

Brânquias

As brânquias de *Astyanax scabripinnis* são compostas de quatro arcos branquiais em cada lado da cavidade bucal e cada arco é constituído de inúmeros filamentos branquiais. As lamelas secundárias elevam-se acima e abaixo do filamento, a intervalos regulares, e são constituídas por células pavimentosas apoiadas na membrana basal que revestem as células pilares (Fig. 2a e 2b).

Os peixes coletados nos cinco pontos apresentaram várias alterações histopatológicas no tecido branquial. Elevação do epitélio lamelar com redução da distância interlamelar e início de fusão lamelar, rompimento das células pilares e constrição do seio sangüíneo (Figs. 2b e 2d). Mudanças vasculares, caracterizadas por aneurisma ou congestão vascular, com o rompimento do sistema de células pilares em algumas áreas das lamelas (Figs. 2c e 2d). Hiperplasia do epitélio do filamento levando ao seu espessamento descontrolado (Fig. 2f) e hipertrofia das células pavimentosas e das células epiteliais do filamento (Figs. 2e e 2g). Excessiva proliferação de células no epitélio do filamento causando fusão lamelar total (Figs. 2e e 2g). Estes tipos de alterações foram observados nos peixes coletados em todos os pontos, mas em menor quantidade nos animais do ponto A. Também foi observada a presença de parasitos em 10% de todas os animais coletados. As alterações observadas neste trabalho foram classificadas quanto ao grau de severidade e comprometimento da função branquial em alterações de estágio I e II (Tabela 3).

TABELA 3. Classificação das alterações histopatológicas das brânquias quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem de acordo com Poleksić & Mitrović-Tutundžić (1994).

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS BRANQUIAIS	ESTÁGIO
1. Hipertrofia e hiperplasia do epitélio branquial	
▪ Hipertrofia do epitélio respiratório	I
▪ Elevação das células do epitélio	I
▪ Hiperplasia do epitélio lamelar	I
▪ Desarranjo lamelar	I
▪ Fusão incompleta de várias lamelas	I
▪ Fusão completa de várias lamelas	I
▪ Fusão completa de todas as lamelas	II
▪ Ruptura do epitélio lamelar	II
▪ Espessamento descontrolado do tecido proliferativo	II
2. Mudanças nas células de cloreto e mucosas	
▪ Hiperplasia e hipertrofia das células de cloreto	I
▪ Hiperplasia e hipertrofia das células de muco	I
3. Alterações nos vasos sanguíneos	
▪ Dilatação do seio sanguíneo	I
▪ Constrição do seio sanguíneo	I
▪ Congestão vascular	I
▪ Aneurisma lamelar	II
▪ Rompimento do sistema de células pilares	II
4. Parasitas Branquiais	
▪ Presença de parasitas	I

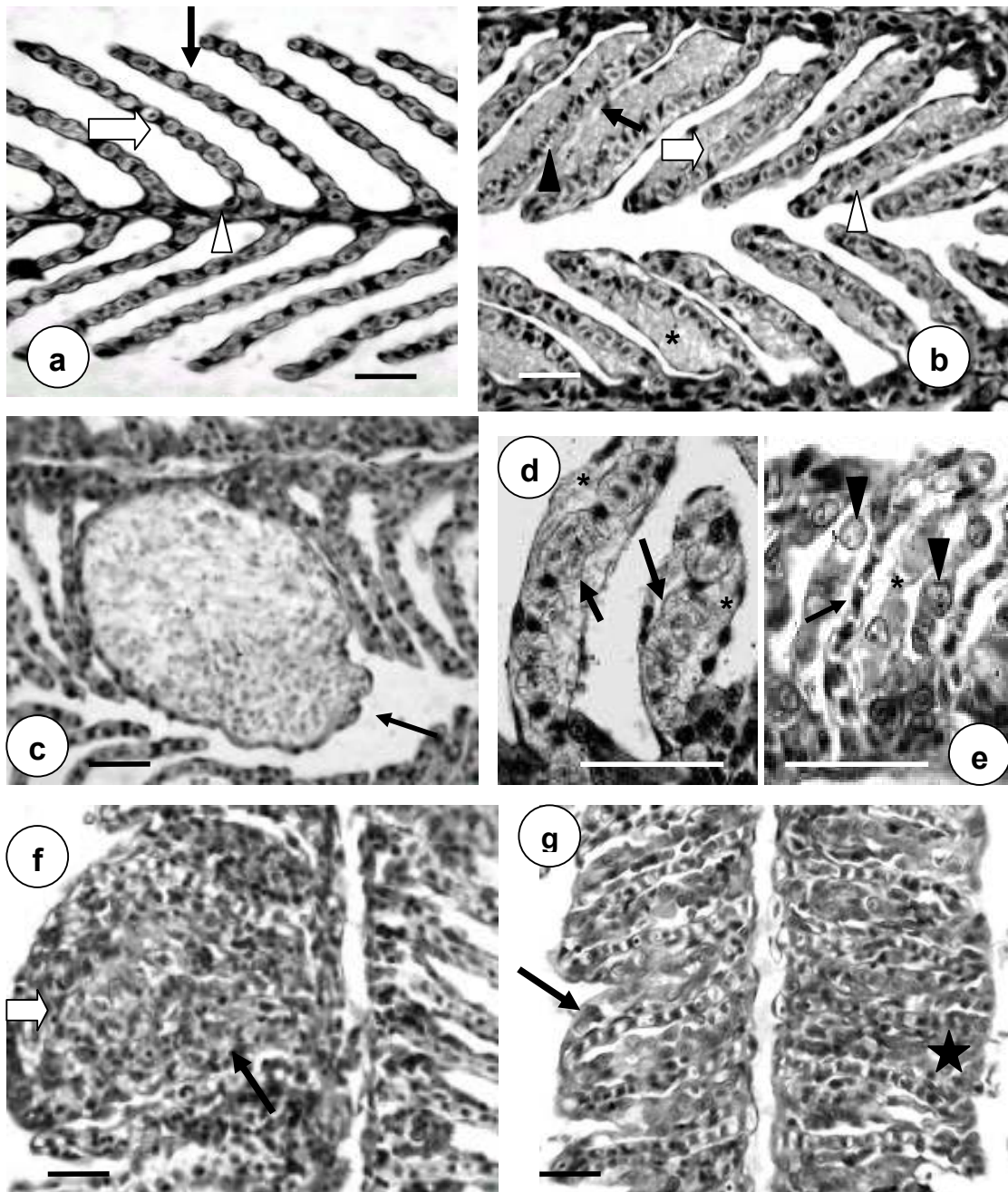


Fig. 2. Fotomicrografia do tecido branquial de *Astyanax scabripinnis* coletados na nascente (a), no ponto A (b e d), no ponto B (c), no ponto C (f) e no ponto D (e , g). (a) Filamento branquial sem alterações patológicas, destacando a lamela (seta branca), o filamento branquial (cabeça da seta) e as células pilares (seta preta); (b) elevação epitelial (asterisco), constrição do seio sanguíneo (cabeça da seta), fusão lamelar parcial (seta preta), células pavimentosas (cabeça da seta branca) e rompimento do sistema de células pilares (seta branca); (c) aneurisma (seta); (d) detalhe do rompimento do sistema de células pilares (seta) e elevação epitelial (asterisco); (e) detalhe da hipertrofia das células epiteliais da lamela (cabeça da seta); lamela (seta preta), fusão completa de todas as lamelas (asterisco); (f) hiperplasia do epitélio filamentososo (seta preta) e espessamento descontrolado do tecido proliferativo (seta branca); (g) fusão completa das lamelas (estrela) e hipertrofia das células epiteliais da lamela (seta). Escala barra = 25 µm. H & E.

Os valores de VMA calculados para os peixes dos cinco pontos variaram entre 2,3 a 2,7, indicando uma incidência de lesões de moderada para amplamente distribuídas pelas brânquias e não houve diferença significativa entre os valores de VMA obtidos para os cinco pontos de coleta (Fig. 6a).

Para o índice de alterações histopatológicas (IAH) branquiais também não houve diferença significativa entre os pontos de coleta (Fig. 6b). Os valores médios de IAH obtidos para os animais dos cinco pontos variaram de 22,5 (peixes da nascente) a 25,6 (peixes do ponto C), indicando a ocorrência de alterações de estágio I e algumas de estágio II, que são menos severas, mas, entretanto, promovem o comprometimento de moderado para severo da função branquial.

Fígado

O tecido hepático dos lambaris coletados na nascente e no ponto C foi caracterizado pela presença de grande quantidade de glicogênio dentro de vacúolos nos hepatócitos (Fig. 3a). Predominantemente, no fígado dos lambaris dos pontos A, B e D ocorreu uma nítida redução dos depósitos de glicogênio dentro dos hepatócitos (Fig. 3b). As principais alterações encontradas nos hepatócitos dos lambaris dos cinco pontos de coleta foram: degeneração celular (Fig. 4a) e nuclear; hipertrofia celular e nuclear, núcleos ou células atrofiadas (Fig. 4b) e vacuolização citoplasmática (Fig. 4d). Observou-se também hiperemia, caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo no órgão e deslocamento do núcleo para a periferia da célula hepática (Fig. 4d). Em alguns lambaris coletados na nascente e nos pontos A e C foi observado vacuolização nuclear (Fig. 4b) e necrose (Fig. 4c). Também foi observado em alguns lambaris de todos os pontos de amostragem estagnação biliar e centros de melanomacrófagos. As alterações observadas foram classificadas quanto ao grau de severidade e comprometimento da função hepática, sendo a maioria de estágio I e II, com exceção da necrose que é de estágio III (Tabela 4).

TABELA 4. Classificação das alterações histológicas do fígado quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem, adaptado de Poleksić & Mitrović-Tutundžić (1994).

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS	ESTÁGIO
1. Alteração nos hepatócitos	
▪ Núcleo na periferia da célula	I
▪ Deformação do contorno celular	I
▪ Deformação do contorno nuclear	I
▪ Hipertrofia celular	I
▪ Hipertrofia nuclear	I
▪ Atrofia celular	I
▪ Atrofia nuclear	I
▪ Centros de melanomacrófagos	I
▪ Vacuolização citoplasmática	I
▪ Vacuolização nuclear	II
▪ Degeneração citoplasmática	II
▪ Degeneração nuclear	II
▪ Rompimento celular	II
▪ Estagnação biliar	II
2. Alterações nos vasos sangüíneos	
▪ Hiperemia	II
3. Necrose	
▪ Necrose focal	III

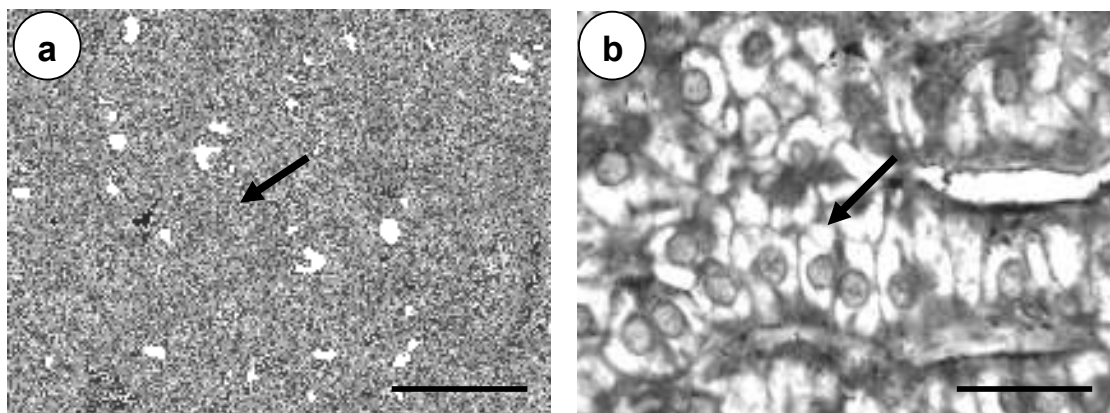


Fig. 3. Fotomicrografia do tecido hepático de *Astyanax scabripinnis* coletado no ponto C (a) e no ponto A (b). (a) acúmulo de glicogênio dentro dos hepatócitos (seta) e (b) vacuolização nos hepatócitos, caracterizado pela depleção de glicogênio (seta). Escala barra = 25 μ m. PAS.

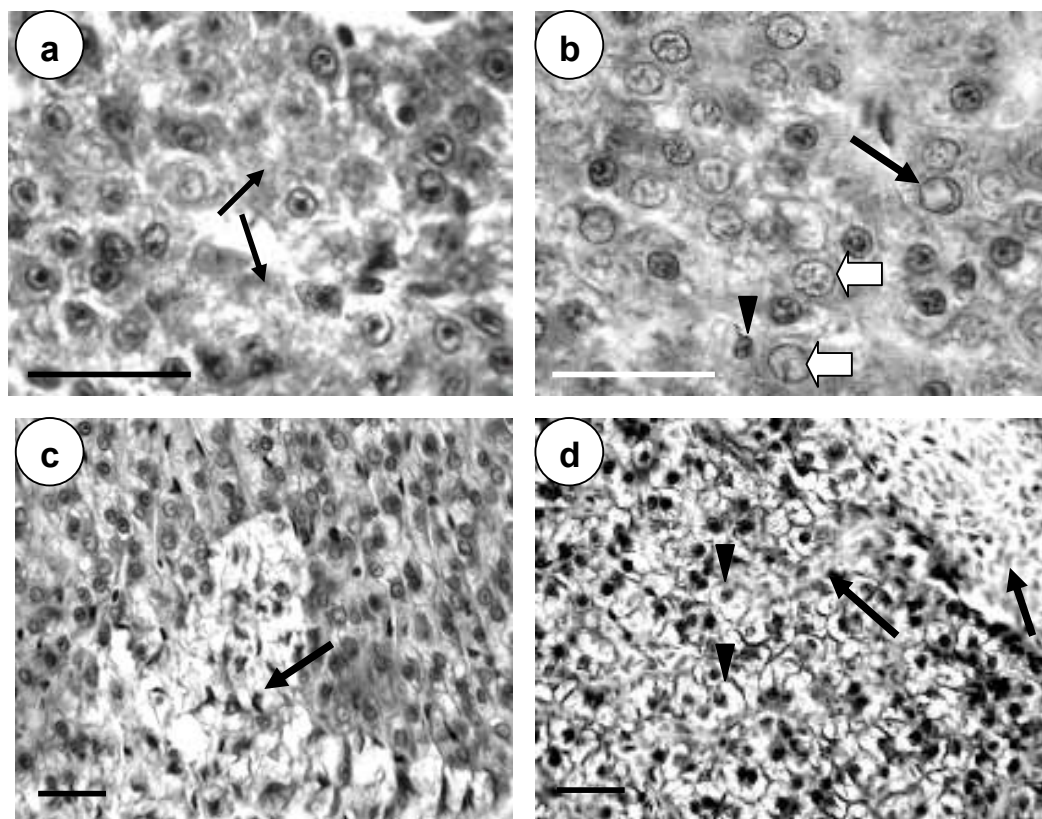


Fig. 4. Fotomicrografia do tecido hepático de *Astyanax scabripinnis* coletado na nascente (a), no ponto A (b), no ponto C (c) e no ponto D (d). (a) degeneração das células hepáticas (seta); (b) vacuolização nuclear (seta), atrofia nuclear (cabeça da seta) e hipertrofia nuclear (seta branca); (c) necrose focal (seta); (d) hiperemia (seta) e vacuolização citoplasmática (cabeça da seta). Escala barra = 25 μ m. H&E.

O VMA obtido para as alterações hepáticas (Fig. 6c) foi significativamente menor nos animais do ponto B (2,1) em relação ao ponto D (2,7) ($P=0,015$), o que mostra uma incidência de alterações de moderadas para amplamente distribuídas no tecido hepático.

O valor de IAH hepático, obtido para os peixes do ponto B foi significativamente menor que os valores de IAH dos demais pontos ($P=0,015$) (Fig. 6d). O IAH variou de 21,5 para os peixes do ponto B a 35,6 para os peixes do ponto C, mostrando que a maioria das alterações observadas no fígado dos lambaris não são muito severas, entretanto, no ponto A e C foi observada a ocorrência de necrose, que é uma alteração de estágio III, severa e irreversível.

Rim

O rim posterior de *Astyanax scabripinnis* é composto de numerosos corpúsculos renais com glomérulos desenvolvidos e um sistema de túbulos. O segmento proximal é recoberto por células colunares altas, com núcleo basal e membrana apical com borda em escova. O segmento distal é recoberto por células epiteliais colunares grandes e claras, com núcleo central e não possui borda em escova. O ducto coletor tem o diâmetro maior que o do segmento distal, contém células epiteliais com núcleo basal e também não possui borda em escova.

O rim dos lambaris coletados nos cinco pontos apresentou uma grande quantidade de alterações histopatológicas. As lesões predominantes no rim foram: vacuolização citoplasmática, associada com degeneração granular e hialina e necrose nos túbulos proximais e distais (Figs. 5a, 5b e 5c), hipertrofia do núcleo e das células dos túbulos, rompimento das células dos túbulos, degeneração tubular, redução no calibre do túbulo e oclusão da luz tubular (Fig. 5a), regeneração tubular (Fig. 5f), presença de novos néfrons (Fig. 5g) Alterações glomerulares também foram observadas, tais como dilatação dos capilares do glomérulo (Fig. 5e), que levou ao aumento do glomérulo, que resultou na redução do espaço da cápsula de Bowman (Figs. 5d e 5e) e na presença de hemácias no espaço de Bowman (Fig. 5d). Algumas vezes foi observado um grande acúmulo de sangue no capilar do glomérulo e no espaço de Bowman que foi denominado de hemorragia (Fig. 5e). Foram observadas alterações renais de estágio I, II e III, de acordo com o grau de severidade e comprometimento da função renal, conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Classificação das alterações histológicas do rim quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem, modificado de Poleksić & Mitrović-Tutundžić (1994).

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS RENAL	ESTÁGIO
1. Alterações tubulares	
▪ Degeneração granular	I
▪ Hipertrofia celular	I
▪ Hipertrofia nuclear	I
▪ Vacuolização celular	I
▪ Dilatação da luz tubular	I
▪ Túbulos em regeneração	I
▪ Rompimento celular	II
▪ Degeneração hialina	II
▪ Oclusão da luz tubular	II
▪ Degeneração tubular	II
▪ Novos néfrons	II
2. Alterações glomerulares	
▪ Dilatação dos capilares	I
▪ Espessamento do endotélio capilar	I
▪ Aumento do volume glomerular	I
▪ Redução do espaço de Bowman	II
▪ Presença de hemácias no espaço de Bowman	II
▪ Extravasamento de sangue no espaço de Bowman (hemorragia)	II
3. Necrose	
▪ Necrose focal	III

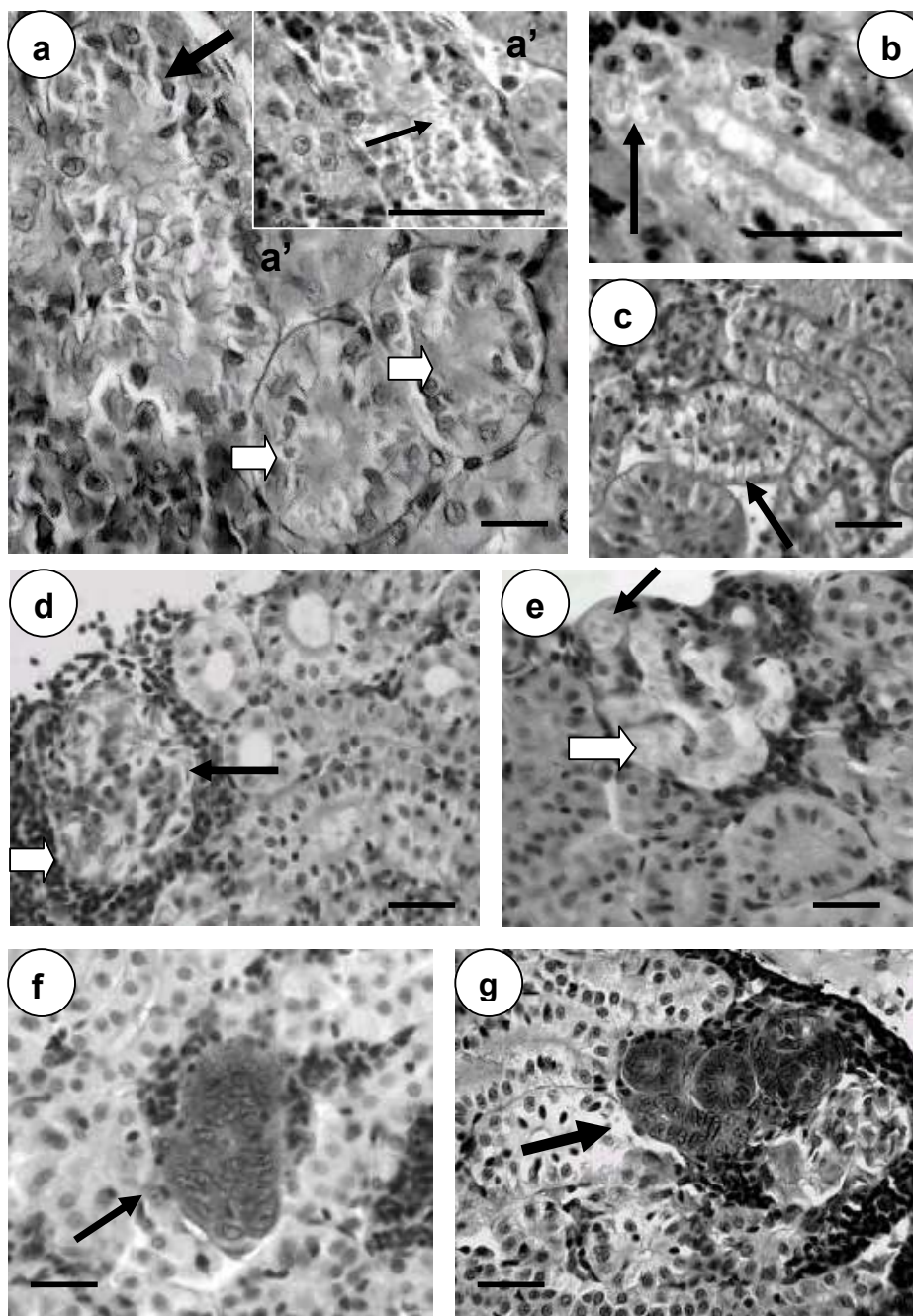


Fig. 5. Fotomicrografia do tecido renal de *Astyanax scabripinnis* coletado na nascente (a, b, c), no ponto A (d), no ponto B (e), no ponto C (f) e no ponto D (g). Notam-se várias alterações como: (a) necrose (seta) e oclusão da luz tubular (seta branca) no (a') detalhe da necrose; (b) degeneração hialina (seta); (c) degeneração granular (seta); (d) redução do espaço de Bowman (seta branca) e presença de hemácia no espaço de Bowman (seta); (e) dilatação dos capilares do glomérulo (seta), que resultou no acúmulo de sangue no capilar do glomérulo e no espaço de Bowman que é chamado de hemorragia (seta branca); (f) regeneração tubular (seta); (g) novo néfron (seta). Escala da barra = 25 μm . H & E.

Os valores de VMA calculados para os peixes dos cinco pontos permaneceram entre 2 e 3 (Fig. 6e), indicando uma incidência de lesões de moderada para amplamente distribuídas pelo rim e não houve diferença significativa entre os pontos.

O IAH renal variou de $80,5 \pm 54,1$ para os peixes do ponto A a $132,6 \pm 47,6$ para os peixes provenientes do ponto B, indicando a maior ocorrência de alterações de estágio II e de estágio III, que causam modificações severas no tecido, sendo que algumas podem promover danos irreparáveis ao rim. O valor de IAH obtido para os peixes do ponto B foi significativamente maior que os valores obtidos para os demais pontos ($P= 0,031$) (Fig. 6f).

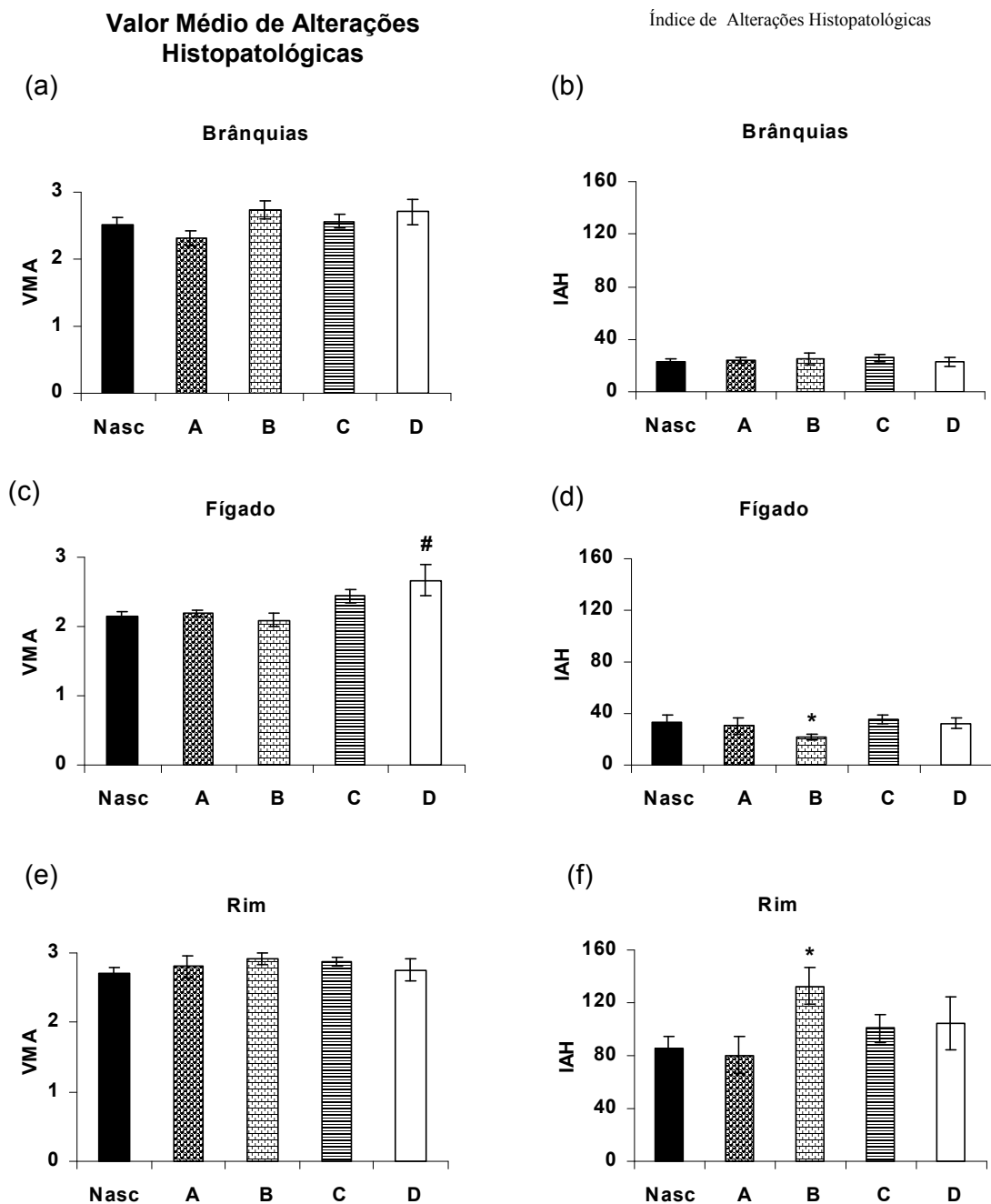


Fig. 6. Valor médio de alterações histopatológicas branquial (a), hepática (c) e renal (e) e índice de alterações histopatológicas branquial (b), hepática (d) e renal (f). As barras representam as médias e a linha vertical o erro padrão. O # indica diferente do ponto B e o * indica diferente dos demais pontos.

DISCUSSÃO

A análise físico-química tem sido empregada para avaliar a qualidade da água. A temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade são freqüentemente utilizados para avaliar a poluição da água, assim como os dados de matéria orgânica e metais na água e no sedimento (MacDonald *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 2003).

Dentre os locais amostrados, o ponto D apresentou o menor valor de OD ($4,6 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$), o que provavelmente tem relação com uma maior demanda por oxigênio na água nesse local, o que é corroborado pelos valores de M.O. e condutividade, que são elevados nesse ponto. Entretanto, nenhum dos locais amostrados apresentou valores de OD considerados críticos (menores que $4,0 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$). Valores de condutividade acima de $100 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$, como observado nos pontos C e D, têm sido relatados para locais muito impactados (CETESB, 2001) e podem refletir uma diminuição na qualidade da água (Olsen *et al.*, 2001).

Os valores encontrados para cromo, níquel e zinco no sedimento de todos os locais de coleta, foram menores que as concentrações limites (CL) para estes metais (MacDonald *et al.*, 2000), ou seja, concentrações abaixo das quais os efeitos tóxicos dos metais para os organismos são pouco prováveis. Os valores encontrados para o cobre foram maiores que a concentração limite para este metal em todos os pontos, porém menores que a concentração de efeito provável (CE para o Cu: $149 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), ou seja, valor acima do qual o efeito tóxico do cobre é esperado (MacDonald *et al.*, 2000). Tais resultados classificam o sedimento dos locais de coletas como não tóxicos para organismos vivos em relação aos metais presentes.

Não se tem determinado os valores de CL e CE para o cobalto e o alumínio, o que dificulta a análise desses metais. Para o alumínio, entretanto, as altas concentrações encontradas podem ser reflexo das características naturais do solo da região de Londrina. Como o pH da água do ribeirão Cambé tende a ser mais básico que ácido, e praticamente não sofre variação sazonal, muito pouco desse metal deve estar disponível, já que o alumínio tem sua toxicidade aumentada em águas ácidas (Barcarolli & Martinez, 2004).

O presente trabalho mostrou que a inclusão de peixes pequenos inteiros é um método prático e de custo relativamente baixo que permitiu a avaliação simultânea

de alterações em vários órgãos (brânquia, fígado e rim) utilizando uma espécie de peixe nativa como organismo teste na avaliação da qualidade da água. Os lambaris coletados em todos os pontos do ribeirão Cambé apresentaram alterações histopatológicas nos três órgãos examinados.

Os efeitos dos contaminantes ambientais sobre as brânquias dos lambaris são particularmente graves, já que as brânquias servem como o principal órgão para a respiração e regulação osmótica e iônica. O prejuízo do funcionamento das brânquias durante a exposição aguda a algum poluente presente no ambiente pode levar o peixe à morte (Hinton & Laurén, 1990; Hinton *et al.*, 1992; Thophon *et al.*, 2003). O primeiro sinal de patologia branquial inclui a elevação epitelial, que foi a alteração mais freqüentemente encontrada nas brânquias dos lambaris do ribeirão Cambé. Esta alteração caracteriza-se pela elevação de uma lâmina contínua do epitélio lamelar para longe do sistema de células pilares, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue. Ocorre a formação de um espaço que pode ser preenchido por água, podendo levar a formação de um edema (Wendelaar Bonga, 1997; Thophon *et al.*, 2003). Esta alteração é interpretada como uma reação inicial das brânquias ao estresse químico, causado por uma variedade de poluentes. A elevação epitelial diminui a vulnerabilidade da área superficial das brânquias, entretanto, pode prejudicar a eficiência das trocas gasosas e transporte iônico (Mallat, 1985; Winkaler *et al.*, 2001).

A hiperplasia, também encontrada nas brânquias dos peixes dos cinco locais de coleta, caracteriza-se pelo aumento na proliferação das células, podendo levar à fusão das lamelas e, mais raramente, dos filamentos (Heath, 1987; Hinton *et al.*, 1992). A fusão lamelar é um mecanismo natural de defesa para proteger o epitélio da lamela do contato direto dos agentes tóxicos (Heath, 1987; Ojha, 1999). A elevação epitelial, hiperplasia e fusão lamelar são conhecidas por serem alterações inespecíficas que podem ser causadas por uma variedade de estressores, tais como metais, amônia, fenóis, infecções por microorganismos e presença de ectoparasitos (Mallat, 1985; Hinton & Laurén, 1990; Hinton *et al.*, 1992).

As lamelas branquiais dos lambaris coletados no Cambé também apresentaram alterações vasculares, como congestão vascular e aneurisma. O aneurisma normalmente resulta do colapso do sistema de células pilares, que prejudica a integridade vascular com a liberação de grande quantidade de sangue que empurra o epitélio lamelar para fora (Heath, 1987; Hinton & Laurén, 1990).

Outras alterações encontradas nas brânquias dos lambaris dos cinco pontos de coletas foram, hipertrofia, desarranjo lamelar e constrição do seio sangüíneo.

A maioria destas alterações também foram observadas nas brânquias de *Barbatula barbatula* coletados em dois ribeirões alemães impactados com pesticidas e metais pesados (Schwaiger *et al.*, 1997) e de *Astyanax altiparanae* coletados em diferentes ribeirões urbanos (Winkaler *et al.*, 2001). Outros trabalhos já mostraram a ocorrência destas alterações nas brânquias de peixes expostos experimentalmente a diferentes poluentes. Por exemplo, em brânquias de *Lates calcarifer* submetido à exposição aguda e subcrônica de cádmio (Thophon *et al.*, 2003); de *Anguilla anguilla* expostos a diferentes concentrações de resina ácida e de efluente de fábrica de papel e celulose (Pacheco & Santos, 2002); de *Oncorhynchus mykiss* alimentados com cloreto de mercúrio (Handy & Penrice, 1993); de *Cyprinus carpio* expostos ao sulfato de cobre (Karan *et al.*, 1998); de *Salmo trutta* expostos a várias concentrações de detergente aniônico (Abel, 1976) e de *Prochilodus scrofa* expostos ao cobre (Mazon *et al.*, 2002; Cerqueira & Fernandes, 2002).

A análise estatística dos dados de VMA e IAH das brânquias não mostrou diferenças significativas entre os pontos de coleta. Foi observado neste órgão uma incidência de lesões de gravidade de moderada para severa, na maioria das vezes amplamente distribuída nas brânquias dos lambaris de todos os pontos do ribeirão Cambé. Estes resultados reforçam as observações de Winkaler *et al.* (2001) que mostraram que as alterações branquiais de lambaris do ribeirão Cambé ocorrem em maior quantidade e de forma expressiva quando comparadas às alterações de peixes de um local de referência.

O tecido hepático desempenha inúmeras funções vitais no metabolismo como já mencionado anteriormente, tais como: metabolismo de carboidratos, armazenamento de lipídios, tendo um papel crucial na síntese e oxidação de ácidos graxos (Hinton & Laurén, 1990; Stevens & Lowe, 1995). Além de sua função digestiva, as células hepáticas armazenam glicogênio, sintetizam proteínas plasmáticas (Heath, 1987) e também constituem o principal centro de detoxificação do organismo (Heath, 1987; Hinton *et al.*, 1992; Landis & Yu, 1995; Takashima & Hibiya, 1995). Sendo assim, as lesões neste órgão podem acarretar complicações severas para o metabolismo do organismo. A concentração de xenobióticos no fígado, a excreção desses agentes ou de seus metabólitos através da bile ou ainda a conversão dessas substâncias nos hepatócitos, contribuem para a vulnerabilidade

do fígado a injúrias químicas (Heath, 1987; Hinton *et al.*, 1992). Por isso, as alterações histopatológicas no fígado de peixes são biomarcadores eficientes que indicam a exposição prévia do animal a estressores presentes no ambiente (Hinton & Laurén, 1990; Hinton *et al.*, 1992).

As alterações histopatológicas hepáticas constatadas neste trabalho, bem como a pronunciada depleção de glicogênio observada no fígado dos lambaris dos pontos A, B e D, já foram citadas em outros estudos realizados com peixes provenientes de locais contaminados (Teh *et al.*, 1997; Schwaiger *et al.*, 1997).

A redução na quantidade de glicogênio dentro dos hepatócitos pode representar o início de uma resposta não específica ao estresse (Hinton & Laurén, 1990), induzidas em peixes por diferentes compostos (Schwaiger *et al.*, 1997; Gundersen *et al.*, 2000; Paris-Palácios *et al.*, 2000). Vários estímulos desfavoráveis podem induzir mudanças endócrinas que podem levar a prejuízos metabólicos, como por exemplo a redução dos depósitos de glicogênio. Longos períodos de mobilização das reservas energéticas podem contribuir para aumentar a susceptibilidade a doenças (Takashima & Hibiya, 1995; Paris-Palácios *et al.*, 2000). No presente estudo, a depleção de glicogênio observada nos hepatócitos dos peixes coletados nos pontos A, B e D pode ser interpretada como uma resposta não específica ao estresse. Por outro lado, a intensa vacuolização observada nos hepatócitos dos lambaris da nascente e do ponto C, está relacionada a um maior acúmulo de glicogênio no fígado destes animais, evidenciado pela reação de PAS. Estes resultados sugerem que as condições ambientais da nascente e do ponto C não estão interferindo nos estoques de glicogênio dos lambaris.

As alterações histopatológicas hepáticas observadas no presente estudo foram degeneração celular e nuclear, vacuolização citoplasmática e nuclear, atrofia nuclear, hiperemia, hipertrofia nuclear e citoplasmática, necrose em alguns animais, entre outras. Estas patologias parecem constituir uma resposta comum de peixes em ambientes aquáticos degradados ou em testes em laboratório com agrotóxico ou metais (Hinton & Laurén, 1990; Hinton *et al.*, 1992; Takashima & Hibiya, 1995; Teh *et al.*, 1997; Schwaiger *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998; Leadley *et al.*, 1998; Johnsen *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1998; Caballero *et al.*, 1999; Gundersen *et al.*, 2000; Paris-Palácios *et al.*, 2000; Schwaiger, 2001; Pacheco & Santos, 2002; Thophon *et al.*, 2003; Fanta *et al.*, 2003).

A hipertrofia ou atrofia dos hepatócitos reflete o estado funcional do fígado e é notavelmente diferente em estados hiper ou hipofuncionais. A hipertrofia celular ou nuclear indica a grande atividade da célula em decorrência da presença de algum composto químico ou ausência de alguma substância (Meyer & Hendricks, 1985; Hinton *et al.*, 1992; Takashima & Hibiya, 1995) e pode resultar em necrose (Fanta *et al.*, 2003; Takashima & Hibiya, 1995).

A hiperemia pode indicar um processo de adaptação que leva ao aumento do fluxo sangüíneo no tecido hepático, facilitando o transporte de macrófagos para as regiões danificadas deste tecido e também melhorando a oxigenação destas áreas ou ainda, pode indicar um mecanismo auxiliar na desintoxicação. Assim, a hiperemia e a presença dos melanomacróforos podem ser consideradas indicadores de estresse em peixes decorrente da presença de agentes químicos (Anderson & Zeeman, 1995). No presente trabalho, a hiperemia e os melanomacróforos observados no fígado dos lambaris dos cinco locais do ribeirão Cambé sugerem que todos os pontos amostrados sofrem algum grau de contaminação química.

Alterações como degeneração nuclear e celular e deformação do contorno celular podem indicar disfunções induzidas por algum agente tóxico, uma vez que áreas metabolicamente ativas do fígado ficam reduzidas, levando a uma possível redução geral nas funções desempenhadas por este órgão (Hinton & Laurén, 1990; Hinton *et al.*, 1992; Takashima & Hibiya, 1995; Teh *et al.*, 1997)

Os valores de VMA hepático obtidos para os lambaris do ribeirão Cambé indicou a ocorrência de lesões pontuais a amplamente distribuídas, principalmente nos peixes provenientes do ponto D e o IAH indicou que a maioria das alterações observadas são severas e que prejudicam o funcionamento do fígado.

O rim dos lambaris dos cinco pontos de coleta foi o órgão que apresentou uma maior quantidade de alterações e mais severas, quase todos os peixes apresentaram degeneração granular seguida por degeneração hialina e acompanhada por necrose das células epiteliais dos túbulos, entretanto um número maior de peixes do ponto B teve suas células necrosadas. Estas alterações são similares àquelas descritas para *Oncorhynchus tshawytscha* injetado com eritromicina (Kiryu & Moffitt, 2001), para *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de triclorfon (Veiga *et al.*, 2002), para *Salmo trutta* e *Barbatula barbatula* expostos a água de dois ribeirões contaminados com pesticidas,

PCB, PAH e metais (Gernhofer *et al.*, 2001; Schwaiger, 2001) e para *Lates calcarifer* submetido à exposição aguda e subcrônica de cádmio (Thophon *et al.*, 2003).

Em virtude do rim ser um órgão que recebe grande fluxo sanguíneo a presença de compostos químicos no sangue pode levar a algumas mudanças patológicas na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal, levando a redução do espaço de Bowman. Além disso, pode ocorrer o aparecimento de células sanguíneas ou agregados de células sanguíneas ou de matéria estranha no espaço de Bowman (Hinton *et al.*, 1992; Takashima & Hibiya, 1995). Às vezes o excesso de hemácias nos capilares pode levar ao rompimento desses vasos e, nesse caso, é comum encontrar hemácias no espaço de Bowman (Takashima & Hibiya, 1995). As lesões observadas no corpúsculo renal dos lambaris coletados no Cambé podem prejudicar a filtração glomerular e refletem condições anômalas do corpúsculo renal (Meyer & Hendricks, 1985; Hinton & Laurén, 1990). Estas alterações são similares àquelas encontradas em *Anguilla anguilla* exposta a diferentes concentrações da resina ácida e de efluente de fábrica de papel e celulose (Pacheco & Santos, 2002), em *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de triclorfon (Veiga *et al.*, 2002), em *Salmo trutta* e *Barbatula barbatula* expostos a água de dois ribeirões contaminados com pesticidas, PCB, PAH e metais (Gernhofer *et al.*, 2001) e em *Trichomycterus brasiliensis* exposto por quatro horas ao mercúrio orgânico (Oliveira Ribeiro, *et al.*, 1996).

Túbulos renais pré-existentes podem ser freqüentemente regenerados após serem danificados por algumas doenças (Takashima & Hibiya, 1995). Segundo Hinton & Laurén (1990) a regeneração tubular em peixes pode ser uma boa indicação de adaptação e recuperação. Neste trabalho, no rim dos lambaris dos cinco locais de amostragem foram observados túbulos em regeneração, que também foi observado em salmão real (*Oncorhynchus tshawytscha*) injetado com eritromicina (Kiryu & Moffitt, 2001). Após dano renal induzido por agentes tóxicos, pode haver a produção de néfrons inteiramente novos (Reimschuessel, 2001; Takashima & Hibiya, 1995). O novo néfron demora várias semanas para amadurecer, desenvolvendo os segmentos proximal e distal e tornando-se cada vez mais eosinófilo quando se distinguem as células do estágio adulto (Cormier *et al.*, 1995). A presença de novos néfrons em peixes pode indicar que o comprometimento fisiológico destes não está impedindo qualquer regeneração tecidual (Takashima &

Hibiya, 1995). Pode-se encontrar novos néfrons em peixes de águas não poluídas, o que difere de um ambiente impactado é quantidade desta estrutura no animal. Neste estudo, este tipo de estrutura foi encontrado em grande quantidade nos lambaris de todos os pontos. Novos néfrons também foram observados em peixes da espécie *Ameiurus nebulosus* e *Microgadus tomcod* coletados em ribeirões contaminados (Cormier *et al.*, 1995) e em *Carrassius auratus* exposto ao hexaclorobutadieno, gentamicina e cloreto de mercúrio e também em *Oncorhynchus mykiss* exposto ao tetracloroetileno (Reimschuessel, 2001).

A análise do VMA mostrou que as lesões renais dos lambaris de todos os pontos estavam, na maioria dos casos, amplamente distribuídas pelo órgão. Os animais do ponto B apresentaram IAH significativamente maior que dos peixes dos demais pontos de coleta. Entretanto, lesões renais severas e irreversíveis foram observadas em lambaris de todos os pontos do ribeirão Cambé, indicando que o tecido renal está sofrendo danos severos e em alguns casos irreparáveis.

Dos três órgãos analisados o rim foi o que demonstrou mais sensibilidade aos eventuais contaminantes do ribeirão Cambé, seguido do fígado e das brânquias, que foi o órgão com menor comprometimento morfológico.

A alta incidência de alterações histopatológicas nos lambaris procedentes do ribeirão Cambé, indica claramente o comprometimento da saúde destes peixes em decorrência da presença de agentes tóxicos na água destes locais. Estes resultados mostram a necessidade de ações mais efetivas por parte do poder público no que se refere ao controle da emissão de cargas poluidoras e ao planejamento urbano. Este trabalho também evidenciou que as análises histopatológicas branquiais, hepáticas e renais são ferramentas sensíveis e adequadas que podem ser utilizadas como biomarcadores em programas de monitoramento ambiental.

CONCLUSÃO

- A maioria das lesões encontradas nas brânquias dos lambaris coletados nos cinco locais de amostragem é considerada leve e de possível regressão, se a qualidade da água melhorar. As lesões hepáticas dos

lambaris dos cinco pontos de coleta são consideradas mais graves que as branquiais, e podem afetar o funcionamento deste órgão. Já as alterações renais foram as mais severas e podem causar danos irreparáveis ao tecido, mostrando portanto ser esse o órgão mais sensível a ação dos poluentes.

- A inclusão de peixes pequenos inteiros é um método prático e de custo relativamente baixo que permite a avaliação simultânea de alterações em vários órgãos, utilizando o peixe como organismo teste na avaliação da qualidade da água.
- A alta incidência de alterações histopatológicas nos lambaris procedentes de todos os pontos estudados do ribeirão Cambé, indica claramente o comprometimento da saúde desses peixes e da água desses locais, provavelmente em função de uma maior concentração de agentes tóxicos.
- Análises histopatológicas branquiais, hepáticas e renais podem ser utilizadas como biomarcadores em programas de monitoramento ambiental.

Agradecimentos

Ao CNPq e a Fundação Araucária pelo auxílio financeiro, a CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado para Silva, A. das G., aos integrantes do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) da UEL, pelo auxílio nas coletas de campo, ao doutor Paulo C. Meletti e ao Programa de Mestrado em Ciências Biológicas do CCB/UEL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, P. D. Toxic of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo truta* L.). **Journal Fish Biology**, v. 9, p. 441-446, 1976.

ANDERSON, D. P.; ZEEMAN, M. G. Immunotoxicology in Fish. In: RAND, G. M. (Editor). **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects: environmental fate and risk assessment**. 2. ed.: Taylor & Francis, 1995. p. 345-369.

BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of aluminum in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus*

macrocephalus (Anostomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 72, n.3, p. 639 – 646, 2004.

BROWN, S. B.; DELORME, P. D.; EVANS, R. E.; LYLE LOCKHART, W.; MUIR, D. C. G.; WARD, F. J. Biochemical and histological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 17, n. 5, p. 915 – 921, 1998.

CABALLERO, M. J.; LÓPEZ-CALERO, G.; SOCORRO, J.; ROO, F. J.; IZQUIERDO, M.S.; FERNÁNDEZ, A. J. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**. v. 179, p. 277 – 290, 1999.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 52, p. 83 – 91, 2002.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. **2000. (2v) Série Relatórios/CETESB, São Paulo: 2001.**

CHANG, S.; ZDANOWICZ, V. S.; MURCHELANO, R.A. Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United States estuaries. **ICES Journal of Marine Science**. v. 55, p. 954 – 969, 1998.

- COMIER, S. M.; NEIHEISEL, T. W.; WERNISING, P.; RACINE, R. N.; REIMSCHUESSEL, R. New nephron development in fish from polluted waters: a possible biomarker. **Ecotoxicology**, n. 4, p. 156-168, 1995.

DONALDSON, E. M. The pituitary-interrenal axis as indicator of stress in fish. In: PICKERING, A. D. (Editor). **Stress and fish**. Academic Press, 1981. cap. 2, p. 11 – 47.

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

GERNHOFER, M.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M.; MULLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. v. 8, p. 241 – 260, 2001.

GUNDERSEN, D. T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S. D. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordanes-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 19 n.9, p. 2275-2285, 2000.

HANDY, R.D.; PENRICE, W. S. The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 106c, n. 3, p. 717 – 724, 1993.

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. C.R.C. Press, 1987.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, n. 8, p. 51- 66, 1990.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE Jr, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 –196.

JOHNSEN, K.; TANA, J.; LEHTINEN, K. J.; STUTHRIDGE, T.; MATTSSON, J. H.; CARLBERG, G. E. Experimental field exposure of Brown trout to river water receiving effluent from an integrated newsprint mill. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p.184 – 193, 1998.

LANDIS W. G.; YU, MING-HO. **Introduction to environmental toxicology impacts of chemicals upon ecological systems**. Florida: Boca Ration, 1995. p. 328.

LEADLEY, T. A.; BALCH, G.; METCALFE, C. D.; LAZAR, R.; MAZAKI, E.; HABOWSKY, J.; HAFFNER, D. G. Chemical accumulation and toxicological stress in three brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) populations of the Detroit River, Michigan, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 17 n.9, p. 1756 - 1766, 1998.

KARAN, V.; VTOROVIĆ, S.; TUTUNDŽIĆ, V.; POLEKSIĆ, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 49 – 55, 1998.

KIRYU, Y.; MOFFITT, C. M. Acute LD₅₀ and kidney histopathology following injection of erythromycin (Erythri-200) and its carrier in spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**. v.24, p. 409 – 416, 2001.

MacDONALD, D. D.; INGERSOLL, C. G.; BERGER, T. A. Development and evaluation of consensus – based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 39, p. 20 – 31, 2000.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Can. Journal Aquatic. Sci.**, v. 42, p. 630-648, 1985.

MAZON, A. F.; CERQUIERA, C.C.C; FERNANDES, M.N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the south American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research Section A**. v. 88, p. 52 – 63, 2002

MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. (Org.). **Limnologia Fluvial - Um Estudo no Rio Mogi-Guaçu**. São Carlos, 2003, p. 149-180.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. **Práticas de biologia celular**. São Paulo: Edgard Blücher, 1980.

MEYERS, T. R.; HENDRICKS, J.D. **Histopathology**. IN: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Editores). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere Publishing Corporation, Washington: p. 283-331, 1985.

OJHA, J. Fish gills: potential indicators of ecodegradation of aquatic environments. In: MITTAL, A. K.; EDDY, F. B.; DATTAMUNSHI, J. S. (Editores). **Water/air transition in biology**. E.U.A.: Science Publishers, 1999. cap. 18, p. 263 – 279.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FANTA, E.; TURCATTI, N. M.; CARDOSO, R. J.; CARVALHO, C.S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). **Biocell**. V. 20 (3), p. 171 – 178, 1996.

OLSEN, T.; ELLERBECK, L.; FISHER, T.; CALLAGHAN, A.; CRANE, M. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparus* meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.20, n. 8, 1725-1732, 2001.

OVERSTREET, R. M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. **Aquatic Toxicology**. v. 11, p. 213 – 239, 1988.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331 – 347, 2002.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUNDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **The Science of the Total Environment**. v. 309, 9. 105 – 115, 2003.

PARIS-PALÁCIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**. v. 50, p.109-124, 2000.

POLEKSIĆ, V.; MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, 1994. cap. 30, p. 339-352.

REIMSCHUESSEL, R. A fish model of renal regeneration and development. **Ilar Journal**. v.42, p. 285 – 291, 2001.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 231 – 240, 2001.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia**. São Paulo: Manole Ltda, 1995.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology normal and pathological features**. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, 1995.

TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51 – 70, 1997.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**. v. 121, p. 307 – 320, 2003.

VEIGA, M. L.; RODRIGUES, E. L.; PACHECO, F. J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V. 45 (2), p. 171 – 175, 2002.

WENDELAAR BONGA, S. E. The Stress Response in Fish. **Physiological Review**, E.U.A., v. 77, n. 3, p. 591- 620, 1997.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. dos R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 507 – 514, 2001.

ARTIGO 2

Histopatologia renal e análise morfométrica do tecido interrenal de *Astyanax altiparanae* de um ribeirão urbano

Andressa das Graças Silva e Claudia B. R. Martinez

Histopatologia renal e análise morfométrica do tecido interrenal de *Astyanax altiparanae* de um ribeirão urbano

Andressa das Graças Silva¹ Claudia B. R. Martinez
Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas e ¹Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.
C.P. 6001. CEP: 86051-990. E-mail: andregracas@hotmail.com

Resumo: O presente estudo enfatiza o uso da análise histopatológica do rim e análise morfométrica das células interrenais da porção anterior do rim, para avaliar os efeitos da contaminação aquática em um ribeirão urbano, utilizando-se o lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*, Characiformes). O estudo histopatológico revelou alterações severas no rim dos lambaris do ribeirão, tais como: necrose, degeneração hialina, redução do espaço de Bowman e novos néfrons. A análise morfométrica das células interrenais destes animais revelou um aumento na área da célula e do núcleo e no diâmetro do núcleo, demonstrando estarem hipertrofiadas quando comparada com as células interrenais dos peixes de um local referência. Estes resultados indicam uma maior incidência de alterações histopatológicas renais e estimulação crônica do eixo hipotálamo – hipófise – células interrenais (HPI) dos lambaris que vivem no ribeirão urbano. Os parâmetros analisados mostraram-se ferramentas sensíveis que podem ser empregados como biomarcadores para avaliação da contaminação aquática em programas de monitoramento ambiental.

Palavras chaves: histopatologia, rim, célula interrenal, peixe, contaminação aquática.

INTRODUÇÃO

Rios, ribeirões e córregos que estão localizados no perímetro urbano, vêm sofrendo com a poluição ambiental, pois recebem descarga de varias formas de poluentes, como por exemplo, efluentes industriais, despejo de esgoto doméstico e até escoamento de agrotóxicos. Os poluentes podem causar lesões nos tecidos e órgãos dos peixes que vivem em ambientes degradados (Overstreet, 1988; Schwaiger *et al.*, 1997; Teh *et al.*, 1997). Assim, as análises histopatológicas são consideradas ferramentas sensíveis para detectar a presença e os efeitos de compostos químicos em órgãos alvo (Schwaiger, 2001).

O rim dos teleósteos, em associação com as brânquias e intestino, realiza a excreção e a manutenção da homeostase dos fluídos corporais e por receber grande

fluxo sangüíneo pode ser considerado, assim como as brânquias, órgão alvo para os poluentes (Hinton *et al.*, 1992; Evans, 1993). Esse órgão é extremamente importante, porque além da produção de urina, constitui a principal rota de excreção para os metabólitos de vários xenobióticos aos quais o peixe tenha sido eventualmente exposto (Hinton *et al.*, 1992). Lesões no tecido renal podem ser indicações de toxinas específicas, e assim podem ser utilizadas como indicadores dos efeitos dos contaminantes (Overstreet, 1988; Hinton & Laurén, 1990; Schwaiger *et al.*, 1997). Na presença de poluentes o rim pode apresentar varias alterações histológicas (Meyer & Hendricks, 1985; Hinton & Laurén, 1990; Hinton *et al.*, 1992; Cormier *et al.*, 1995; Takashima & Hibiya, 1995; Schwaiger *et al.*, 1997; Meletti *et al.*, 2003). As alterações histopatológicas renais em peixes vêm sendo utilizadas como biomarcadores da contaminação aquática (Hinton *et al.*, 1992; Oliveira Ribeiro *et al.*, 1996; Schwaiger, *et al.*, 1997; Pacheco & Santos, 2002).

A porção anterior do rim é homóloga a adrenal de mamíferos está relacionada com o sistema endócrino do animal e com as respostas ao estresse, que são mediadas pelo eixo hipotálamo – hipófise – células interrenais (HPI) e pelo eixo hipotálamo – sistema nervoso autônomo – células cromafins (HSC) (Donaldson, 1981; Wendelaar Bonga, 1997). As células interrenais liberam os corticosteroides, sendo o mais importante o cortisol, também chamado de hormônio do estresse. O aumento da concentração de cortisol no plasma, em resposta a algum estímulo estressor, indica aumento da atividade das células interrenais, que pode ser avaliado através de medidas da área da célula e do núcleo e do diâmetro do núcleo das células interrenais (Donaldson, 1981; Norris *et al.*, 1997; Quabius *et al.*, 2000). O estresse crônico pode causar hipertrofia no tecido interrenal dos teleósteos (Norris *et al.*, 1997; Quabius *et al.*, 2000).

Considerando-se a importância dos estudos de campo para o monitoramento ambiental e a necessidade de se conhecer os efeitos da exposição crônica aos poluentes em espécies neotropicais, o presente trabalho avaliou a ocorrência, o tipo e a intensidade das eventuais alterações histopatológicas no rim, bem como as alterações morfométricas no tecido interrenal, de lambaris da espécie *Astyanax altiparanae*, coletados em um ribeirão urbano impactado.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo e coletas dos animais

De novembro de 2001 a setembro de 2002, lambaris, *Astyanax altiparanae* Garuti & Britski, 2000 (Characidae, Tetragonopterinae), foram coletados em 3 pontos do ribeirão Cambé (Pontos I, II e III), todos localizados no perímetro urbano de Londrina, norte do Estado do Paraná, (Fig.1). O ponto I é um local bastante impactado, recebe efluentes de uma cooperativa agroindustrial, além de efluentes domésticos; o ponto II, é um local impactado principalmente devido à descarga de esgoto doméstico e industrial; o ponto III, localizado próximo a um córrego que recebe efluentes de uma fábrica de baterias. Foi utilizado como local de referência à estação de piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, onde os tanques estão livres de contaminantes, neste local foi realizada uma coleta em setembro de 2003. Um total de 145 lambaris (massa: $19,25 \pm 6,96$ g; comprimento total: $10,52 \pm 1,27$ cm) foram coletados nos 3 pontos e na referência, utilizando-se equipamentos de pesca artesanal (tarrafas, puçás, redes de espera e peneiras). Os peixes capturados, após serem sacrificados por secção medular, foram pesados e medidos e o rim (porção anterior e posterior) foi retirado com auxílio de material de dissecação.



Fig. 1. Mapa mostrando a região do município de Londrina, Estado do Paraná, onde foram realizadas as coletas no alto ribeirão Cambé (I, II e III são os pontos de coleta).

Determinação dos metais e matéria orgânica na água e sedimento

Em cada local de amostragem foram determinados os seguintes parâmetros físicos e químicos da água: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade. Nos pontos I, II e III foram coletadas amostras de água (3 L) e sedimento (50 g) para a determinação da concentração de metais e matéria orgânica. As amostras de água que foram destinadas às análises de metais foram fixadas com ácido clorídrico e resfriadas.

Para análise de metais na água e sedimento, as amostras foram inicialmente concentradas e mantidas refrigeradas (4°C) até o momento da leitura. As análises da concentração de metais (cromo, cobre, zinco, níquel, alumínio e cobalto) foram

realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica (Varian, Spectr AA-10 plus) em triplicatas.

Para a determinação da matéria orgânica foi utilizado o método gravimétrico, sendo o material resultante da filtração das amostras de água (500 mL) e o sedimento (2 g) incinerados em mufla por 1 hora a 400°C e as análises feitas em triplicatas.

Análise histopatológica

O rim (porção anterior e posterior) foi fixado em Bouin (12h) e incluído em parafina. Os cortes de 5 μm foram corados com hematoxilina e eosina para descrição morfológica em microscópio de luz comum. Foram analisados 10 cortes para cada animal. As alterações histopatológicas foram avaliadas semiquantitativamente de duas formas: a) Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger *et al.* (1997). Para tanto, atribuiu-se um valor numérico para cada animal conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração histopatológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão); b) Cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), com base na severidade de cada lesão. Para tanto, as alterações foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções renais: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis, adaptado de Poleksic & Mitrovic – Tutundzic (1994). Um valor de IAH foi calculado para cada animal através da fórmula: $IAH = 10^0 \Sigma I + 10^1 \Sigma II + 10^2 \Sigma III$, sendo I, II e III correspondente ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente. O valor médio de IAH foi dividido em 5 categorias por Poleksic & Mitrovic- Tutundzic (1994): 0-10 = funcionamento normal do rim; 11-20 = danificação leve para moderada do rim; 21-50 = modificação moderada para severa do rim; 51-100 = modificação severa do rim; maior que 100 = danificação irreparável do rim. Este índice permitiu a comparação da severidade das lesões renais entre os peixes coletados nos diferentes locais.

Análise do tecido interrenal

Dos 145 animais 51 foram submetidos à análise morfológica do tecido interrenal, sendo oito peixes da referência, sete peixes do ponto I, vinte e dois peixes do ponto II e quatorze peixes do ponto III. De uma lâmina do rim anterior de cada peixe, dez áreas com células interrenais foram fotografadas por uma câmara digital (Motic Cam). De cada foto, 6 células foram analisadas, medindo-se a área da célula e do núcleo (μm^2) e o diâmetro do núcleo (μm), utilizando-se o software Motic 2000. Com estes dados calculou-se, para cada célula, a razão da área do núcleo/área da célula.

Análise estatística

Os resultados (médias \pm DP) de VMA e IAH e das dimensões das células interrenais obtidos para os animais de cada local estudado, foram comparadas entre si utilizando-se análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltiplas (SNK), sendo considerados significativos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados referentes ao pH, temperatura, OD e condutividade da água, determinados para cada local, assim como, as medidas de matéria orgânica da água e do sedimento e metais no sedimento, estão apresentadas na Tabela 1. Os locais amostrados não apresentaram valores críticos de OD (menores que $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Entretanto, notou-se que no ponto II, o valor de OD foi baixo. Todos os locais apresentaram valores de condutividade acima de $100 \mu\text{s.cm}^{-1}$.

Os pontos I e II apresentaram valores de matéria orgânica no sedimento maiores que o ponto III. As concentrações mais elevadas dos metais analisados no sedimento foram observadas nos pontos I e II. As análises de metais na água dos locais amostrados apresentaram resultados abaixo do limite de detecção do aparelho, não sendo, portanto apresentados na tabela.

Tabela 1. Valores médios de pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura, condutividade, concentração de matéria orgânica na água e sedimento e metais no sedimento dos locais de coleta.

Local	Parâmetros físicos e químicos da água				Matéria orgânica		Metais no sedimento (mg.kg ⁻¹)					
	O.D. mg.L ⁻¹	Temp °C	pH	Cond uS.cm ⁻¹	H ₂ O mg.dL ⁻¹	Sed mg.g ⁻¹	Al	Ni	Cu	Zi	Cr	Co
I	7,73	20,86	7,59	232	0,004	110	2048	5,5	55,3	44	4,0	1,0
II	4,59	22,26	7,41	160	0,004	95	2076	5,3	68,3	119	4,3	0,7
III	6,92	19,70	7,58	177	0,003	26	876	1,5	13,5	24	1,8	0,3

Análise histopatológicas

A não ser pela presença de degeneração hialina em algumas células do epitélio tubular e de oclusão da luz tubular em alguns túbulos, os peixes da referência não apresentaram muitas alterações morfológicas no rim. Nos peixes coletados nos pontos I, II e III foi observado vacuolização citoplasmática (Fig. 4), associada com degeneração granular e hialina e necrose nos túbulos proximais e distais (Fig. 2). Também foi observado nos peixes destes locais, dilatação dos capilares do glomérulo (Fig. 3a), que levou a um aumento do glomérulo, que resultou na redução do espaço da cápsula de Bowman (Fig. 3a) e na presença de hemácia no espaço de Bowman (Fig. 3a). Algumas vezes também foi observado um grande acúmulo de sangue no capilar do glomérulo e no espaço de Bowman que foi chamado de hemorragia. Outras alterações como oclusão da luz tubular (Fig. 2), hipertrofia do núcleo (Fig. 4) e hipertrofia celular dos túbulos, rompimento das células dos túbulos, desarranjo das células dos túbulos (Fig. 4), degeneração tubular, regeneração tubular (Fig. 2b) e presença de novos néfrons (Fig. 3b), também foram observados no rim dos lambaris dos pontos I, II e III. As alterações observadas foram classificadas quanto ao grau de severidade e comprometimento da função

renal, conforme mostra a Tabela 2. Foram observadas alterações de estágio I, II e III.

Tabela 2. Classificação das alterações histológicas do rim quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem, modificado de Poleksić & Mitrović-Tutundžić (1994).

Alterações Histológicas Renal	Estágio
1. Alterações tubulares	
▪ Degeneração granular	I
▪ Hipertrofia celular	I
▪ Hipertrofia nuclear	I
▪ Vacuolização celular	I
▪ Dilatação da luz tubular	I
▪ Túbulos em regeneração	I
▪ Rompimento celular	II
▪ Degeneração hialina	II
▪ Oclusão da luz tubular	II
▪ Degeneração tubular	II
▪ Novos néfrons	II
2. Alterações glomerulares	
▪ Dilatação dos capilares	I
▪ Espessamento do endotélio capilar	I
▪ Aumento do volume glomerular	I
▪ Redução do espaço de Bowman	II
▪ Presença de hemácias no espaço de Bowman	II
▪ Extravasamento de sangue no espaço de Bowman (hemorragia)	II
3. Necrose	
▪ Necrose focal	III

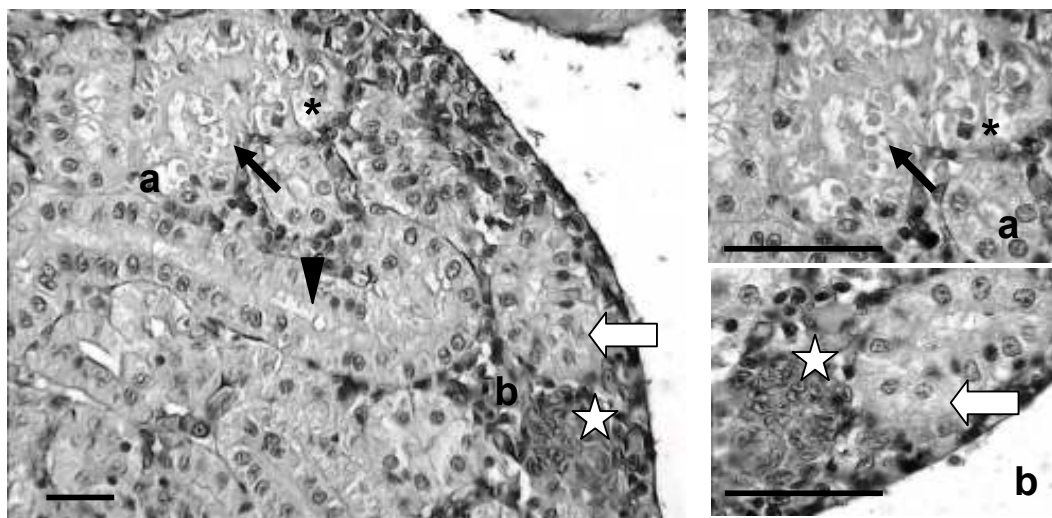


Fig. 2. Fotomicrografia do rim de *Astyanax altiparanae* coletado no ponto II. Notam-se várias lesões nos túbulos. Necrose (asterisco); degeneração hialina (seta); degeneração granular (seta branca), oclusão da luz tubular (cabeça da seta) e regeneração tubular (estrela). (a) detalhe da necrose e (b) detalhe da regeneração tubular e degeneração granular. Escala da barra = 25 μ m. H & E.

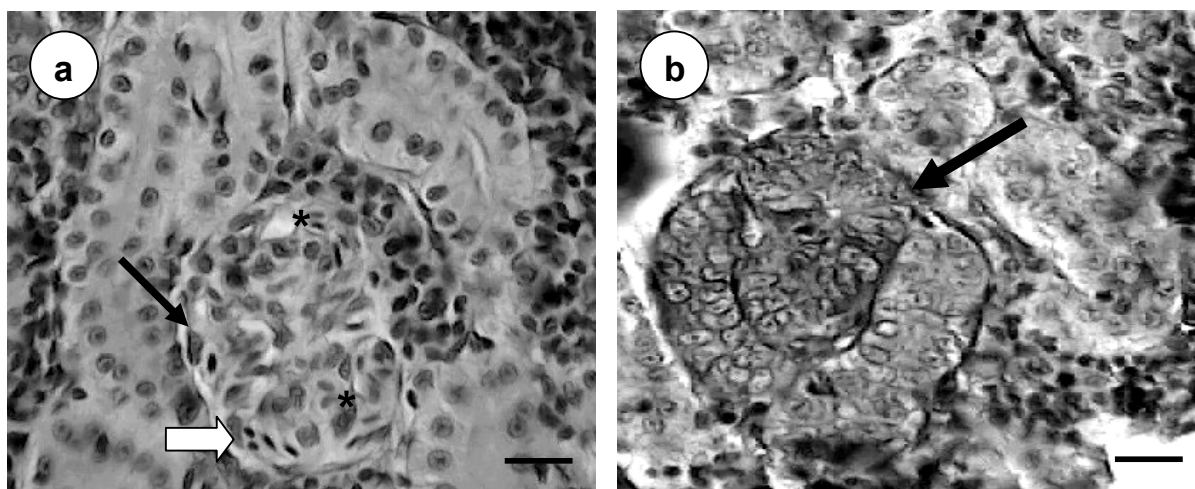


Fig. 3. Fotomicrografia do rim de *Astyanax altiparanae* coletados no ponto I. (a) Corpúsculo renal com alterações patológicas. Nota-se dilatação dos capilares do glomérulo (asterisco), que resultou na redução do espaço da cápsula de Bowman (seta) e na presença de hemácia no espaço de Bowman (seta branca). (b) Novo néfron desenvolvido (seta). Escala da barra = 25 μ m. H & E.

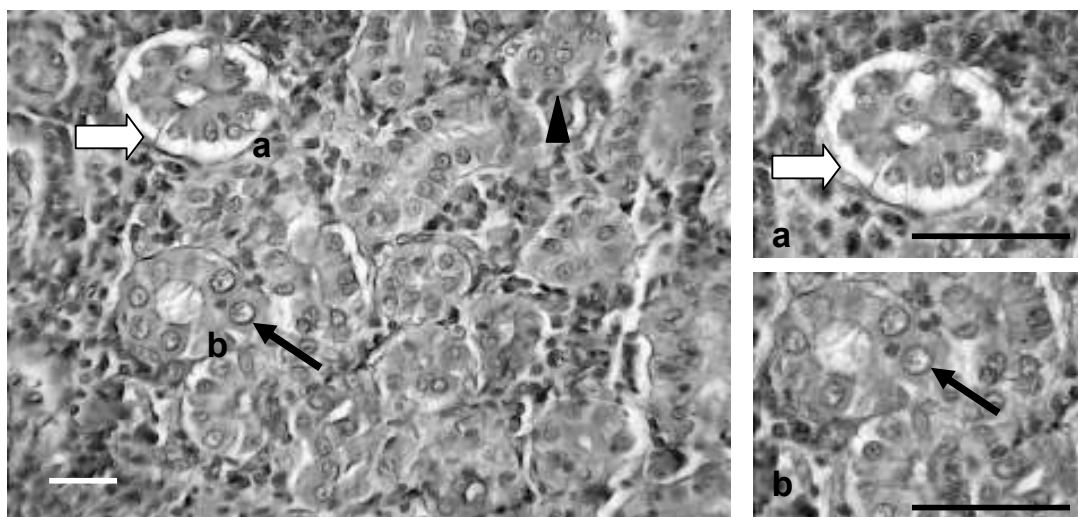


Fig. 4. Fotomicrografia do rim de *Astyanax altiparanae* coletado no ponto III. Nota-se várias lesões nos túbulos. Vacuolização citoplasmática das células epiteliais do túbulo distal (seta branca); hipertrofia nuclear das epiteliais do túbulo distal (seta) e desarranjo das células epiteliais dos túbulos (cabeça da seta). (a) detalhe da vacuolização citoplasmática e (b) detalhe da hipertrofia nuclear das epiteliais do túbulo distal. Escala da barra = 25 μ m. H & E.

Os valores de VMA calculados para os peixes dos pontos I, II e III e da referência permaneceram entre 2 e 3 (Fig. 5a), indicando a incidência de lesões de moderada para amplamente distribuídas pelo rim. Entretanto, os 3 pontos se diferenciaram da referência, pois os valores de VMA obtidos foram significativamente maiores ($F=10,29$; $P<0,001$).

Os pontos I, II e III também se diferenciaram do local de referência em relação ao índice de alterações histopatológicas (IAH). Os valores obtidos para os animais dos 3 pontos de coleta foram significativamente maiores ($F=8,93$; $P<0,001$) do que os valores de IAH dos animais da referência (Fig. 5b). O IAH dos animais da referência foi de $38,22 \pm 9,38$, o que indicou a ocorrência de alterações de estágio I e algumas de estágio II. Já os valores de IAH obtidos para os pontos I, II e III ($109,68 \pm 53,34$; $98,44 \pm 49,33$ e $129,48 \pm 55,33$, respectivamente), indicando uma maior ocorrência de alterações de estágio II e de estágio III, que são mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão sendo algumas irreversíveis.

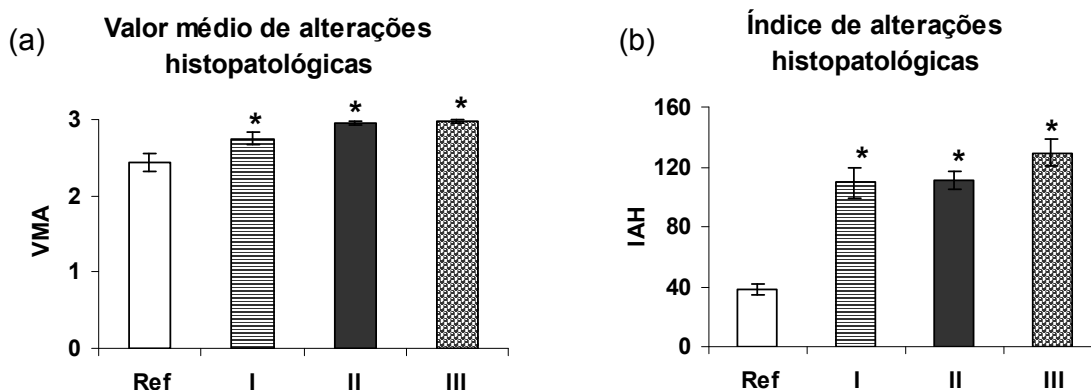


Fig. 5. (a) Valor médio de alterações histopatológicas e (b) Índice de alterações histopatológicas. As barras representam as médias e a linha vertical o erro padrão. O * indica valor significativamente diferente da referência ($P < 0,001$).

Descrição e análise morfométrica das células interrenais

O rim anterior de *A. altiparanae* é composto de lobos bilaterais fundidos localizados anteriormente a bexiga natatória e ventrolateralmente a coluna vertebral (Fig. 6). Este órgão contém os tecidos interrenal, cromafins e linfóide (Fig. 7a e 7b). O tecido interrenal está associado com a veia cardinal posterior e seus ramos. As células interrenais não apresentam uma forma definida. Estas células podem ser cilíndricas, poligonais ou ovóides. Quando coradas com HE, o citoplasma é eosinófilo aparentemente homogêneo, enquanto o núcleo é quase sempre redondo e basófilo com nucléolo evidente (Fig. 7c). As células interrenais dos peixes dos pontos I, II e III apresentaram vacuolização citoplasmática e hipertrofia nuclear e celular (Fig. 7c e d).

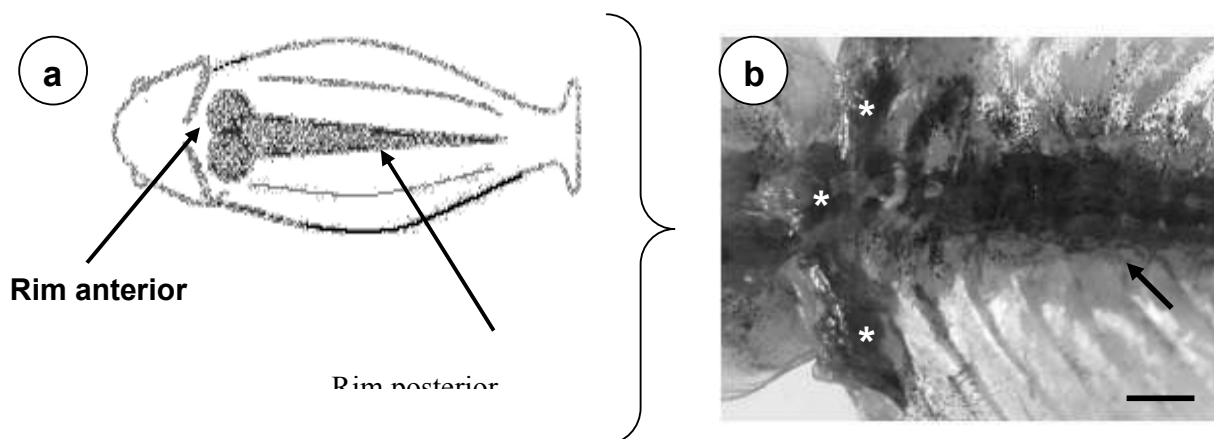


Fig. 6. Localização do rim em *Astyanax altiparanae*. (a) esquema da localização do rim e (b) Fotomicrografia do rim anterior (asterisco) e rim posterior (seta). Escala barra = 0,3 cm.

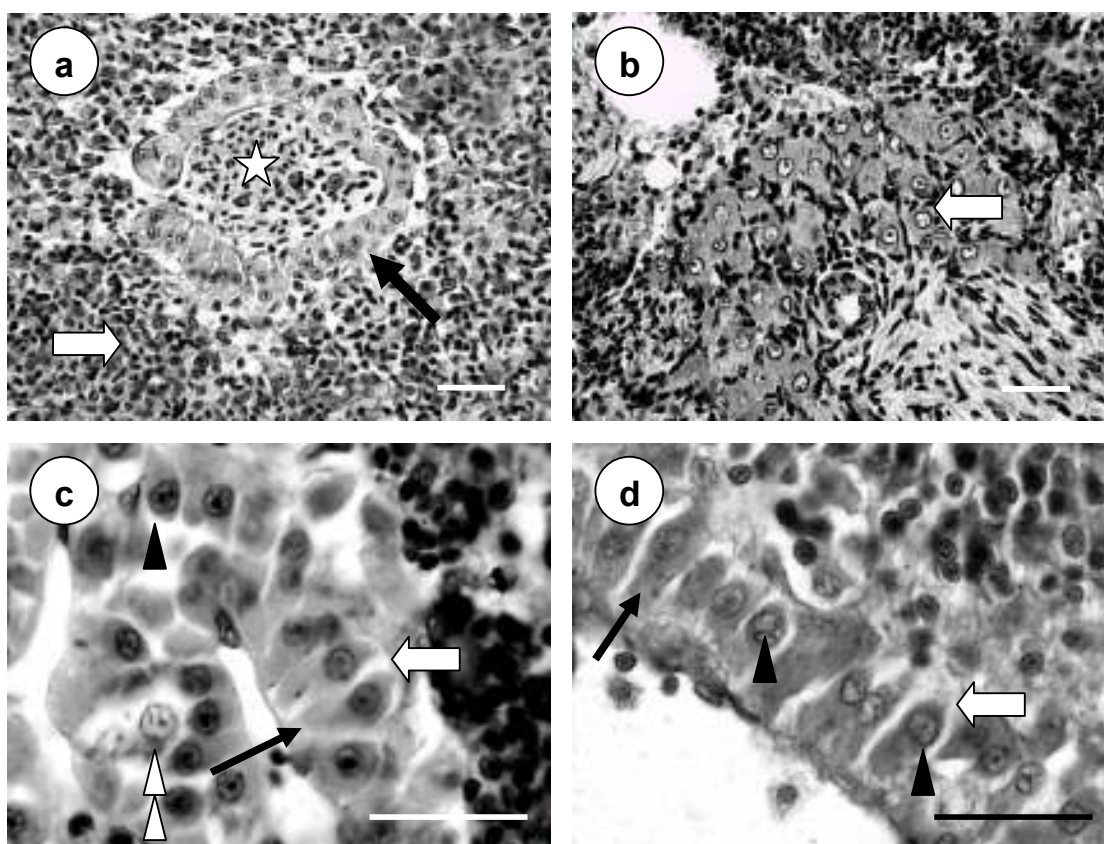


Fig. 7. Fotomicrografia do rim anterior de *A. altiparanae* coletado na referência (a e b) e nos ponto I e III (c e d). (a) Tecido interrenal dos animais da referência (seta), tecido linfóide (seta branca) e eritrócitos (estrela); (b) células cromafins (seta); (c) célula cromafim (dupla seta); (c) e (d) células interrenais com hipertrofia nuclear (cabeça da seta) e celular (seta) e vacuolização citoplasmática (seta branca). Escala barra = 25 μ m. H&E.

A análise morfométrica das células interrenais indicou que as médias da área da célula e do núcleo, e do diâmetro do núcleo, obtidas para os peixes coletados nos pontos I, II e III foram significativamente maiores que dos peixes da referência (F= 6,59; 5,37; 11,21; respectivamente; $P < 0,001$). A razão área do núcleo/área da célula foi significativamente menor nos peixes coletados no ribeirão Cambé ($P < 0,001$), em relação à referência (Fig. 8).

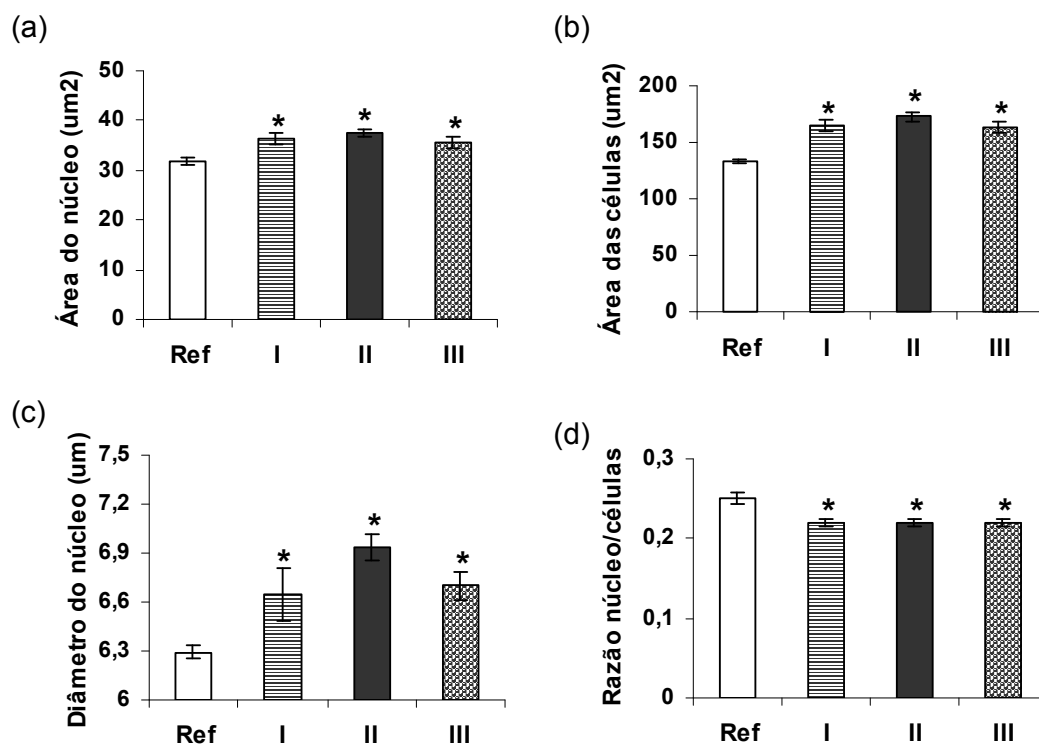


Fig. 8. Análise morfométrica das células interrenais do rim anterior de *A. altiparanae* coletados nos pontos I, II e III e na referência. (a) Áreas celulares. (b) Áreas nucleares dessas células. (c) Diâmetro nuclear dessas células. (d) Cálculo da razão: núcleo/célula. As barras representam as médias e a linha vertical o erro padrão. * indica valor significativamente diferente daquele obtido para os animais da referência ($P < 0,001$).

DISCUSSÃO

A análise físico-química tem sido empregada para avaliar a qualidade da água. A temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade são freqüentemente utilizados para avaliar a poluição da água, assim como os dados de matéria orgânica e metais na água e no sedimento (MacDonald *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 2003).

Dentre os locais amostrados, o ponto II apresentou o menor valor de OD ($4,6 \text{ mgL}^{-1}$), o que provavelmente tem relação com uma maior demanda por oxigênio na água nesse local. Entretanto, nenhum dos locais amostrados apresentou valores de OD considerados críticos (menores que $4,0 \text{ mg O}_2\text{L}^{-1}$). Valores de condutividade acima de $100 \mu\text{s.cm}^{-1}$, como observado nos pontos I e II, têm sido relatados para locais muito impactados (CETESB, 2001) e podem refletir uma diminuição na qualidade da água (Olsen *et al.*, 2001).

No presente estudo, apenas os valores encontrados para o cobre nos pontos I e II foram maiores que a concentração limite (CL) para este metal, porém menores que a concentração de efeito provável (CE), ou seja, valor acima do qual os efeitos tóxicos do cobre são esperados (MacDonald *et al.*, 2000). Os valores encontrados para cromo, níquel e zinco no sedimento de todos os locais de coleta, foram menores que as concentrações limites (CL) para estes metais (MacDonald *et al.*, 2000), ou seja, concentrações abaixo das quais os efeitos tóxicos dos metais para os organismos são pouco prováveis. Tais resultados classificam o sedimento dos locais de coletas como não tóxicos para organismos vivos em relação aos metais presentes.

Não se tem determinado os valores de CL e CE para o cobalto e o alumínio, o que dificulta a análise desses metais. Para o alumínio, entretanto, as altas concentrações encontradas podem ser reflexo das características naturais do solo da região de Londrina. Como o pH da água do ribeirão Cambé tende a ser mais básico que ácido, e praticamente não sofre variação sazonal, muito pouco desse metal deve estar disponível, já que o alumínio tem sua toxicidade aumentada em águas ácidas (Barcarolli & Martinez, 2004).

Este estudo enfatiza o uso da análise histopatológica para avaliar os possíveis efeitos de contaminantes no rim, em uma espécie de peixe, coletado em um ribeirão urbano. As alterações histopatológicas dos lambaris dos pontos I, II e III, foram claramente diferentes dos lambaris da referência em relação ao tipo, a severidade e a quantidade das lesões observadas na porção posterior do rim. As lesões encontradas nos animais da referência foram alterações leves, como a degeneração granular nas células epiteliais dos túbulos, enquanto que lesões encontradas nos animais dos pontos I, II e III foram mais severas e em alguns casos irreversíveis, como a necrose nas células epiteliais dos túbulos. Estes resultados são semelhantes

às conclusões de Schwaiger *et al.* (1997) ao coletar peixes da espécie *Barbatula barbatula* em dois ribeirões alemães impactados com pesticidas e metais pesados.

Os tipos de lesões histopatológicas observados nesse estudo indicam os possíveis efeitos dos agentes tóxicos presentes na água e no sedimento do ribeirão Cambé. Uma alta incidência de vacuolização citoplasmática, associada com degeneração granular e hialina e necrose nos túbulos proximais e distais foi observada nos peixes coletados neste ribeirão. Degeneração granular e hialina foram as alterações que apareceram em maior quantidade nos pontos I, II e III. Estas mudanças degenerativas podem ser o resultado de material tóxico no filtrado glomerular (Meyer & Hendricks, 1985; Rand, 1995). Na degeneração granular, que pode ocorrer no epitélio dos túbulos proximais e distais, a célula epitelial sofre hipertrofia, o citoplasma exibe alguns grânulos, o contorno celular não pode ser visto claramente e o calibre do lúmen diminui (Takashima & Hibiya, 1995; Rand, 1995). Na degeneração hialina ocorrem grânulos eosinófilos no citoplasma das células do túbulo renal, estes grânulos são de tamanhos irregulares e seu acúmulo pode levar a necrose. Os grânulos podem ser produzidos sozinhos dentro das células ou formados pela reabsorção excessiva de substâncias protéicas, filtradas através de glomérulos danificados (Hinton & Laurén, 1990; Takashima & Hibiya, 1995). Injúrias celulares podem resultar na queda do nível de ATP intracelular, que por sua vez compromete a bomba de cátion da célula, permitindo o influxo de sódio, cloreto, cálcio e água, com conseqüente aumento do volume celular e prejuízos para a membrana celular, com efluxo de alguns íons (K^+), enzimas e outras proteínas. Muitas dessas mudanças degenerativas na célula são reversíveis (Meyer & Hendricks, 1985; Hinton & Laurén, 1990; Takashima & Hibiya, 1995; Rand, 1995). Estes tipos de alterações celulares também foram observados em *Oncorhynchus tshawytscha* injetado com eritromicina (Kiryu & Moffitt, 2001), em *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de triclorfon (Veiga *et al.*, 2002) e em *Salmo trutta* e *Barbatula barbatula* mantidos em gaiolas em dois riachos alemães contaminados com pesticidas, bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) e metais (Gernhofer *et al.*, 2001).

O acúmulo de grânulos eosinófilos no citoplasma da célula (degeneração hialina) também pode resultar em necrose (Takashima & Hibiya, 1995). Neste trabalho, a maioria dos lambaris coletados nos três pontos do ribeirão Cambé apresentou degeneração hialina seguida de necrose, entretanto um número maior

de peixes do ponto III teve suas células necrosadas. Degeneração hialina seguida de necrose também foi observada em *Oncorhynchus tshawytscha* injetado com eritromicina (Kiryu & Moffitt, 2001), em peixes da espécie *Barbatula barbatula* coletados em dois ribeirões alemães impactados com pesticidas e metais pesados (Schwaiger *et al.*, 1997) e em *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de triclorfon (Veiga *et al.*, 2002).

Uma das etapas do processo de degeneração celular pode ser a hipertrofia nuclear e/ou citoplasmática das células epiteliais dos túbulos renais, onde as células apresentam-se com formas e tamanhos irregulares. Os lambaris coletados nos pontos I, II e III apresentaram uma maior frequência destas alterações que os animais coletados no local de referência. Estas alterações também foram observadas em peixes da espécie *Barbatula barbatula* coletados em dois ribeirões alemães impactados com pesticidas e metais pesados (Schwaiger *et al.*, 1997), em *Trichomycterus brasiliensis* exposto por doze horas ao mercúrio orgânico (Oliveira Ribeiro, *et al.*, 1996) e em *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de inseticida (Veiga *et al.*, 2002).

O acúmulo de certos materiais no lúmen dos túbulos proximais ou distais pode levar à oclusão da luz tubular, assim como o aumento no volume das células epiteliais pode resultar na redução do lúmen levando ao estreitamento da luz tubular (Takashima & Hibiya, 1995). Estes tipos de alterações prejudicam a passagem do filtrado, além de comprometer o processo de reabsorção e secreção tubular (Meyer & Hendricks, 1985; Hinton & Laurén, 1990). Assim como as outras alterações citadas, estas também ocorreram em maior quantidade nos lambaris coletados nos pontos I, II e III. Estas alterações também foram observadas em peixes da espécie *Barbatula barbatula* coletados em dois ribeirões alemães impactados com pesticidas e metais pesados (Schwaiger *et al.*, 1997) e em carpa com a doença de “sekoke” e tratada com aloxan (Takashima & Hibiya, 1995).

Em virtude de o rim ser um órgão que recebe grande fluxo sangüíneo a presença de compostos químicos no sangue no rim pode levar a algumas mudanças patológicas na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal, levando a redução do espaço de Bowman. Além disso, pode ocorrer o aparecimento de células sangüíneas ou agregados de células sangüíneas ou de matéria estranha no espaço de Bowman (Hinton *et al.*, 1992; Takashima & Hibiya, 1995). Às vezes o excesso de hemácias nos capilares pode

levar ao rompimento destes vasos e, neste caso, é comum encontrar hemácias no espaço de Bowman (Takashima & Hibiya, 1995). Neste trabalho, os lambaris coletados nos pontos I, II e III, foram os que apresentaram maior incidência destas alterações, que refletem condições anômalas do corpúsculo renal (Meyer & Hendricks, 1985; Hinton & Laurén, 1990). Alterações no corpúsculo renal, como dilatação dos capilares do glomérulo, aumento do espaço de Bowman e degeneração glomerular foram encontradas em *Anguilla anguilla* exposta a diferentes concentrações da resina ácida e a efluente de fábrica de papel e celulose (Pacheco & Santos, 2002). Redução do espaço de Bowman também foi encontrada em *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de inseticida (Veiga *et al.*, 2002), em *Salmo trutta* e *Barbatula barbatula* mantidos em gaiolas em dois riachos alemães contaminados com pesticidas, PCB, PAH e metais (Gernhofer *et al.*, 2001) e em *Trichomycterus brasiliensis* exposto por quatro horas ao mercúrio orgânico (Oliveira Ribeiro, *et al.*, 1996).

A recuperação de algumas alterações renais é caracterizada pela restauração da aparência e função normal do tecido, devido à proliferação de tipos celulares específicos (Meyer & Hendricks, 1985). Túbulos renais pré-existentes podem ser freqüentemente regenerados após serem danificados por algumas doenças (Takashima & Hibiya, 1995). Segundo Hinton & Laurén (1990) a regeneração tubular em peixes pode ser uma boa indicação de adaptação e recuperação. Neste trabalho, no rim dos lambaris dos três locais de amostragem, foram observados túbulos em regeneração. Regeneração tubular também foi observada em *Oncorhynchus tshawytscha* injetado com eritromicina (Kiryu & Moffitt, 2001).

Após dano renal induzido por agentes tóxicos, pode haver a produção de néfrons inteiramente novos. Normalmente o rim dos peixes contém aglomerados de células basófilas localizados no interstício, freqüentemente próximos ao ducto coletor. Induzidos por compostos químicos estes aglomerados podem desenvolver-se em novos néfrons (Reimschuessel, 2001; Takashima & Hibiya, 1995). O novo néfron demora várias semanas para amadurecer, desenvolvendo os segmentos proximal e distal e tornando-se cada vez mais eosinófilo quando se distinguem as células do estágio adulto (Cormier *et al.*, 1995). A presença de novos néfrons em peixes pode indicar que o comprometimento fisiológico destes não está impedindo qualquer regeneração tecidual (Takashima & Hibiya, 1995). Pode-se encontrar novos néfrons em peixes de águas não poluídas, o que difere de um ambiente impactado é

quantidade desta estrutura no animal. Neste estudo, este tipo de estrutura foi encontrado em maior frequência nos lambaris coletados no ribeirão Cambé. Novos néfrons também foram observados em peixes da espécie *Ameiurus nebulosus* e *Microgadus tomcod* coletados em ribeirões contaminados (Cormier *et al.*, 1995) e em *Carrassius auratus* exposto ao hexaclorobutadieno, gentamicina e cloreto de mercúrio e também em *Oncorhynchus mykiss* exposto ao tetracloroetileno (Reimschuessel, 2001).

No presente trabalho, a comparação dos valores de VMA e IAH, mostrou uma maior frequência de alterações no tecido renal de *A. altiparanae* nos 3 pontos do ribeirão Cambé, indicando que estes locais estão impactados, provavelmente devido à presença de poluentes, acúmulo de matéria orgânica e nutriente, e que os peixes que vivem neste ambiente estão expostos a um estresse crônico.

Embora a resposta ao estresse em teleósteos esteja especificamente relacionada com a liberação do cortisol, poucos estudos têm sido realizados utilizando a análise histológica dos tecidos interrenal e cromafim (Gundersen, *et al.*, 2000). As células interrenais são homólogas ao córtex da adrenal dos mamíferos e responsáveis pela síntese dos corticosteróides, principalmente o cortisol (Donaldson, 1981; Wendelaar Bonga, 1997; Hontela, 1998). Alguns estudos mostraram que parâmetros histológicos das células interrenais são bons indicadores de estresse crônico (Donaldson, 1981; Norris *et al.*, 1997; Hontela *et al.*, 1997). A determinação da hipertrofia das células interrenais pode ser uma boa ferramenta para avaliação do nível de estresse crônico que uma população de peixe é exposta (Norris *et al.*, 1997).

Neste trabalho, a análise morfométrica das células interrenais mostrou que os peixes dos pontos I, II e III apresentaram um aumento na área da célula e do núcleo e no diâmetro do núcleo das células interrenais, quando comparado com a referência. Entretanto, das três medidas, a área da célula foi a que mais aumentou, enquanto a área e o diâmetro do núcleo tiveram um aumento em torno de 15%, a área da célula teve um aumento em torno de 30% em relação à referência. Este aumento deve estar relacionado com a hiperatividade desta célula, induzida provavelmente pela presença de poluentes, ou seja, pode ser um indicativo da estimulação crônica do eixo HPI (hipotálamo-hipófise-células interrenais) (Norris *et al.*, 1997). A hipertrofia das células interrenais se deu provavelmente porque quando estas são estimuladas suas mitocôndrias tornam-se maiores e mais numerosas e

formam ribossomos centrais e cristas vesiculares que levam a um aumento no tamanho destas células. Donaldson (1981) também relatou um aumento no diâmetro do núcleo das células interrenais de salmonídeos expostos a uma variedade de contaminantes. O aumento no diâmetro e na área do núcleo das células interrenais também foi observado em exemplares de *Salmo trutta* coletados em local contaminado com metais pesados (Norris *et al.*, 1997). As células interrenais de *Polyodon spathula* apresentaram hipertrofia nuclear e citoplasmática após exposição a PCBs e ao clordano (Gundersen, *et al.*, 2000). Por outro lado, a atrofia das células interrenais, assim como a diminuição da área total ou do núcleo dessas células foram observadas em *Esox lucius* e *Perca flavescens* expostos a BKME, em *Oncorhynchus mykiss* e *Oreochromis mossambicus* expostos e alimentados com PCBs (Hontela *et al.*, 1997; Quabius *et al.*, 2000), indicando uma disfunção endócrina ocorrida nestas espécies de peixes expostas cronicamente a estressores químicos em seu ambiente. Já no presente trabalho constatou-se a estimulação do eixo HPI em resposta ao estresse crônico. Talvez estas diferentes respostas se devam a diferenças na intensidade e no tipo do estressor químico ao qual o peixe está cronicamente exposto.

CONCLUSÃO

A maior incidência de alterações histopatológicas renais nos lambaris coletados no ribeirão Cambé indicam claramente o comprometimento da saúde desses peixes e da qualidade da água deste local. Os tipos de lesões observadas mostram que os peixes estão sofrendo os efeitos dos agentes tóxicos presentes na água e sedimento. Os resultados da análise morfométrica das células interrenais indicam a hiperatividade desta célula e pode ser um indicativo da estimulação crônica do eixo HPI (hipotálamo-hipófise-células interrenais). Assim, constatou-se que as análises histopatológicas e morfométricas do rim são ferramentas sensíveis que podem ser utilizadas como biomarcadores para avaliação da contaminação aquática em programas de monitoramento ambiental.

Agradecimentos

Ao CNPq e a Fundação Araucária pelo auxílio financeiro, a CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado para Silva, A. das G., aos integrantes do Laboratório de Ecofisiologia Animal da UEL, pelo auxílio nas coletas de campo, ao doutor Paulo C. Meletti e ao Programa de Mestrado em Ciências Biológicas do CCB/UEL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 72(3), p. 639 – 646, 2004.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. **2000. (2v) Série Relatórios/CETESB, São Paulo: 2001.**

1. COMIER, S. M.; NEIHEISEL, T. W.; WERNING, P.; RACINE, R. N.; REIMSCHUESSEL, R. New nephron development in fish from polluted waters: a possible biomarker. **Ecotoxicology**, n. 4, p. 156-168, 1995.

DONALDSON, E. M. The pituitary-interrenal axis as indicator of stress in fish. In: PICKERING, A. D. (Editor). **Stress and fish**. Academic Press, 1981. cap. 2, p. 11 – 47.

2. EVANS, D. H. **The Physiology of Fishes**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

GERNHOFER, M.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M.; MULLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. V. 8, p. 241 – 260, 2001.

GUNDERSEN, D. T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S. D. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordanes-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 19 (9), p. 2275-2285, 2000.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, n. 8, p. 51- 66, 1990.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic

Biomarkers. In: HUGGETT R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE Jr, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 –196.

HONTELA, A.; DANIEL, C. RASMUSSEN, J. B. Structural and functional impairment of the hypothalamo – pituitary – interrenal axis in fish exposed to bleached Kraft Mill effluent in the St Maurice River, Québec. **Ecotoxicology**. v. 6, p. 1-12, 1997.

HONTELA, A. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, n.1, p44 – 48, 1998.

KIRYU, Y.; MOFFITT, C. M. Acute LD₅₀ and kidney histopathology following injection of erythromycin (Erythri-200) and its carrier in spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**. V.24, p. 409 – 416, 2001.

MacDONALD, D. D.; INGERSOLL, C. G.; BERGER, T. A. Development and evaluation of consensus – based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 39, p. 20 – 31, 2000.

MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. (Org.). **Limnologia Fluvial - Um Estudo no Rio Mogi-Guaçu**. São Carlos, 2003, p. 149-180.

MEYERS, T. R.; HENDRICKS, J.D. **Histopathology**. IN: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Editores). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere Publishing Corporation, Washington: p. 283-331, 1985.

NORRIS, D. O.; FELT, S. B.; WOODLING, J. D.; DORES, R. M. Immunocytochemical and histological differences in the interrenal axis of feral Brown trout, *Salmo trutta*, in metal – contaminated waters. **General and Comparative Endocrinology**, v. 108, p. 343 – 351, 1997.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FANTA, E.; TURCATTI, N. M.; CARDOSO, R. J.; CARVALHO, C.S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). **Biocell**. V. 20 (3), p. 171 – 178, 1996.

OLSEN, T.; ELLERBECK, L.; FISHER, T.; CALLAGHAN, A.; CRANE, M. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparus* meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.20, n. 8, 1725-1732, 2001.

OVERSTREET, R. M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. **Aquatic Toxicology**, v. 11, p. 213 – 239, 1988.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331 – 347, 2002.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUNDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **The Science of the Total Environmental**, v. 309, 9. 105 –115, 2003.

POLEKSIĆ, V.; MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, 1994. cap. 30, p. 339-352.

QUABIUS, E. S. NOLAN, D. T.; ALINN, C. J.; WENDELAAR BONGA, S. E. Influence of dietary exposure to polychlorinated biphenyl 126 and nutritional state on stress response in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, USA: v. 19, n.12, p. 2892-2899, 2000.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, 2.ed.1995.

REIMSCHUESSEL, R. A fish model of renal regeneration and development. **Ilar Journal**, v.42, p. 285 – 291, 2001.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 231 – 240, 2001.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology normal and pathological features**. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, 1995.

TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51 – 70, 1997.

VEIGA, M. L.; RODRIGUES, E. L.; PACHECO, F. J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45 (2), p. 171 – 175, 2002.

WENDELAAR BONGA, S. E. The Stress Response in Fish. **Physiological Review**, E.U.A., v. 77, n. 3, p. 591- 620, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, P. D. Toxic of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). **Journal Fish Biol.**, v. 9, p. 441-446, 1976.

ALMEIDA, J. S. **Avaliação da qualidade do sedimento do ribeirão Cambé (Londrina, PR) por meio de parâmetros funcionais de curimbas (*Prochilodus lineatus*)**. 2001. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

AMORIM, P. K.; AYALA, C. O.; FÉLIX, F. C.; RINGOLIN de SÁ, O.; FENERICH-VERANI, N. O Fígado do Bagre *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) como Biomarcador da Contaminação do Agrotóxico Omite. In: ENCONTRO DE ECOTOXICOLOGIA, 6., São Carlos, 2000. **Anais**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, p.78.

ANDERSON, D. P.; ZEEMAN, M. G. Immunotoxicology in Fish. In: RAND, G. M. (Editor). **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects: environmental fate and risk assessment**. 2. ed.: Taylor & Francis, 1995. p. 345-369.

BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 72(3), p. 639 - 646, 2004.

BARTON, B. A. Salmonid fish differ in their Cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**. v. 62, n. 1, 12 -18, 2000.

BERTACO; V. A.; LUCENA, Z. M. S.; BECKER, F. G. Variação espacial e temporal na abundância de *Astyanax bimaculatus* e *Astyanax fasciatus* (Characidae) no Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Ser. Zool.**, Porto Alegre, v. 11, p.61-89, 1998.

BERTOLETTI, E. **Ensaio biológicos com organismos aquáticos e suas aplicações no controle da população**. São Paulo: CETESB, 1990.

BROWN, S. B.; DELORME, P. D.; EVANS, R. E.; LYLE LOCKHART, W.; MUIR, D. C. G.; WARD, F. J. Biochemical and histological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 17, n. 5, p. 915 - 921, 1998.

CABALLERO, M. J.; LÓPEZ-CALERO, G.; SOCORRO, J.; ROO, F. J.; IZQUIERDO, M.S.; FERNANDEZ, A. J. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**. v. 179, p. 277 - 290, 1999.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 52, p. 83 - 91, 2002.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. **2000. (2v) Série Relatórios/CETESB, São Paulo: 2001.**

CHANG, S.; ZDANOWICZ, V. S.; MURCHELANO, R.A. Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United States estuaries. **ICES Journal of Marine Science**. v. 55, p. 954 - 969, 1998.

COMIER, S. M.; NEIHEISEL, T. W.; WERNISING, P.; RACINE, R. N.; REIMSCHUESSEL, R. New nephron development in fish from polluted waters: a possible biomarker. **Ecotoxicology**, n. 4, p. 156-168, 1995.

COUTINHO, C.; GOKHALR, K. S. Selected oxidative enzymes and histopathological changes in the gills of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* cultured in secondary sewage effluent. **Wat. Res.**, v. 34, n. 11, p. 2997 - 3004, 2000.

DONALDSON, E. M. The pituitary-interrenal axis as indicator of stress in fish. In: PICKERING, A. D. (Editor). **Stress and fish**. Academic Press, 1981. cap. 2, p. 11 - 47.

EVANS, D. H. **The Physiology of Fishes**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

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

FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds.). **Fish adaptations**. USA: Science Publishers. 2003, c. 9, p. 203 - 231.

GOMINHO, V. C. F. A. **Adaptação do índice de integridade biótica ao ribeirão Cambé, Londrina, região norte do Paraná.** 2000. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GRANEY, R. L.; GIESY, J. P.; CLARK, J. R. Field studies. In: Rand, G.M. (Ed.). RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** Washington: Taylor & Francis, 2.ed.1995, c.9, p. 257-306.

GROMAN, D. B. **Histology of the striped bass.** Bethesda, 1982. 116p.

GUNDERSEN, D. T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S. D.; MILLAR, J. G. BLAZER, V. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl - and chlordane- contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v. 19 (9), p. 2275-2285, 2000.

HANDY, R.D.; PENRICE, W. S. The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comp. Biochemi. Physiol.** v. 106c, n. 3, p. 717 - 724, 1993.

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology.** C.R.C. Press, 1987.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, n. 8, p. 51- 66, 1990.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 -196.

HONTELA, A. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, n.1, p44 - 48, 1998.

HONTELA, A.; DANIEL, C. RASMUSSEN, J. B. Structural and functional impairment of the hypothalamo - pituitary - interrenal axis in fish exposed to bleached Kraft Mill effluent in the St Maurice River, Québec. **Ecotoxicology.** v. 6, p. 1-12, 1997.

HONTELA, A.; DANIEL, C.; RICARD, A. C. Effects of acute and subacute exposures to cadmium on the interrenal and thyroid function in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic Toxicology**, v. 35, p. 171 - 182, 1996.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 455.

JOHNSEN, K.; TANA, J.; LEHTINEN, K. J.; STUTHRIDGE, T.; MATTSSON, J. H.; CARLBERG, G. E. Experimental field exposure of Brown trout to river water receiving effluent from an integrated newsprint mill. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p.184 - 193, 1998.

LACHER JR., T. E.; GOLDSTEIN, M. I. Tropical ecotoxicology: status and needs. **Environmental Toxicology Chemistry**. v.16, p. 100-111, 1997.

LAGOS misturam poluição, problemas, lazer e esporte. **Folha de Londrina**, Londrina, 17 agos. 1999. Caderno cidade.

LANDIS W. G.; YU, MING-HO. **Introduction to environmental toxicology impacts of chemicals upon ecological systems**. Florida: Boca Ration, 1995. p. 328.

LAPPIVAARA, J.; OIKARI, A. Altered challenge response in witefish subchronically exposed um areas polluted by bleached kraft mill effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 43, p. 212-222, 1999.

LEADLEY, T. A.; BALCH, G.; METCALFE, C. D.; LAZAR, R.; MAZAKI, E.; HABOWSKY, J.; HAFFNER, D. G. Chemical accumulation and toxicological stress in three brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) populations of the Detroid River, Michigan, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 17 n.9, p. 1756 - 1766, 1998.

LOWE - Mc CONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. (Tradutores: VAZZOLER, A. E. A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; CUNNINGHAM, P. T. M.) São Paulo: Editora USP. 1999.

KARAN, V.; VTOROVIC, S.; TUTUNDZIC, V.; POLEKSIC, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 49 - 55, 1998.

KIRYU, Y.; MOFFITT, C. M. Acute LD₅₀ and kidney histopathology following injection of erythromycin (Erythri-200) and its carrier in spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**. V.24, p. 409 - 416, 2001.

MacDONALD, D. D.; INGERSOLL, C. G.; BERGER, T. A. Development and evaluation of consensus - based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 39, p. 20 - 31, 2000.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Can. J. Aquatic. Sci.**, v. 42, p. 630-648, 1985.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: 2002. Cap. 29, p. 551 - 577.

MARTINEZ, C. B. R.; SUADICANI, S. O.; FERRONI, E. N.; MOREIRA, G. S. Effect of benzene on the swimming activity of *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea). **Brazilian J. Med. Biol. Res**. V. 25, p. 487 - 490, 1992.

MASON, C. F. **Biology of freshwater pollution**. 3.ed. Londres: Longman, 1996.

MAZON, A. F.; CERQUIERA, C.C.C; FERNANDES, M.N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the south American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research Section A**. v. 88, p. 52 - 63, 2002.

MAYER, F. L.; VERSTEEG, D. J.;McKEE, M. J.; FOLMAR, L. C.; GRANEY, R. L.; McCUME, D. C.; RATTNER, B. A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 -196.

MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. (Org.). **Limnologia Fluvial - Um Estudo no Rio Mogi-Guaçú**. São Carlos, 2003, p. 149-180.

MELLO. M. L. S.; VIDAL, B. C. **Práticas de biologia celular**. São Paulo: Edgard Blücher, 1980.

MEYERS, T. R.; HENDRICKS, J.D. **Histopathology**. IN: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Editores). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere Publishing Corporation, Washington: p. 283-331, 1985.

NORRIS, D. O.; FELT, S. B.; WOODLING, J. D.; DORES, R. M. Immunocytochemical and histological differences in the interrenal axis of feral Brown trout, *Salmo trutta*, in metal - contaminated waters. **General and Comparative Endocrinology**, v. 108, p. 343- 351, 1997.

OJHA, J. Fish gills: potential indicators of ecodegradation of aquatic environments. In: MITTAL, A. K.; EDDY, F. B.; DATTAMUNSHI, J. S. (Editores). **Water/air transition in biology**. E.U.A.: Science Publishers, 1999. cap. 18, p. 263 - 279.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FANTA, E.; TURCATTI, N. M.; CARDOSO, R. J.; CARVALHO, C.S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). **Biocell**. v. 20 n. 3, p. 171 - 178, 1996.

OLSEN, T.; ELLERBECK, L.; FISHER, T.; CALLAGHAN, A.; CRANE, M. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparus* meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**. V.20, n. 8, 1725-1732, 2001.

OVERSTREET, R. M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. **Aquatic Toxicology**, v. 11, p. 213 - 239, 1988.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331 - 347, 2002.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUNDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **The Science of the Total Environment**. v. 309, 9. 105 -115, 2003.

PARIS-PALÁCIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of cooper sulfate. **Aquatic Toxicology**. v. 50, p.109-124, 2000.

PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**. v. 1, n.15, p. 1 - 60, 1995.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, 1994. cap. 30, p. 339-352.

QUABIUS, E. S. et al. Influence of dietary exposure to polychlorinated biphenyl 126 and nutritional state on stress response in tilapia (*Oreochromus mossambicus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, USA: v. 19, n.12, p. 2892-2899, dec. 2000.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, 2.ed.1995.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.

RANKIN, J. C.; STAGG, R. M.; BOLIS, L. Effects of pollutants on gills. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. (Editores). **Gills**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. p. 207-219.

REIMSCHUESSEL, R. A fish model of renal regeneration and development. **Ilar Journal**. V.42, p. 285 - 291, 2001.

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDONEZ, F. J.; ROSETY, J. M.; ROSETY, I.; RIBELLES, A.; CARRASCO, C. Morpho - histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 223 - 228, 2002.

SANTOS, R. B. **Degradação ambiental na bacia do ribeirão Cambézinho em Londrina - contaminação patogênica**. 1984. Monografia (Bacharel em Geografia) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

SCHMIDT - NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5.ed. São Paulo: Santos, 1996. p. 600.

SCHWAIGER, J. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 231 - 240, 2001.

SILVA, A. G. **Análise de parâmetros morfológicos de curimbas, *Prochilodus lineatus*, submetidos a testes *in situ*, para o monitoramento ambiental.** 2001. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA, M. N. CUNHA BASTOS, V. L. F.; ALVES, M.V.; CUNHA BASTOS, J. Validação de espécies sentinelas par biomarcação com colinesterase em peixes. In: ESPINDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A. L. (Eds). **Ecotoxicologia: perspectiva para o séc. XXI.** São Carlos: RIMA, 2000. p.147 - 164.

SLOMAN, K. A.; TAYLOR, A. C.; METCALFE, N. B.; GILMOUR, K. M. Effects of na environmental pertubation on the social behaviour and physiological function of brown trout. **Journal Animal Behaviour**, v.61, p. 325 - 333, 2001.

SOUSA, F. A. **Processos erosivos - bacia do ribeirão Cambé Londrina- PR.** 1990. Monografia (Bacharel em Geografia) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

SPACIE, A.; HAMELINK, J. L. Bioaccumulation: In: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** Washington: Taylor & Francis, 2.ed. 1995, appendix D, p. 1052-1082.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia.** São Paulo: Manole Ltda, 1995.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology normal and pathological features.** 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, 1995.

TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51 - 70, 1997.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**. v. 121, p. 307 - 320, 2003.

VEIGA, M. L.; RODRIGUES, E. L.; PACHECO, F. J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V. 45 (2), p. 171 - 175, 2002.

VAZZOLER, A. E. A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EdUEM, 1996, 196p.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, 1996.

WENDELAAR BONGA, S. E. The Stress Response in Fish. **Physiological Review**, E.U.A., v. 77, n. 3, p. 591- 620, 1997.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. dos R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 507 - 514, 2001.

WINKALER, E. U. **Biomarcadores bioquímicos e fisiológicos de curimbas (*Prochilodus lineatus*) submetidos a testes *in situ* em ribeirões do município de Londrina , Paraná**. 2001. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. Determinação de metais pesados como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 551-556, 1998.