

Karina Fernandes Oliveira Rezende

Alterações morfológicas de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)
(Linnaeus, 1758) expostas às águas da Represa Billings

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2011

Karina Fernandes Oliveira Rezende

Alterações morfológicas de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)
(Linnaeus, 1758) expostas às águas da Represa Billings

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rezende, Karina Fernandes Oliveira.

Alterações morfológicas de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) expostas às águas da Represa Billings / Karina Fernandes Oliveira Rezende. -- São Paulo, 2011.

Orientador: José Roberto Machado Cunha da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Zoologia aplicada.

Versão do título para o inglês: Morphologic alterations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) exposed to waters of Billings dam.

Descritores: 1. Peixe 2. Biomarcadores 3. Alterações histológicas 4. Micronúcleo I. Silva, José Roberto Machado Cunha da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB087/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karina Fernandes Oliveira Rezende.

Título da Dissertação: Alterações morfológicas de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) expostas às águas da Represa Billings.

Orientador(a): José Roberto Machado Cunha da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **25** nas fls. **68** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) José Roberto Machado Cunha da Silva, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Alterações morfológicas de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostos a águas eutrofizada da Represa Billings** do qual participou(aram) o(s) alunos **Karina Fernandes Oliveira Rezende**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **02.04.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 03 de abril de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos meus pais, irmãos e familiares
pelo carinho e apoio...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva pela orientação, ensinamentos e confiança durante todos esses anos.

Aos meus amigos do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva, que por todos esses anos foram uma grande família, por toda a convivência, amizade e apoio.

À minha amiga Paola Cristina Branco por todos os anos de amizade (desde a faculdade) e por todo o seu incentivo nos momentos mais difíceis do mestrado.

Ao Prof. Dr. João Carlos Shimada Borges, por me ensinar e colaborar em todos os meus projetos.

A Emília Ribeiro, técnica de laboratório, por me ajudar na preparação de todas as soluções utilizadas nesse projeto.

Aos pescadores da Associação de Pescadores Artesanais da Represa Billings (APARBillings) pelo apoio na colheita dos animais provenientes da Represa Billings e ao Pesqueiro Aquarium pelo apoio na colheita dos animais controle.

Ao aluno de química e amigo Rubens Martins dos Santos pela ajuda na execução desse projeto, tanto na colheita dos animais quanto nas análises das águas.

Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de desenvolver o projeto e a todos os professores pela ajuda indispensável.

À Prof^a. Dra. Maria Inês Borella e ao Prof. Dr. Vicente Gomes por toda a ajuda e conselhos no exame de qualificação.

As secretárias do departamento; Celiana, Eloise e Ana Lúcia; por toda ajuda na parte burocrática.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez por disponibilizar seu laboratório para desenvolver parte desse projeto.

Aos meus pais (Fátima e Edécio) e aos meus irmãos (Cíntia e Danilo) por acreditarem no meu sonho e lutarem comigo.

À todos os meus primos, tios e avôs que são a base da minha vida.

À todos meus amigos queridos, que são irmãos que escolhi e que sempre estiveram e estarão ao meu lado.

Ao Rafael, meu grande amor, por fazer do meu sonho o sonho dele.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, nº processo 2009/06777-1.

"A ciência se compõe de erros que,
por sua vez, são os passos até a verdade"

(Julio Verne)

RESUMO

REZENDE, K. F. O. **Alterações morfológicas de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) expostas às águas da Represa Billings.** 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

A Represa Billings apresenta águas eutrofizadas em decorrência da grande quantidade de esgoto proveniente da área urbana próxima, e como consequência, os peixes podem representar um problema de saúde pública por apresentarem diversos tipos de contaminações. As brânquias e o fígado tornam-se órgãos alvo para a ação dos poluentes existentes no meio aquático podendo se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas e alterações estruturais. Estas respostas biológicas ao estresse provocado pelos poluentes podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes e podem ser denominadas biomarcadores. Desse modo, o presente projeto teve como objetivo a análise histológica de brânquias e fígado de Tilápias do Nilo para a verificação de alterações morfológicas causadas pelo meio, por meio de mensurações, Índice de Alterações Histológicas (I.A.H.) e Valor Médio de Avaliação (V.M.A.); também foi realizada a análise da frequência de micronúcleo para a observação da resposta entre a atividade genotóxica e a eficiência de mecanismos fisiológicos de defesa do animal. Verificou-se que as Tilápias do Nilo apresentam alterações histológicas das brânquias e do fígado classificadas como moderada a grave, além da presença de micronúcleo. Os resultados permitem um melhor monitoramento ambiental e o controle da qualidade dessa espécie.

Palavras- chave: Peixes. Biomarcadores. Alterações Histológicas. Micronúcleo.

ABSTRACT

REZENDE, K. F. O. **Morphologic alterations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) exposed to waters of Billings dam.** 2011. 60 p. Masters thesis (Cell Biology and Tissue) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

The Billings dam shows eutrophic waters due to the large amount of sewage from urban occupation nearby, and consequently, the fish can be a public health problem by presenting various types of contamination. The gills and liver become target organs for the action of pollutants in the aquatic environment and may present several levels of biological organization, including structural changes and physiological dysfunctions. These biological responses to stress caused by pollutants can be used to identify early signs of damage to fish and can be called biomarkers. Thus, this project aimed to analyze the histological gills and liver of Nile tilapia to verify morphological changes caused by environment, by means of measurements, Histological Alterations Index (H.A.I.) and Assessment Medium Value (A.M.V.); the frequency of micronuclei was done, to observe the response to genotoxic activity and the efficiency of animal's defense physiological mechanism. We observed histological alterations in gills and livers of Nile Tilapia classified as mild to severe, and the presence of micronucleus. The results enable better environmental monitoring and quality control of this species.

Keywords: Fish. Biomarkers. Histological changes. Micronuclei.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espécie <i>Oreochromis niloticus</i> adulta utilizada como bioindicadora da poluição da Represa Billings.....	24
Figura 2. Pontos de colheita da Represa Billings.....	25
Figura 3. Ponto de colheita no Pesqueiro Aquarium.....	26
Figura 4. Fotomicrografia do corte histológico em resina das lamelas secundárias das brânquias de <i>O. niloticus</i> . A. Linha preta demonstrando a mensuração do comprimento. B. Linha preta demonstrando a mensuração da largura. C. Linha preta demonstrando a mensuração da área da célula de cloreto. Coloração Azul de Toluidina/ Fucsina. Escala 10 μm	28
Figura 5. Médias do comprimento (Comp) e largura (Larg) das lamelas secundárias de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano. Medidas em μm	34
Figura 6. Médias da área da célula de cloreto das brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano. Medidas em μm^2	35
Figura 7. Fotomicrografia do corte histológico em resina da lamela secundária das brânquias de <i>O. niloticus</i> . A. Controle. A seta preta indica capilares sanguíneos; a seta branca indica células pilares; a seta verde indica células epiteliais lamelares e a seta vermelha indica células epiteliais na base da lamela secundária. B. Represa Billings. As setas indicam aneurisma. C. Represa Billings. A seta indica presença de célula de cloreto na lamela secundária. D. Represa Billings. As setas indicam deslocamento das células epiteliais. E. Represa Billings. A seta indica fusão parcial das lamelas secundárias. Coloração Azul de Toluidina/ Fucsina. F. Represa Billings. A seta preta indica presença de basófilo; a seta branca indica a presença de eosinófilos. Coloração Rosenfeld. G. Represa Billings. A seta indica presença de célula de mucosa na lamela secundária. Coloração PAS. Escala 10 μm	37
Figura 8. Fotomicrografia do corte histológico em resina do fígado de <i>O. niloticus</i> . A. Controle. A seta preta indica hepatócito; a seta branca indica células formando cordão hepático. B. Represa Billings. A seta indica vacuolização citoplasmática nos hepatócitos. C. Represa Billings. Intensa vacuolização citoplasmática nos hepatócitos. D. Represa Billings. A seta indica hiperemia dos vasos hepáticos. Coloração Azul de Toluidina/ Fucsina. Escala 10 μm	38
Figura 9. Índice de Alteração Histológica (I.A.H.) das brânquias (Brq.) e fígado (Fíg.) de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano.....	40

Figura 10. Valor Médio de Avaliação (V.M.A.) das brânquias (Brq.) e fígado (Fíg.) de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano.....	41
Figura 11. Frequência de micronúcleos (MN) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) em 2.000 eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano.....	43
Figura 12. Fotomicrografia de extensão sanguínea de <i>O. niloticus</i> . A. Controle. A seta indica eritrócito normal. B. Represa Billings. A seta indica presença de Micronúcleo. C. Represa Billings. A seta indica presença de Alteração Morfológica Nuclear. Coloração Rosenfeld. Escala 10 µm.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Local (L), data (D), estação do ano (E), número de amostra (N), média e desvio padrão do peso em gramas (P), média e desvio padrão do comprimento total em centímetros (CT) e média e desvio padrão do comprimento padrão em centímetros (CP) dos locais de colheitas da Represa Billings.....	24
Tabela 2- Alterações histológicas consideradas na análise das brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	28
Tabela 3- Alterações histológicas consideradas na análise do fígado de <i>Oreochromis niloticus</i>	29
Tabela 4- Relação entre o valor de I e os efeitos nos órgãos.....	31
Tabela 5- Médias do comprimento e largura das lamelas secundárias de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano. Medidas em μm	33
Tabela 6- Médias da área da célula de cloreto das brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano. Medidas em μm^2	34
Tabela 7- Índice de Alteração Histológica (I.A.H.) das brânquias e fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano.....	39
Tabela 8- Valor Médio de Avaliação (V.M.A.) das brânquias e fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano.....	40
Tabela 9- Frequência de micronúcleos (MN) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) em 2.000 eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes estações do ano.....	42
Tabela 10- Parâmetros da água avaliados nas diferentes estações do ano da Represa Billings e da Piscicultura Aquarium	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Represa Billings.....	14
1.2 Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	15
1.3 Biomarcadores.....	17
1.3.1 Análise Histológica.....	18
1.3.2 Teste de Micronúcleo.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Colheita dos Animais.....	24
3.2 Análise Histológica.....	26
3.3 Teste de Micronúcleo.....	31
3.4 Análise dos Resultados.....	32
4 RESULTADOS.....	33
5 DISCUSSÃO.....	46
6 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Represa Billings

A construção de reservatórios para diversos fins é uma das mais antigas e importantes intervenções humanas nos sistemas naturais. Isso porque o aumento populacional e a distribuição irregular entre habitação humana e recursos hídricos aumentam as pressões para o armazenamento de água em muitas partes do planeta (TUNDISI et al., 1993).

No Brasil, a construção de grandes reservatórios de água, principalmente para fins de geração elétrica e abastecimento público, atingiu seu máximo desenvolvimento nas décadas de 60 e 70 (TUNDISI et al., 1993), sendo que o Estado de São Paulo possui aproximadamente 100 reservatórios como, por exemplo, a Represa Billings, que ocupa uma área de 582,8 km², sendo limitada, a oeste, pela bacia hidrográfica da Represa Guarapiranga e, ao sul, pela Serra do Mar.

Esse reservatório é atualmente o maior da Região Metropolitana do Estado de São Paulo, com espelho d'água de 108 km², correspondendo a 18% da área total de sua bacia hidrográfica. O nível d'água é bastante variável, de acordo com o Consórcio Hidroplan (1995), em função do bombeamento das águas dos rios Tietê e Pinheiros (CAPOBIANCO e WHATELY, 2002).

A Represa Billings foi idealizada pelo engenheiro americano Asa Billings, em 1927, com a finalidade de alimentar a Usina Hidrelétrica Henry Borden no município de Cubatão, que tem capacidade de gerar cerca de 880 MW. Para que isso fosse possível, foi necessária a construção de um sistema de obras hidráulicas de maneira a permitir que as águas do Alto Tietê atingissem o reservatório (CAPOBIANCO e WHATELY, 2002).

A partir da década de 50 a represa Billings passou a receber toda água disponível no Alto Tietê com a reversão por meio do canal do rio Pinheiros, duplicando a potência instalada em Cubatão, contendo as cheias, além do abastecimento público, da prática da pesca e atividade de lazer, com isso a represa passou a ter sinais de deterioração causados por alta carga de poluentes e contaminantes de origem doméstica e industrial (SENDACZ et al., 1999).

Esta reversão continua a ser utilizada até os dias de hoje apenas nas épocas de chuvas, com máximas nos meses de verão (dezembro a março) como alternativa de controle de cheias das bacias dos rios Tietê e Pinheiros em períodos de chuvas intensas de acordo com a Resolução Conjunta SMA/SES nº 03 de 1992. Estas operações, apesar de esporádicas, contribuem consideravelmente para o comprometimento da qualidade das águas do reservatório, dificultando a sua desejada recuperação (CAPOBIANCO e WHATELY, 2002), além disso, existe uma grande quantidade de esgoto proveniente da ocupação de suas sub-bacias formadoras. Em consequência disso, suas águas apresentam eutrofização; toxicidade pela presença de metais pesados como cobre, mercúrio e zinco, e; presença de microorganismos patogênicos e algas potencialmente tóxicas; prejudicando o equilíbrio ambiental do reservatório (CAPOBIANCO e WHATELY, 2002; COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2009).

Verifica-se, ainda, que os peixes da Represa Billings constituem problema de saúde pública por apresentarem contaminação por chumbo, cromo, mercúrio e zinco, tanto nas vísceras como na musculatura, com teores que ultrapassam os limites máximos permissíveis, estabelecidos pela legislação brasileira e internacional. Também as concentrações de surfactantes estão em desacordo com a legislação e, além dos problemas estéticos e sanitários, conferem gosto à carne dos peixes (ROCHA; PEREIRA; PÁDUA, 1985).

1.2 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

As tilápias pertencem a família *Cichlidae*, são de origem do leste e oeste da África e são peixes de água doce amplamente cultivados pelo mundo inteiro nos dias de hoje (POPMA e LOVSHIN, 1996; DEY e GRUPTA, 2000; MC ANDREW, 2000; APPELYARD; RENWICK; MATHER, 2001).

Embora a tilápia já fosse conhecida pelos egípcios 2.000 anos a.C., a sua criação teve início no Quênia, somente em 1927, de modo muito rudimentar e como uma espécie não determinada, expandindo-se pelo Congo em 1937. Depois desse período, soldados japoneses introduziram a *Oreochromis mossambicus* na ilha de Java

e, dessa forma, a tilápia se popularizou na Indonésia e Filipinas, alcançando grande projeção de cultivo e desenvolvimento em águas tropicais após a Segunda Guerra Mundial (GALLI e TORLONI, 1999).

Embora cerca de 70 espécies recebam a denominação Tilápia, somente *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis aureus*, *Tilapia rendalli* e seus híbridos apresentam importância para aquicultura mundial (STICKNEY, 1997).

A Tilápia do Nilo ou nilótica, *Oreochromis niloticus*, possui duas linhagens de grande importância no Brasil: Bouaké e Chitralada. A primeira é originária da Costa do Marfim e foi introduzida no Brasil em 1971 em açudes do Nordeste, e difundiu-se para todo o país (POPMA e LOVSHIN, 1996) desde a bacia do Rio Amazonas até o Rio Grande do Sul. A segunda teve origem no Egito, foi para o Japão e daí exportada para Tailândia, lugar onde foi domesticada e introduzida no Brasil em 1996. Entre essas linhagens não há diferenças morfológicas mensuráveis (POVH et al., 2005).

Sua introdução na aquicultura nacional apresenta-se bastante promissora, pois, a Tilápia do Nilo com aproximadamente 37% de porção comestível é, atualmente, a espécie de maior volume de produção da piscicultura, tanto em sistemas extensivos como em sistemas intensivos. A espécie exibe vantagens que a torna um grupo de peixes de interesse mundial, alimentando-se da base da cadeia trófica e aceitando variedade de alimentos. Têm requisitos típicos dos peixes preferidos pelo mercado consumidor, tais como a carne branca de textura firme e sabor delicado, fácil filetagem, ausência de espinhas em “Y”, sendo considerado “o novo pescado branco”; além de características produtivas, como a resistência ao manuseio e transporte, baixa susceptibilidade a doenças parasitárias, arraçamento fácil e econômico, crescimento rápido podendo atingir 5 quilos ou mais e alto teor de domesticidade (GALLI e TORLONI, 1999; JORY; ALCESTE; CABRERA, 2000).

A Tilápia do Nilo é um peixe de águas paradas, sobrevivendo em águas com menos de 1mg/litro de oxigênio dissolvido. Fora d`água e protegida do sol, ela pode sobreviver por mais de uma hora. Preferem águas quentes, com temperatura entre 15 a 35°C, embora já estejam se adaptando em regiões onde a temperatura da água atinge 8°C no inverno. Naturalmente é micrófaga, isto é, alimenta-se de microorganismos que

compõem o plâncton, porém, em presença de excesso de alimento comporta-se como uma espécie onívora (GALLI e TORLONI, 1999).

De coloração cinza- azulada (GALLI e TORLONI, 1999), a espécie possui corpo alto e curto, cabeça e cauda pequenas, facilmente reconhecidas pelas listras verticais presentes na nadadeira caudal (HEPHER e PRUGININ, 1981).

A tilápia é criada em diversos sistemas, apresentando excelente desempenho. Apesar das vantagens, a proliferação desordenada é considerada o principal problema para o seu cultivo, provocando super lotação e diminuição de tamanho médio do indivíduo, além do crescimento relativamente lento (POPMA e LOVSHIN, 1996).

1.3 Biomarcadores

Um biomarcador é uma resposta fisiológica individual ou um padrão morfológico alterado num organismo e, em ambos os casos, é a consequência (efeito) da exposição (causa) do organismo a um agente exógeno, este doravante denominado xenobiótico. Portanto, os biomarcadores integram sistemas biológicos operacionais indicando processos de contaminação ou intoxicação, em diferentes níveis de organização biológica (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A utilização de biomarcadores apresenta várias vantagens, pois permite detectar precocemente a existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas, identificar espécies ou populações em risco de contaminação, avaliar a magnitude da contaminação e determinar o grau de severidade dos efeitos causados pelos contaminantes (STEGEMAN et al., 1992).

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois além de estarem presentes em vários ambientes e apresentarem ampla distribuição geográfica, participam, ainda, de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, sendo considerados excelentes modelos biológicos de estudo (JESUS e CARVALHO, 2008).

1.3.1 Análise Histológica

O exame histopatológico é reconhecido cada vez mais como uma ferramenta valiosa para a avaliação do campo do impacto de poluentes ambientais em peixes (TEH; ADAMS; HINTON, 1997), além de um método rápido para detecção de irritantes (BERNET et al., 1999), possui algumas vantagens práticas sobre outros tipos de biomarcadores, como a facilidade de colher e armazenar amostras, a viabilidade de avaliar vários sistemas e tipos celulares de um peixe e a oportunidade de investigar peixes muito pequenos que individualmente resultariam em material insuficiente para uma avaliação bioquímica. Além dessas vantagens, nenhuma outra técnica permite a identificação do local específico do comprometimento celular. Características histopatológicas de órgãos alvos específicos podem expressar condições ambientais e representar o tempo de exposições aos quais estão submetidos os organismos (SCHMALZ et al., 2002).

As brânquias, por apresentarem uma grande área de exposição, são as principais portas de entrada para a grande maioria dos poluentes (BERNET et al., 1999), atuando como uma interface seletiva entre o ambiente interno e o meio externo. Uma vez exposta a condições adversas do meio, espera-se que haja vários tipos celulares no epitélio, que se adaptem, se modifiquem e se especializem, para responder às variações ambientais de forma satisfatória ao organismo (LICHTENFELS, 1996).

Esses órgãos são estruturas vitais para a saúde dos peixes, pois, além de serem o principal local de trocas gasosas, também estão envolvidos nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido básico e excreção de compostos nitrogenados. Estes desempenham ainda a função de órgão sensorial da gustação (MACHADO e FANTA, 2003). Portanto, qualquer alteração nessas estruturas certamente comprometeria a sobrevivência dos peixes (MORGAN e TOWELL, 1973).

O fígado é um órgão desintoxicador essencial para o metabolismo e para a excreção de substâncias tóxicas de dentro do corpo. É um órgão com potencial de biotransformação, bioativação e excreção de xenobiontes sendo, portanto, um dos principais órgãos alvos que podem refletir a exposição aos contaminantes (BERNET et

al., 1999). Os hepatócitos podem ser considerados o primeiro alvo da toxicidade de uma substância, o que caracteriza o fígado como um órgão biomarcador da poluição ambiental (ZELIKOFF, 1998).

Bruslé; González e Anadon (1996) afirmam que estudos com histologia de fígados de peixes poderiam servir como modelos para estudar as interações entre fatores ambientais e estruturas hepáticas e suas funções. O efeito prejudicial da poluição do metal pesado na histologia do fígado de peixes pode, entretanto, depender da duração da exposição (crônica ou aguda) e nível de concentração do metal específico.

Estudos de campo são componentes importantes para a avaliação e compreensão dos efeitos biológicos e/ou ecológicos de agentes químicos sob condições naturais. As principais vantagens de tais estudos refere-se a incorporação de exposições 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. Apesar disto, ainda são poucos os estudos de campo que avaliam as respostas biológicas de espécies aos contaminantes eventualmente presentes no seu habitat (ORLANDO et al., 1999).

Embora os peixes sejam menos sensíveis que os invertebrados à maioria dos agentes tóxicos, as normas que tratam dos testes de toxicidade recomendam a utilização de organismos de todos os níveis tróficos. Além disso, os peixes são importantes fontes de alimento; são quase sempre visíveis, de maneira que a mortandade causa espanto e preocupação nas pessoas, mesmo naquelas que não são sensíveis às causas ambientais. Entre os organismos essencialmente aquáticos, os peixes ocupam níveis tróficos elevados na cadeia alimentar e, por isso, são passíveis de acumular altos teores de substâncias por biomagnificação; seus sistemas orgânicos são muito mais próximos histológica e fisiologicamente dos sistemas humanos (e de outros vertebrados) que dos invertebrados, permitindo extrapolações mais confiáveis (MELETTI et al., 2003).

Assim, torna-se necessário avaliar aspectos histopatológicos de peixes para o monitoramento de contaminação ambiental decorrente das atividades humanas, diagnosticar doenças que podem acometer os peixes, bem como fornecer informações

importantes sobre o estado de higidez destes, impedindo que doenças sejam transmitidas ao homem e aos organismos envolvidos na cadeia alimentar aquática, e dissipar contaminantes ambientais (MELETTI et al., 2003).

1.3.2 Teste de Micronúcleo

Por volta dos anos 50 e 60 a Ecologia e a Genética se uniram e, a partir daí, foram desenvolvidos os primeiros testes rápidos e eficientes que são empregados em estudos de genotoxicidade. Dentre os principais testes, podemos citar a medição da frequência de micronúcleo (BOMBAIL et al., 2001). Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito (FENECH, 2000).

Os micronúcleos são conceituados como sendo corpúsculos extranucleares formados durante o processo da mitose, os quais são o resultado de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não ficaram incluídos em nenhum dos núcleos filhos, originados no processo de divisão celular (PALHARES e GRISOLIA, 2002; ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005b). Do mesmo modo, podem ocorrer anomalias celulares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL et al., 2001). Essa presença em células é um reflexo da estrutura e/ou numérica aberração cromossomal surgido durante mitose (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005b).

O princípio do teste baseia-se no fato de que, durante o processo de divisão celular, principalmente na anáfase, as cromátides e os fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para os pólos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero o são. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. No entanto, alguns elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos núcleos formados e permanecem

no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (SCHMID, 1975).

Desta maneira, os efeitos de substâncias que provoquem quebras cromossômicas, ou ainda afetem os componentes do fuso ou da região centromérica, podem ser detectados a partir da presença de micronúcleos. Deve-se ressaltar que nem todos os produtos genotóxicos são clastogênicos, muitos induzem a formação dos micronúcleos por sua capacidade de afetarem o fuso (HEDDLE et al., 1991).

Hooftman e De Raat (1982), tomando por base o teste do micronúcleo originalmente desenvolvido por Schmid (1975) para células da medula óssea de camundongos, introduziram-no nos de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como *Piscine Micronucleus Test*.

Assim, uma vez que os peixes apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos nestas células pode ser considerada uma resposta complexa entre a atividade genotóxica e a eficiência do mecanismo fisiológico de defesa do organismo teste (MATSUMOTO et al., 2006), sendo assim outro importante biomarcador utilizado para avaliar o grau de contaminação ao meio ambiente (FENECH, 1985).

O teste de micronúcleo é uma técnica vantajosa, pois pode ser usada em qualquer tipo de população celular em proliferação, sem que seja necessário o conhecimento prévio do cariótipo do animal. Devido aos peixes terem um grande número de cromossomos, e muitas vezes de pequeno tamanho, as análises das metáfases para a avaliação das aberrações cromossômicas são dificultadas, enquanto que o estudo de micronúcleos é fácil e possível de ser realizado em eritrócitos, devido ao fato destes serem nucleados (HAYASHI et al., 1998).

A avaliação das alterações nucleares e os micronúcleos têm sido utilizados para estimar o nível de exposição aos contaminantes em muitas pesquisas, principalmente na investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais, desde os anos 80. Esse teste mede o dano cromossômico estrutural ou numérico e tem sido usado para avaliar genotoxicidade, sendo um indicador recomendado para estudos ambientais tanto em condições laboratoriais como no campo (AL-SABTI, 1986).

Existem vários ensaios de mutagenicidade e o teste do micronúcleo tem sido aplicado com sucesso por se tratar de um ensaio simples, seguro e sensível, e por não depender da característica cariotípica do animal em estudo. Por estas razões, o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem se mostrado uma técnica promissora em investigações de mutagênese com causas ambientais (PALHARES e GRISOLIA, 2002; ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005a; MATSUMOTO et al., 2006).

Diversos estudos têm demonstrado uma alta incidência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de peixes expostos em diferentes poluentes (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005a; MATSUMOTO et al., 2006).

Anormalidades nucleares são frequentemente observadas em eritrócitos de peixes, como consequência da exposição destes animais à contaminantes químicos tóxicos, genotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos no meio ambiente (PALHARES e GRISOLIA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006). Souza e Fontanelli (2006) descreveram a formação de alterações morfológicas no envelope nuclear como núcleo que apresenta uma pequena evaginação do envelope nuclear, o qual contém eucromatina (“blebbed”), núcleo apresentando evaginação maiores que o núcleo blebbed (“lobed) e o núcleo apresenta um corte notável no conteúdo do material nuclear (“notched”).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Pesquisar possíveis alterações histológicas nas brânquias e no fígado, além de anomalias nucleares em eritrócitos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes da Represa Billings.

2.2 Objetivos Específicos

Análise morfométrica das lamelas secundárias das brânquias;
Análise morfométrica das células de cloreto das brânquias;
Análise do Índice de Alteração Histológica (I.A.H.) das brânquias e fígado;
Análise do Valor Médio de Avaliação (V.M.A.) das brânquias e fígado;
Contagem de freqüência de Micronúcleo (MN) em eritrócitos;
Contagem de freqüência de Alteração Morfológica Nuclear (A.M.N.) em eritrócitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Colheita dos Animais

Foram colhidas amostras da espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Figura 1) em diferentes estações do ano e nos seguintes pontos da Represa Billings, de acordo com a tabela 1 e mostrado na figura 2, correspondente ao bairro do Grajaú, zona sul da cidade de São Paulo- SP.



Figura 1. Espécie *Oreochromis niloticus* adulta utilizada como bioindicadora da poluição da Represa Billings.

Tabela 1- Local (L), data (D), estação do ano (E), número de amostra (N), média e desvio padrão do peso em gramas (P), média e desvio padrão do comprimento total em centímetros (CT) e média e desvio padrão do comprimento padrão em centímetros (CP) dos locais de colheitas da Represa Billings.

L	D	E	N	P	CT	CP
Imigrantes	29.08.2009	Inverno	7	123, 57 ($\pm 26,25$)	17,86 ($\pm 0,85$)	14,36 ($\pm 0,63$)
2ª Balsa	07.04.2010	Outono	6	225 ($\pm 52,44$)	20,41 ($\pm 1,80$)	16,17 ($\pm 1,25$)
Imigrantes	03.12.2010	Primavera	4	217,5 ($\pm 23,63$)	19,75 ($\pm 0,5$)	15,87 ($\pm 0,48$)
2ª Balsa	15.01.2011	Verão	5	202 ($\pm 70,50$)	19,5 ($\pm 1,80$)	15,9 ($\pm 1,47$)

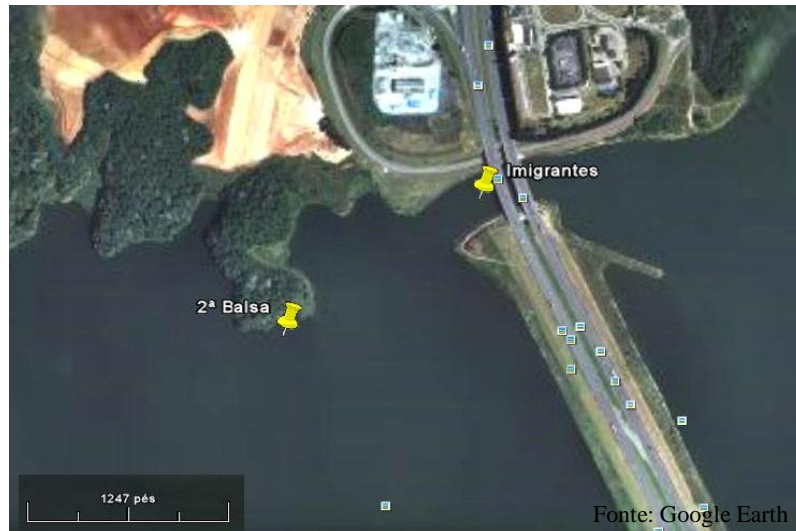


Figura 2. Pontos de colheita da Represa Billings.

Ponto 1: Imigrantes (23°47'31.68"S 46°35'49.69"O)- próximo a ponte da Rodovia dos Imigrantes, local de monitoramento de água pela CETESB (BILL02500);

Ponto 2: 2ª Balsa (23°47'16.45"S 46°36'00.88"O)- próximo a balsa do braço Taquacetuba, onde está a maior comunidade de pescadores da Ilha do Bororé.

Para a colheita nesses pontos, foi armada uma rede de pesca, malha número 8, a um metro de profundidade, na noite do dia anterior, sendo recolhida ao amanhecer. Para a realização desse procedimento foi utilizado um barco a motor da Associação de Pescadores Artesanais da Represa Billings- APARBillings.

Foram colhidas, ainda, 5 amostras de *Oreochromis niloticus* do Pesqueiro Aquarium (23°49'28.04"S 46°40'20.48"O) (Figura 3) considerados animais controles com média de peso 140 g ($\pm 41,83$), média de comprimento total 15,2 cm ($\pm 1,92$) e média de comprimento padrão 12,5 cm ($\pm 1,5$). A colheita foi feita com vara de pescar telescópica Hunter de fibra de carbono de 4 metros (Albatroz Fishing, São Paulo, SP, Brasil), utilizando isca de massa Bocão (Bocão, São Paulo, SP, Brasil), especial para Tilápias.



Figura 3. Ponto de colheita no Pesqueiro Aquarium.

Foram coletadas amostras de água a um metro de profundidade nos pontos acima mencionados para a análise físico-química da água no Laboratório de Saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento- Escola de Engenharia de São Carlos- USP, em que foi utilizado o método de referência “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” para todos os parâmetros. A temperatura foi medida no momento da colheita utilizando termômetro WP Lollipop (Delta Trak, Pleasanton, CA, USA).

Todos os pontos de colheita foram geo-referenciados por meio do aparelho GPS Map 76CSX (Garmin, Olathe, KS, USA) e plotados em mapas.

Foram feitas análises biométricas (peso, comprimento total e comprimento padrão) de todos os animais.

3.2 Análise Histológica

Todos os animais manipulados experimentalmente foram sacrificados mediante secção transversal na medula espinhal, retirado o terceiro arco branquial da brânquia direita e um terço central do fígado. Em seguida as brânquias e os fígados foram fixados em McDowell gelado a 4 °C (glutaraldeído 1% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7.4) onde permaneceram durante 72 horas (MCDOWELL e TRUMP, 1976).

Após a retirada do fixador, o material passou pelo procedimento de desidratação alcoólica e foi incluído em historresina LEICA (Glicol Metacrilato) (Leica Microsystems,

Wetzlar, Hessen, Alemanha), cortado em micrótomo (Spencer, Buffalo, NY, USA) na espessura aproximada de 2 μm e corado em Azul de Toluidina/ Fucsina para análise geral da estrutura, PAS (Ácido Periódico de Schiff) para a identificação de células de mucosa (BANCROFT e STEVENS, 1982) e corante pancromico Rosenfeld para a identificação de infiltrados de leucócitos (ROSENFELD, 1947). Em seguida, as lâminas foram digitalizadas com câmara fotográfica Cannon EOS-300 (Cannon, Tóquio, Japão) acoplada no microscópio de luz Standard 25 (Zeiss, Alemanha).

Após a digitalização das lâminas, as brânquias foram submetidas a um programa específico de mensurações de área, Image J produzido e distribuído pelo NIH- National Institute of Health, no qual foram feitas as seguintes medidas: 100 comprimentos (Figura 4a) e 100 larguras (Figura 4b) das lamelas secundárias e 50 áreas das células de cloreto (Figura 4c). A escolha dos campos foi aleatória, entretanto, em áreas que apresentaram artefatos histológicos que impedissem a correta interpretação dos aspectos morfológicos foram descartados e substituídos randomicamente. Em cada lamela secundária foram feitas três medidas de largura, obtendo, assim, um valor médio.

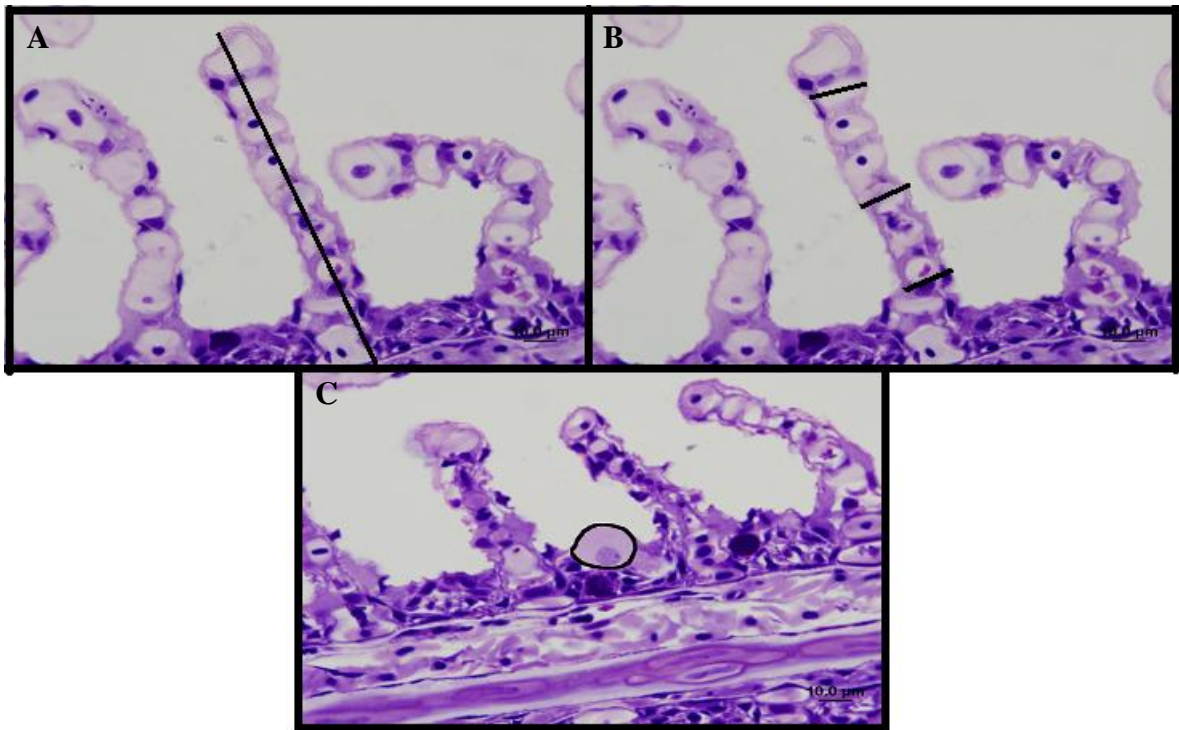


Figura 4. Fotomicrografia do corte histológico em resina das lamelas secundárias das brânquias de *O. niloticus*. **A.** Linha preta demonstrando a mensuração do comprimento. **B.** Linha preta demonstrando a mensuração da largura. **C.** Linha preta demonstrando a mensuração da área da célula de cloreto. Coloração Azul de Toluidina/ Fucsina. Escala 10 µm.

As brânquias e os fígados foram analisados levando em conta uma série de alterações histopatológicas, classificadas em estágio de severidade, conforme as tabelas 2 e 3, isso possibilitou a aplicação de dois índices para a avaliação das alterações.

Tabela 2- Alterações histológicas consideradas na análise das brânquias de *Oreochromis niloticus*. (continua)

Alterações histológicas branquiais	Estágio
a) Hipertrofia e hiperplasia do tecido respiratório	
Hipertrofia das células epiteliais	I
Adelgamento epitelial	I
Deslocamento ou elevação das células do epitélio	I
Ruptura epitelial	II
Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias	I
Hiperplasia das células epiteliais ao longo das lamelas secundárias	I
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	I
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	I

Tabela 2- Alterações histológicas consideradas na análise das brânquias de *Oreochromis niloticus*.
(conclusão)

Fusão completa de todas as lamelas secundárias	II
Degeneração celular	II
Infiltração de leucócitos no epitélio branquial	I
b) Alterações nas células mucosas e cloreto	
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células mucosas	I
Presença de células mucosas nas lamelas secundárias	I
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células cloreto	I
Presença de células cloreto nas lamelas secundárias	I
c) Alterações nos vasos sanguíneos lamelares	
Dilatação dos capilares	I
Desarranjo dos capilares	I
Congestão vascular	I
Hemorragia causada por ruptura de capilares	II
Aneurisma lamelar	II
d) Estágio terminal	
Fibrose	III
Necrose	III
e) Parasitas branquiais	
Presença de parasitas	I

Tabela 3- Alterações histológicas consideradas na análise do fígado de *Oreochromis niloticus*.
(continua)

Alterações histológicas hepáticas	Estágio
a) Alterações nos hepatócitos	
Desarranjo dos cordões hepáticos	I
Perda ou atipia do contorno celular	I
Perda ou atipia do contorno nuclear	I
Aumento do volume celular	I
Aumento do volume nuclear	I
Atrofia nuclear	II
Intensa vacuolização citoplasmática	I
Vacuolização nuclear	II
Diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos	I
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II

Tabela 3- Alterações histológicas consideradas na análise do fígado de *Oreochromis niloticus*.
(conclusão)

Rompimento celular	II
Diminuição do glicogênio	I
Estagnação biliar	I
b) Alterações nos vasos sanguíneos	
Aumento da freqüência relativa de vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
Aumento do volume relativo dos vasos	I
c) Alterações nos canalículos biliares	
Degeneração dos canalículos biliares	II
d) Estágio terminal	
Necrose (focal ou total)	III

O primeiro índice utilizado foi o Índice de Alterações Histológicas (I.A.H.), de acordo com critérios estabelecidos pelo método de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994). O método consiste de uma classificação para as alterações estruturais em peixes de água doce, sendo que, no primeiro critério, as alterações são classificadas, quanto a sua localização e tipo. No segundo critério, avalia-se o grau de severidade das lesões. Após isso, submete-se a uma fórmula que permite quantificar essas alterações, tornando possível a comparação do grau de alterações histológicas teciduais em diferentes situações de poluição e em grande número de peixes e, ainda, permite correlacionar a intensidade das alterações encontradas com a intensidade da poluição a qual o animal está exposto:

$$I = \sum_{i=1}^{na} a_i + 10 \sum_{i=1}^{nb} b_i + 100 \sum_{i=1}^{nc} c_i$$

Em que:

a- primeiro estágio de alteração.

b- segundo estágio de alteração.

c- terceiro estágio de alteração.

na- número total de alterações de primeiro estágio.

nb- número total de alterações de segundo estágio.

nc- número total de alterações de terceiro estágio.

Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) estabeleceram, ainda, relações entre os valores de I e os efeitos nos órgãos, descritos na tabela 4.

Tabela 4- Relação entre o valor de I e os efeitos nos órgãos.

Valores de I	Efeitos
0 – 10	Órgão funcionalmente normal
11 – 20	Órgão com alterações de leves a moderadas
21 – 50	Órgão com alterações de moderadas a graves
51 – 100	Órgão com alterações graves
> 100	Órgão com danos irreversíveis

O segundo índice utilizado na avaliação das brânquias e fígado foi o Valor Médio de Avaliação (V.M.A.), proposto por Schwaiger et al. (1997), calculado a partir de uma análise semiquantitativa baseada em escala de severidade e ocorrência das lesões, sendo o grau 1 órgãos sem alterações patológicas; grau 2 para órgãos com alterações pontuais, brandas e moderadas e; grau 3 para órgãos com alterações patológicas severas e extensas.

3.3 Teste de Micronúcleo

Para o teste de micronúcleo foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) com algumas modificações.

O sangue periférico foi coletado por punção caudal com seringas heparinizadas. As lâminas de extensões foram feitas no local de coleta com aproximadamente uma gota de sangue (aproximadamente 50 µL), confeccionando uma lâmina por amostra. Em seguida as lâminas foram secas por 24 horas em temperatura ambiente. O material foi então corado com corante pancromico Rosenfeld (ROSENFELD, 1947).

Foram analisados 2.000 eritrócitos por amostra, incluindo no computo total em teste cego, sendo que somente foram consideradas na análise, eritrócitos com membrana nuclear e citoplasmática intactas. Foram consideradas como micronúcleos as partículas que, em relação ao núcleo principal não excederam um terço do seu tamanho, apresentavam-se nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações nucleares dos eritrócitos que não se

enquadraram no conceito de micronúcleo, também foram analisadas, sendo descritas como Alterações Morfológicas Nucleares.

3.4 Análise dos Resultados

Os dados obtidos foram avaliados em função das médias e desvios padrões pelas análises estatísticas ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

Com a mensuração do comprimento e largura das lamelas secundárias das brânquias de todos os animais em estudo (Tabela 5 e Figura 5), não foram observadas diferenças estatísticas entre as diferentes estações do ano.

Tabela 5- Médias do comprimento e largura das lamelas secundárias de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano. Medidas em μm .

(continua)

Peixes	Comprimento	Largura
Inverno		
1	70,00	13,43
2	84,20	13,63
3	71,93	11,53
4	97,80	12,14
5	93,78	14,97
6	92,21	14,88
7	79,99	14,19
Média	84,27	13,54
Desv. Pad.	$\pm 10,88$	$\pm 1,31$
Outono		
8	67,45	12,87
9	86,60	15,50
10	73,76	9,54
11	95,40	12,40
12	91,67	13,10
13	94,90	14,87
Média	84,96	13,05
Desv. Pad.	$\pm 11,73$	$\pm 2,10$
Primavera		
14	89,78	12,47
15	87,34	10,85
16	94,70	11,89
17	79,09	11,34
Média	87,73	11,64
Desv. Pad.	$\pm 6,52$	$\pm 0,70$
Verão		
18	101,34	13,91
19	96,54	11,76
20	87,34	12,72
21	88,45	12,58
22	79,56	13,36
Média	90,65	12,87
Desv. Pad.	$\pm 8,48$	$\pm 0,81$
Controle		
23	85,24	11,15
24	78,04	9,23
25	101,78	11,77

Tabela 5- Médias do comprimento e largura das lamelas secundárias de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano. Medidas em μm .

		(conclusão)
26	87,06	11,52
27	93,69	10,76
Média	89,16	10,88
Desv. Pad.	$\pm 8,99$	$\pm 1,00$

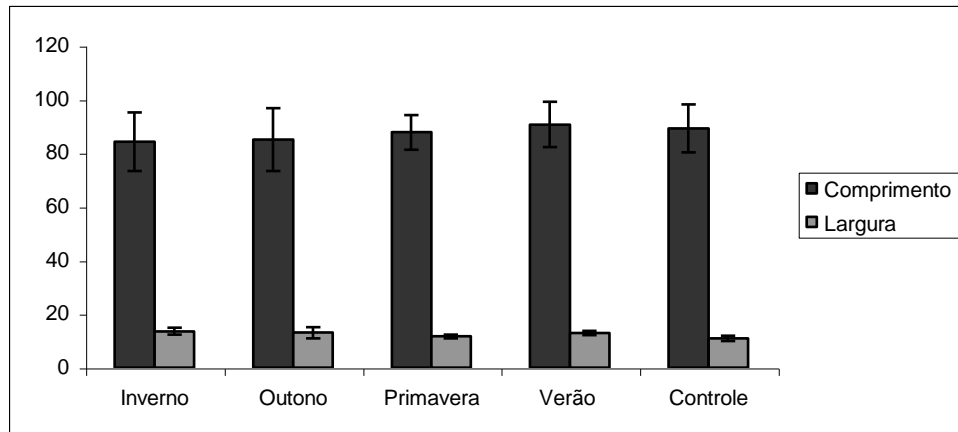


Figura 5. Médias do comprimento (Comp) e largura (Larg) das lamelas secundárias de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano. Medidas em μm .

As médias observadas pela análise morfométrica da área da célula de cloreto das brânquias podem ser observadas na tabela 6 e na figura 6. Nota-se a ausência de diferença estatística significativa, mostrando que não houve hipertrofia e/ou atrofia das células de cloreto em animais expostos as águas da Represa Billings em diferentes estações do ano em relação ao controle.

Tabela 6- Médias da área da célula de cloreto das brânquias de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano. Medidas em μm^2 .

(continua)	
Peixes	Área da célula de cloreto
Inverno	
1	78,01
2	90,77
3	94,27
4	83,95
5	111,86
6	92,97
7	106,37
Média	94,03
Desv. Pad.	$\pm 11,83$
Outono	
8	86,54
9	79,65

Tabela 6- Médias da área da célula de cloreto das brânquias de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano. Medidas em μm^2 .

	(conclusão)
10	108,34
11	80,65
12	98,65
13	89,76
Média	90,60
Desv. Pad.	$\pm 11,09$
Primavera	
14	85,98
15	101,98
16	79,23
17	96,52
Média	90,93
Desv. Pad.	$\pm 10,24$
Verão	
18	108,98
19	83,68
20	98,45
21	101,85
22	87,09
Média	96,01
Desv. Pad.	$\pm 10,49$
Controle	
23	74,98
24	89,78
25	78,61
26	92,77
27	96,75
Média	86,58
Desv. Pad.	$\pm 9,35$

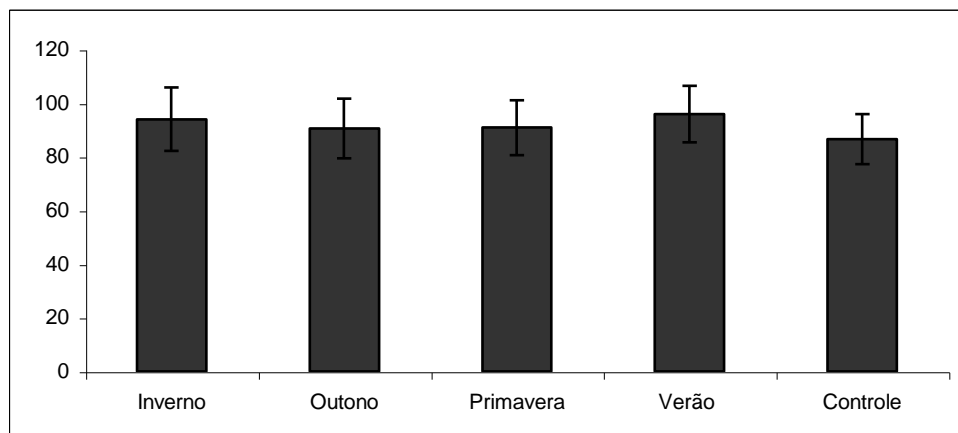


Figura 6. Médias da área da célula de cloreto das brânquias de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano. Medidas em μm^2 .

Com a análise microscópica das brânquias dos animais controle, obteve-se um padrão de normalidade, representado na figura 7a. Observou-se um capilares sanguíneos sustentado por células pilares e células epiteliais lamelares.

Uma das alterações branquiais mais freqüentes foi alteração de vasos sanguíneos (aneurisma) na lamela secundária (Figura 7b), nos animais provenientes da Represa Billings, em todas as estações do ano. Essa alteração não foi constatada nos animais do grupo controle.

Verificou-se, ainda, nos animais provenientes da Represa Billings, em todas as estações do ano, presença de células de cloreto na lamela secundária (Figura 7c). Essa alteração foi observada em alguns exemplares do grupo controle, porém de forma mais branda.

Foi verificado, também, somente nos pontos da Represa Billings, deslocamento das células epiteliais na lamela secundária (Figura 7d).

Constatou-se, ainda, hiperplasia das células epiteliais causando fusão parcial das lamelas secundárias (Figura 7e) em peixes provenientes da Represa Billings e, também, em alguns peixes do grupo controle, porém não com a mesma escala de severidade.

Notou-se, ainda, em todos os grupos de estudo, infiltração de leucócitos (Figura 7f).

Outra alteração observada em todos os pontos de colheita da Represa Billings foi a presença de células de mucosa na lamela secundária (Figura 7g). Essa alteração não foi observada no grupo controle.

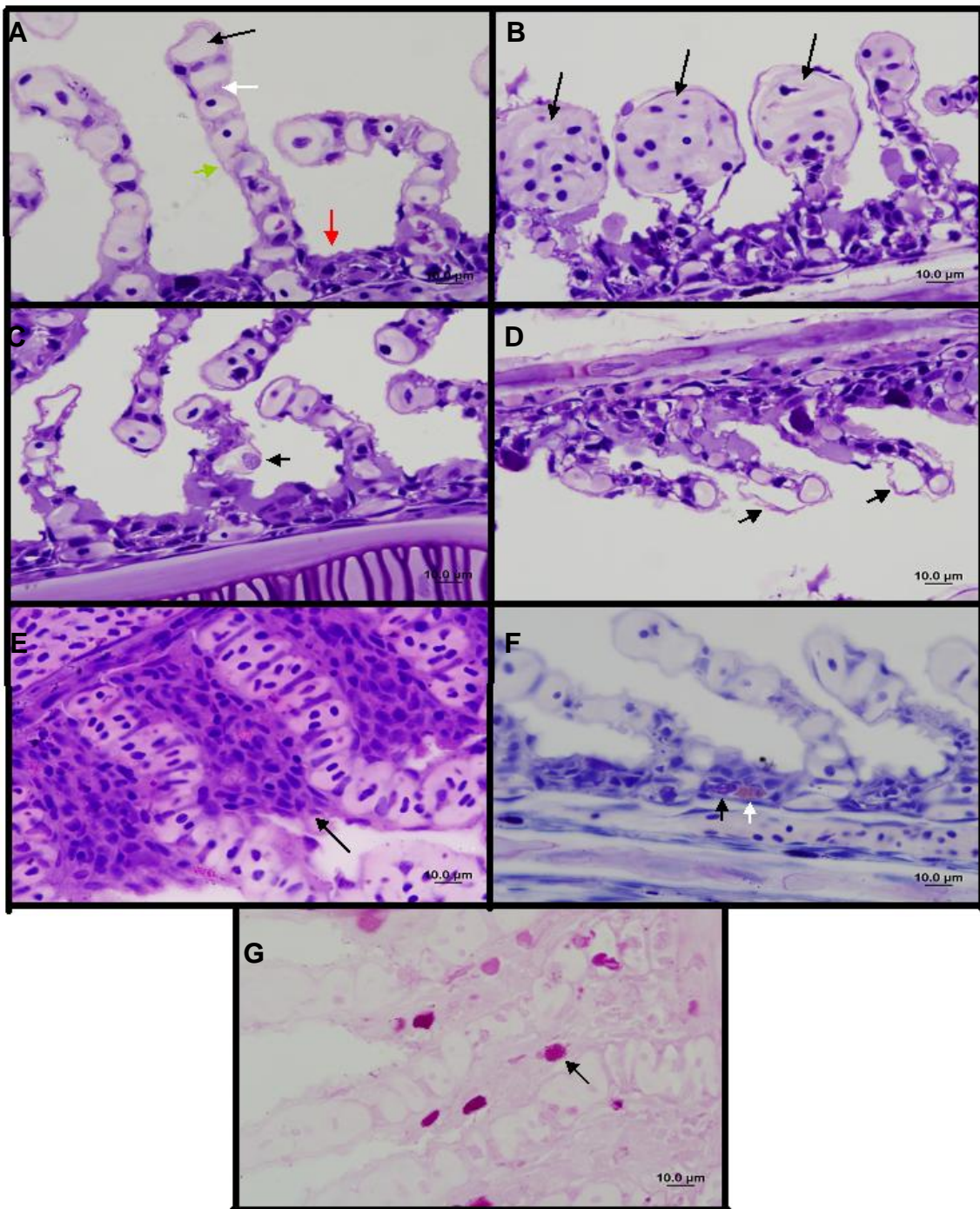


Figura 7. Fotomicrografia do corte histológico em resina da lamela secundária das brânquias de *O. niloticus*. **A.** Controle. A seta preta indica capilares sanguíneos; a seta branca indica células pilares; a seta verde indica células epiteliais lamelares e a seta vermelha indica células epiteliais na base da lamela secundária. **B.** Represa Billings. As setas indicam aneurisma. **C.** Represa Billings. A seta indica presença de célula de cloreto na lamela secundária. **D.** Represa Billings. As setas indicam deslocamento das células epiteliais. **E.** Represa Billings. A seta indica fusão parcial das lamelas secundárias. Coloração Azul de Toluidina/ Fucsina. **F.** Represa Billings. A seta preta indica presença de basófilo; a seta branca indica a presença de eosinófilos. Coloração Rosenfeld. **G.** Represa Billings. A seta indica presença de célula de mucosa na lamela secundária. Coloração PAS. Escala 10 µm.

Com a análise microscópica do fígado dos animais controle, obteve-se um padrão de normalidade, representado na figura 8a. Observa-se células formando cordão hepático e os hepatócitos com o citoplasma homogêneo.

Foram analisadas, também, alterações histológicas no fígado, em que observou-se vacuolização citoplasmática dos hepatócitos apenas nos animais provenientes da Represa Billings (Figuras 8b e 8c).

Outra alteração observada em todos os grupos, sendo mais frequente em animais provenientes da Represa Billings, foi hiperemia dos vasos sanguíneos hepáticos (Figura 8d).

Foi verificado, somente nos grupos da Represa Billings, hipertrofia nuclear e degeneração nuclear.

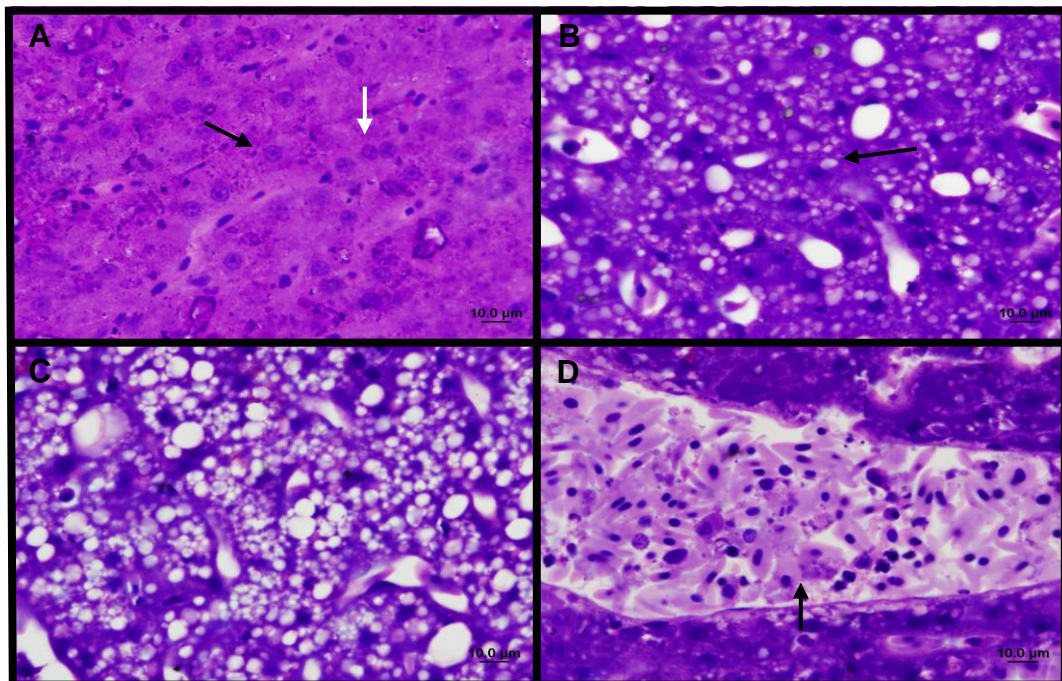
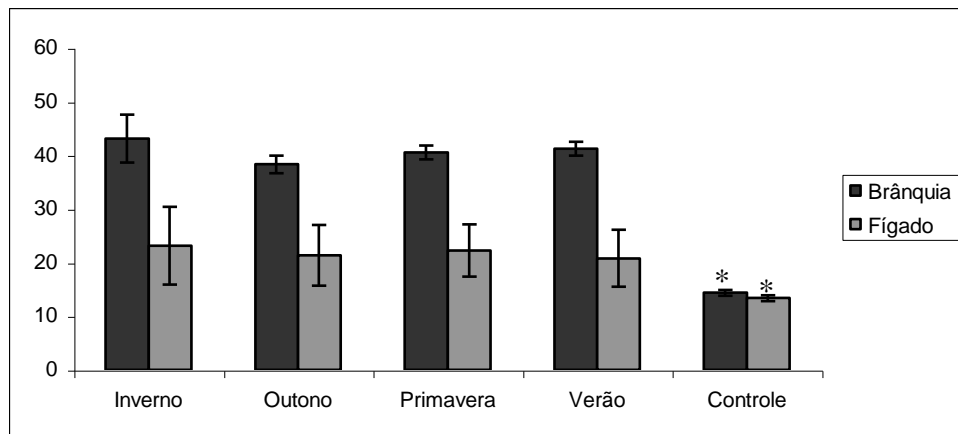


Figura 8. Fotomicrografia do corte histológico em resina do fígado de *O. niloticus*. **A.** Controle. A seta preta indica hepatócito; a seta branca indica células formando cordão hepático. **B.** Represa Billings. A seta indica vacuolização citoplasmática nos hepatócitos. **C.** Represa Billings. Intensa vacuolização citoplasmática nos hepatócitos. **D.** Represa Billings. A seta indica hiperemia dos vasos hepáticos. Coloração Azul de Toluidina/ Fucsina. Escala 10 µm.

Com o Índice de Alteração Histológica (I.A.H.) e com o Valor Médio de Avaliação (V.M.A.) notou-se modificações estruturais dos animais provenientes da Represa Billings, verificadas nas tabelas 7 e 8 e nas figuras 9 e 10, respectivamente.

Tabela 7- Índice de Alteração Histológica (I.A.H.) das brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano.

Peixes	Brânquias	Fígado
Inverno		
1	42	25
2	42	25
3	42	25
4	39	35
5	42	14
6	42	14
7	53	24
Média	43,14	23,14
Desv. Pad.	±4,49	±7,29
Outono		
8	40	14
9	39	25
10	37	14
11	36	25
12	38	25
13	40	25
Média	38,33	21,33
Desv. Pad.	±1,63	±5,68
Primavera		
14	40	25
15	39	25
16	42	15
17	41	24
Média	40,5	22,25
Desv. Pad.	±1,29	±4,86
Verão		
18	40	25
19	43	24
20	40	15
21	42	15
22	41	25
Média	41,2	20,8
Desv. Pad.	±1,30	±5,31
Controle		
23	14	13
24	15	14
25	14	13
26	15	14
27	14	13
Média	14,4	13,4
Desv. Pad.	±0,55	±0,55



* Diferença significativa $P < 0,05$

Figura 9. Índice de Alteração Histológica (I.A.H.) das brânquias (Brq.) e fígado (Fíg.) de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano.

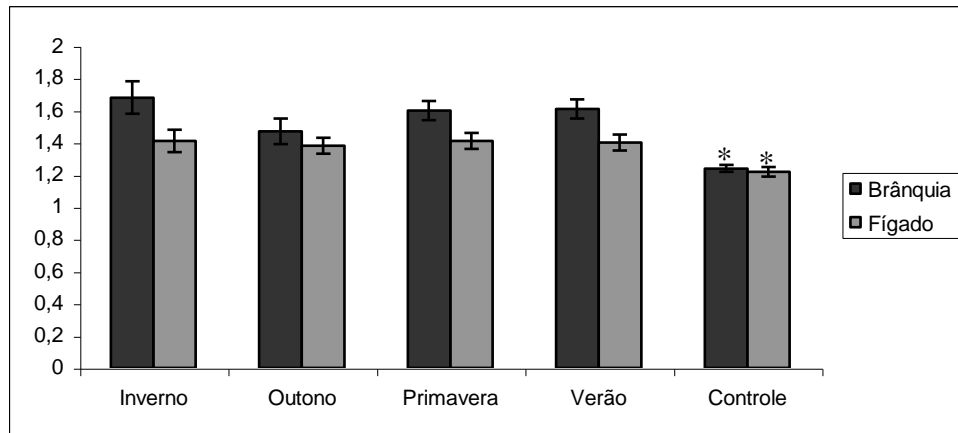
Tabela 8- Valor Médio de Avaliação (V.M.A.) das brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano.

(continua)

Peixes	Brânquias	Fígado
Inverno		
1	1,73	1,45
2	1,65	1,5
3	1,65	1,4
4	1,52	1,5
5	1,65	1,35
6	1,69	1,3
7	1,87	1,4
Média	1,68	1,41
Desv. Pad.	±0,10	±0,07
Outono		
8	1,56	1,3
9	1,39	1,4
10	1,43	1,35
11	1,39	1,4
12	1,48	1,45
13	1,56	1,4
Média	1,47	1,38
Desv. Pad.	±0,08	±0,05
Primavera		
14	1,61	1,45
15	1,65	1,45
16	1,69	1,35
17	1,61	1,4
Média	1,60	1,41
Desv. Pad.	±0,06	±0,05
Verão		
18	1,65	1,45
19	1,69	1,4
20	1,56	1,35
21	1,65	1,35
22	1,61	1,45

Tabela 8- Valor Médio de Avaliação (V.M.A.) das brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano.

	(conclusão)	
Média	1,61	1,4
Desv. Pad.	±0,06	±0,05
Controle		
23	1,22	1,2
24	1,26	1,25
25	1,22	1,2
26	1,26	1,25
27	1,22	1,2
Média	1,24	1,22
Desv. Pad.	±0,02	±0,03



* Diferença significativa $P < 0,05$

Figura 10. Valor Médio de Avaliação (V.M.A.) das brânquias (Brq.) e fígado (Fíg.) de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano.

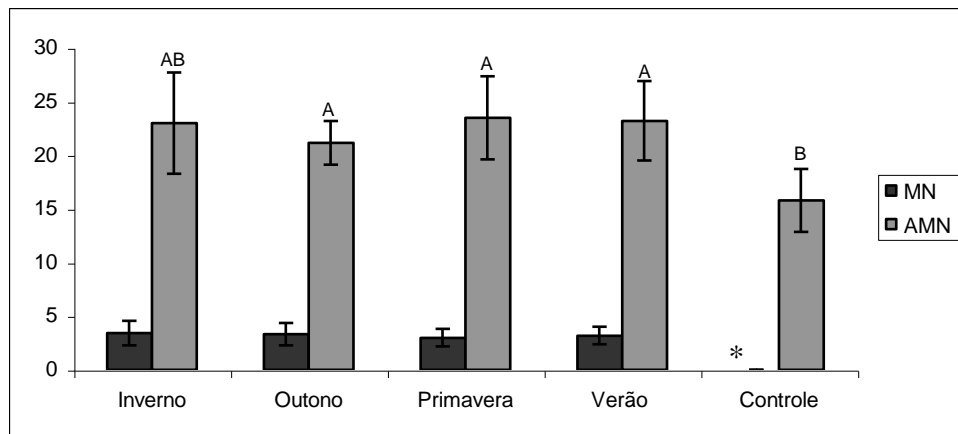
Foi observada diferença estatística tanto do I.A.H. quanto do V.M.A. entre os grupos provenientes da Represa Billings e o grupo controle ($P < 0,05$). Porém entre os pontos da Represa Billings não foi obtida diferença estatística em ambos os índices.

Os animais provenientes da Represa Billings, de todas as estações do ano, tiveram as brânquias e o fígado classificados como órgãos de alterações moderadas a graves. Os animais controle obtiveram uma classificação para ambos os órgãos de alterações leves. Essas diferenças foram refletidas no V.M.A..

A frequência de micronúcleo e a frequência de alterações morfológicas nucleares observadas nas diferentes estações do ano podem ser verificadas na tabela 9 e na figura 11.

Tabela 9- Frequência de micronúcleos (MN) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) em 2.000 eritrócitos de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano.

Peixes	MN	AMN
Inverno		
1	4	18
2	4	22
3	2	31
4	3	27
5	5	24
6	2	19
7	4	20
Média	3,43	23
Desv. Pad.	±1,13	±4,7
Outono		
8	3	20
9	5	21
10	3	22
11	2	24
12	4	22
13	3	18
Média	3,33	21,17
Desv. Pad.	±1,03	±2,04
Primavera		
14	2	19
15	3	28
16	3	25
17	4	22
Média	3	23,5
Desv. Pad.	±0,82	±3,87
Verão		
18	4	20
19	2	24
20	4	19
21	3	28
22	3	25
Média	3,2	23,2
Desv. Pad.	±0,84	±3,70
Controle		
23	0	12
24	0	17
25	0	15
26	0	20
27	0	15
Média	0	15,8
Desv. Pad.	±0	±2,95



* Diferença significativa $P < 0,05$
 AB Diferença significativa $P < 0,05$

Figura 11. Frequência de micronúcleos (MN) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) em 2.000 eritrócitos de *Oreochromis niloticus* em diferentes estações do ano.

Observam-se diferenças estatísticas ($P < 0,05$) da frequência de micronúcleos (Figura 12b) de todos os grupos provenientes da Represa Billings comparando ao grupo controle. Verifica-se diferença estatística ($P < 0,05$) de frequência de A.M.N. (Figura 12c) das estações primavera, outono e verão comparando ao grupo controle (Figura 12a).

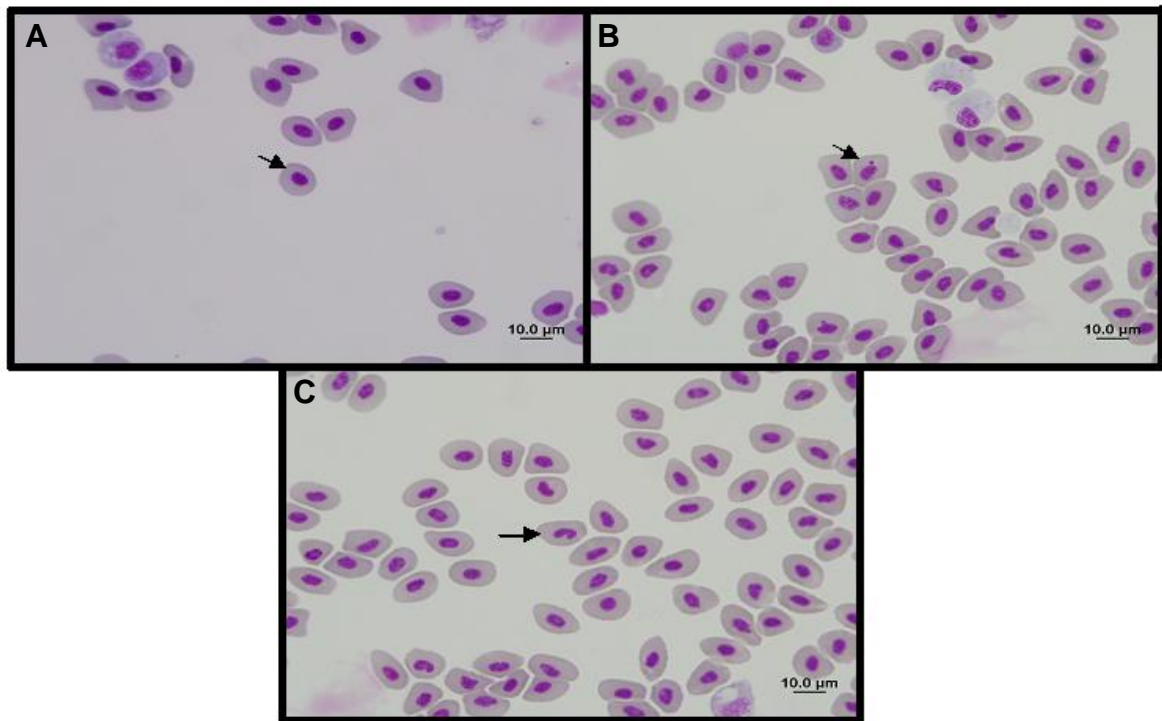


Figura 12. Fotomicrografia de extensão sanguínea de *O. niloticus*. **A.** Controle. A seta indica eritrócito normal. **B.** Represa Billings. A seta indica presença de Micronúcleo. **C.** Represa Billings. A seta indica presença de Alteração Morfológica Nuclear. Coloração Rosenfeld. Escala 10 µm.

Os parâmetros da água avaliados nas diferentes estações do ano estão descritos na tabela 10.

Tabela 10- Parâmetros da água avaliados nas diferentes estações do ano da Represa Billings e da Piscicultura Aquarium.

Parâmetros	(continua)					
	Inverno	Outono	Primavera	Verão	Controle	V.M.P.
Amônia (Como NH ₃) (mg/L)	0,66	3,30	1,2	8	1,45	1,5
Alcalinidade-Hidróxidos (mg/L)	0	0	0	0	0	0
Alcalinidade-Carbonatos (mg/L)	0	0	0	0	0	120
Alcalinidade-Bicarbonatos (mg/L)	52	54	101	83	33	250
Cloreto (mg/L)	33	95	51,5	48	115	250
Cloro Livre (mg/L)	<LD	0,20	<LD	<LD	0,05	5
Condutividade Elétrica (µS/cm)	280	216	334	321	181	N.A.
Cor Aparente (uH)	54	10	1305	14	13,8	15
Dureza (mg/L)	59	45	54	47	45	500
Ferro (mg/l)	0,203	0,01	0,27	14,09	0,795	0,3
Fluoreto (mg/L)	0,22	0,255	0,01	0,03	<LD	1,5
Nitrato (como N) (mg/L)	<LD	0,33	0,77	0,65	0,50	10
Nitrito (como N) (mg/L)	0,003	<LD	<LD	<LD	0,043	1
Oxigênio Consumido (mg/L)	5	2	219	3,3	3,2	3,5
pH	7,03	6,53	6,17	6,2	6,2	6,0 a 9,5
Sílica (mg/l)	2,6	2,3	6,5	6,2	20,4	N.A.
Sólidos Diss. Totais (mg/L)	138	67	189	174	86	1.000

Tabela 10- Parâmetros da água avaliados nas diferentes estações do ano da Represa Billings e da Piscicultura Aquarium.

						(conclusão)
Sulfato (mg/L)	12	9	6	8	11	250
Temperatura	25	24,5	25	25,3	25,5	N.A.
Turbidez	8,48	3,46	291	4,2	3,7	5

LD- Limite de Detecção

V.M.P.- Valor Máximo Permitido

N.A.- Não se aplica

Destaca-se, em relação a estação inverno e primavera, um aumento do valor máximo permitido de oxigênio consumido, turbidez e cor aparente.

Na estação outono e verão notou-se o aumento em relação ao valor máximo permitido da amônia (NH₃). Na estação verão, notou-se ainda um aumento de ferro comparado ao valor máximo permitido. Esse aumento de ferro também foi observado no ponto controle.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na mensuração do comprimento e largura das lamelas secundárias mostram que as brânquias dos peixes provenientes da Represa Billings, não sofreram alterações suficientes que danificassem essa estrutura. Segundo McDonald e Wood (1993), a ausência desses danos, pode estar relacionada a um processo de reparo, onde a recuperação e aclimatação dos tecidos são caracterizadas por um aumento na atividade mitótica e conseqüente troca dos componentes celulares. Portanto, se algum agente estressor estiver afetando as lamelas secundárias, esse resultado pode ser uma forma de adaptação dos peixes aos poluentes encontrados na Represa Billings.

Os aneurismas no tecido branquial, encontrados nas tilápias provenientes da Represa Billings nas diferentes estações do ano, apontam para a morte das células pilares que ocasionaram a perda da integridade estrutural da lamela secundária, fazendo com que ocorresse um acúmulo de células sanguíneas, prejudicando, assim, o fluxo sanguíneo (HEATH, 1987; HEUVEL et al., 2000). Jiraungkoorskul et al (2003) observaram aneurismas similares em *O. niloticus* expostos a glifosato. Foi observado essa alteração também em animais expostos a metais pesados como cádmio (THOPHON et al., 2003) e cobre (KARAN et al., 1998).

Devido à perda de sais por difusão, através das brânquias e tegumento, as células de cloreto, e de outras células do epitélio branquial, têm como função transportar sódio e cloreto da água para o sangue, utilizando ATP e a enzima Na^+/K^+ -ATPase (KARNAKY, 1998). Laurent e Perry (1991) descrevem que alguns metais pesados como, por exemplo, o zinco estimula a proliferação de células de cloreto, acelerando a perda de íons pelo epitélio e dificultando sua absorção. Os peixes da Represa Billings apresentaram hiperplasia de células de cloreto, sendo as mesmas detectadas nas lamelas secundárias. Isso pode ser considerada uma forma de adaptação onde o animal por estar sofrendo grande perda de íons e, aumenta o número de células de cloreto para aumentar o transporte de sódio e cloreto da água para o sangue, mantendo assim o equilíbrio osmótico.

Outra alteração encontrada em todos os grupos de peixes avaliados foi o deslocamento do epitélio branquial que é caracterizado pela separação do epitélio lamelar da lamela secundária, formando um espaço que pode ser preenchido por água, podendo levar à formação de um edema. Essa alteração pode servir como defesa, pois aumenta a distância de difusão entre a água e o sangue, interferindo, entretanto, na eficiência das trocas gasosas e transporte iônico (MALLAT, 1985; THOPHON et al., 2003). O deslocamento lamelar constitui uma das primeiras alterações observadas nas brânquias dos peixes submetidos à exposição aguda a agentes estressores, como óleos, detergentes, amônia, fenóis, ácidos (HEATH, 1987), pesticida organoclorado (NOWAK, 1991), organofosforado (FANTA et al., 2003), glifosato (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2003) e metais pesados como cádmio (THOPHON et al., 2003) e cobre (ARELLANO; STORCH; SARASQUETE, 1999).

Outra alteração relevante encontrada no grupo de peixes provenientes da Represa Billings quando comparados aos peixes dos grupos controle, porém em menor grau de severidade, foi à hiperplasia das células epiteliais. Devido a uma sobrecarga funcional proveniente de determinadas estruturas teciduais, a hiperplasia dessas células pode ser uma forma de crescimento adaptativo (POTEL, 1974; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995), onde a distância de difusão poluente-sangue é aumentada numa tentativa de minimizar os efeitos deletérios dos mesmos. Em muitos casos, em decorrência da hiperplasia, pode haver a fusão das lamelas secundárias, porém, no presente estudo, foi encontrada, nos grupos de peixes provenientes da Represa Billings a fusão parcial, ou seja, a hiperplasia se restringiu à base ou somente a uma porção das lamelas secundárias, o que dificulta as trocas gasosas, pois reduz a área respiratória total (HEATH, 1987; HINTON et al., 1992; MACHADO e FANTA, 2003).

A hiperplasia foi observada em estudos envolvendo brânquias de peixes contaminados com metais pesados como o cobre (KARAN et al., 1998; ARELLANO; STORCH; SARASQUETE, 1999) e cádmio (THOPHON et al., 2003), além de contaminação por organofosforado (MACHADO e FANTA, 2003), pesticida organoclorado (NOWAK, 1991) e glifosato (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2003).

Por meio da análise físico-química da água do reservatório Billings, notou-se que nas estações outono e verão houve um aumento do valor máximo permitido de amônia

não ionizada. Essa forma torna-se mais tóxica para os organismos aquáticos pelo fato das membranas dos peixes serem relativamente permeáveis e que, segundo Arana (2004), pode causar hiperplasia das células epiteliais como uma resposta morfológica de adaptação ao meio.

O deslocamento 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 (HINTON et al., 1992).

Em todos os grupos analisados observaram-se infiltrados de eosinófilos que pode estar ligado à defesa contra helmintos e a modulação do processo inflamatório uma vez que os eosinófilos têm como principal produto grânulos específicos e substâncias farmacologicamente ativas. Observaram-se também em todos os grupos, infiltrados de basófilos que são mediadores da inflamação por possuir grânulos específicos contendo histamina e heparina (BANKS, 1991). Os resultados verificados podem ser interpretados como uma infiltração decorrente de uma inflamação crônica.

Hiperplasia de células mucosas foi observada em todas as estações do ano nos animais provenientes da Represa Billings ao longo da lamela secundária. Essas células possuem muco contendo imunoglobulinas e enzimas, portanto uma camada de muco mais espessa pode atuar como um filtro, coagulando e precipitando partículas e microorganismos em suspensão e, assim, minimizando os danos a lamela. Metais pesados como cádmio, chumbo, zinco e o cobre estimulam a secreção de muco por essas células (HEATH, 1987); e os microorganismos são agregados (LICHTENFELS, 1996).

Em relação às alterações histológicas hepáticas, a vacuolização citoplasmática foi observada frequentemente em todas as estações do ano nos peixes provenientes da Represa Billings indicando a existência de regiões com provável concentração de lipídeos e glicogênio que ocorre naturalmente nos hepatócitos (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995). Uma intensa vacuolização citoplasmática, também foi encontrada em todos os grupos dos animais provenientes da Represa Billings isto pode ser um indicativo de processos degenerativos decorrentes de problemas metabólicos, possivelmente, devido à exposição de contaminantes (PACHECO e SANTOS, 2002).

A hiperemia dos vasos hepáticos foi observada em todos os grupos de estudo, porém, de forma mais branda no grupo controle. A hiperemia indica um aumento do fluxo sanguíneo no tecido hepático, o que pode facilitar o transporte de nutrientes e também melhorar a oxigenação destas áreas atuando como um mecanismo auxiliar na desintoxicação. Assim, segundo Anderson e Zeeman (1995), a hiperemia pode ser considerada indicador de estresse em peixes decorrente da presença de xenobióticos.

Outra alteração encontrada nos grupos de peixes provenientes da Represa Billings foi à degeneração nuclear dos hepatócitos, fazendo com que as áreas metabolicamente ativas do fígado sejam reduzidas, levando a um possível declínio nas funções desempenhadas por este órgão (HINTON et al., 1992; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; TEH; ADAMS; HINTON, 1997). Nos mesmos animais, foi observado hipertrofia nuclear dos hepatócitos, o que indica o aumento das atividades dos mesmos. Essa alteração sugere uma intensificação da atividade metabólica (HINTON et al., 1992; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995). A hipertrofia pode ser uma adaptação do animal para suprir as necessidades metabólicas comprometidas pela degeneração nuclear causada por algum xenobiótico.

As alterações histológicas hepáticas encontradas neste estudo são semelhantes a encontradas por outros pesquisadores, entre eles, Santos et al. (2004) que analisou *O. niloticus* criados em tanques- redes da Represa Guarapiranga.

As alterações histológicas branquiais e hepáticas dos animais provenientes da Represa Billings são similares nos dois pontos de colheita (imigrantes e 2ª balsa) e em todas as estações do ano. Vale ressaltar, que essas alterações também são semelhantes àquelas observadas em outros estudos, confirmando que o reservatório sofreu impacto ambiental.

As Tilápias do Nilo estão presentes no topo da cadeia alimentar, portanto, o aumento da frequência de micronúcleos observada nas amostras provenientes da Represa Billings indica uma bioacumulação de substâncias genotóxicas que podem causar mutagênese e até mesmo carcinogênese (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004). Em alguns estudos foram observados micronúcleos por ação de benzeno (AL-SABTI, 2000; BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006) e glifosato (GRISOLIA e STARLING, 2001).

Em relação à análise físico-química da água da Represa Billings, notou-se um aumento no valor máximo permitido de oxigênio consumido nas estações inverno e primavera, causado, provavelmente, por despejos de origem predominantemente orgânica de origem antrópica. Esses despejos aumentam a demanda de oxigênio para oxidar a matéria orgânica em forma inorgânica estável por decomposição microbiana aeróbia. Segundo CETESB (2009), a presença de alto teor de matéria orgânica pode induzir a completa extinção do oxigênio na água, podendo provocar o desaparecimento dos peixes e outros organismos aquáticos.

O aumento do valor máximo permitido da turbidez e cor aparente encontrado na análise da água da Represa Billings nas estações inverno e primavera, condiz com as análises da CETESB (2009), que descreve esse aumento como provável excesso de deposição de matéria orgânica nos corpos de água. Essa condição estimula a proliferação de algas as quais recobrem a superfície de água dificultando a penetração dos raios solares e, exalam um odor desagradável.

A amônia que é um metabólito proveniente da excreção nitrogenada dos peixes e outros organismos aquáticos e da decomposição microbiana de resíduos orgânicos (restos de alimento, fezes e adubos orgânicos) (KUBITZA, 1998), apresentou um aumento do valor máximo permitido nas águas da Represa Billings nas estações outono e verão. Em ambientes aquáticos, a amônia se apresenta duas formas: a forma ionizada (NH_4^+) que apresenta grande capacidade de difusão através da membrana epitelial dos organismos aquáticos e a forma não ionizada (NH_3), que é altamente tóxica para a maioria desses organismos podendo afetar perigosamente a capacidade que os mesmos têm de transportar o oxigênio para os tecidos (ARANA, 2004).

O aumento de ferro na estação verão tanto nas águas da Represa Billings como nas águas controle, pode estar relacionada às chuvas frequentes dessa estação causando carreamento de solos e ocorrência de processos de erosão das margens. Esse aumento da concentração de ferro pode estar relacionado, também, a efluentes industriais. Segundo CETESB (2009), o ferro apesar de não ser considerado um metal pesado, em concentrações acima de 0,3 mg/l pode se tornar tóxico aos animais aquáticos e conferir cor e sabor à água.

Os dados obtidos no presente trabalho podem representar segundo Laurent e Perry (1991), uma estratégia adaptativas das Tilápias do Nilo provenientes da Represa Billings para a conservação de algumas funções fisiológicas. Vale ressaltar que esses animais estão expostos a diversos contaminantes tornando improvável, segundo Lichtenfels (1996), que as alterações encontradas sejam atribuídas a poluentes individuais, mas sim, a um conjunto de fatores que inclui: a quantidade e a qualidade de poluentes; a interação sinérgica entre os mesmos e a interação poluentes e o ecossistema.

Este trabalho mostrou pela primeira vez, o efeito da poluição da Represa Billings, sobre as brânquias, fígado e sangue, em exemplares de Tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes estações do ano utilizadas na região para consumo humano.

6 CONCLUSÃO

- Avaliação histopatológica de brânquias e fígado, assim como a frequência de micronúcleo, de *Oreochromis niloticus*, da Represa Billings, permite concluir que as alterações encontradas estão relacionadas à ação de substâncias genotóxicas ou xenobióticos presentes na água da represa;

- As alterações observadas no tecido branquial e no tecido hepático indicam comprometimento das funções desses órgãos;

- Frequências de micronúcleo bem como as alterações histológicas de brânquias e fígado foram importantes instrumentos utilizados para avaliar a qualidade da Represa Billings;

- A espécie Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) demonstrou ser uma ótima bioindicadora de contaminação ambiental;

- Este estudo indica que o consumo humano de *O. niloticus* da Represa Billings pode gerar problemas de saúde pública.

REFERÊNCIAS*¹

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85C, p. 5-9, 1986.

AL-SABTI, K. Chlorotriazine Reactive Azo Red 120 Textile DyeInduces Micronuclei in Fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 149-155, 2000.

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

APPLEYARD, S. A.; RENWICK, J. M.; MATHER, P. B. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L.) cultured under Fijian conditions. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 287-296, 2001.

ARANA, L. V. **Princípios químicos de qualidade da água em aqüicultura: uma revisão para peixes e camarões**. 2. ed. Santa Catarina: UFSC, 2004. p. 65-69.

ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, p. 62-72, 1999.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice in of histological technicians**. 2nd ed. London: Churchill, 1982. 662 p.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p. 383-392, 2001.

BRUSLÉ, J.; GONZÁLEZ, G.; ANADON, G. G. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M. **Fish Morphology Horizon of New Research**. Lebanon: Science Publishers Inc., 1996. p. 77-93.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutogênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**, v. 36, p. 357-364, 2006.

CAPOBIANCO, J. P. R.; WHATELY, M. **Billings 2000**: Ameaças e perspectivas para o maior reservatório de água da região metropolitana de São Paulo. São Paulo: Instituto Socioambiental, 2002.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine Orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 107-111, 2005a.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264-271, 2005b.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo 2008**. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo, 2009. 540 p.

CONSÓRCIO HIDROPLAN. Plano integrado de aproveitamento e controle dos recursos hídricos das bacias Alto Tietê, Piracicaba e Baixada Santista. **Hidroplan**, v. 6, p. 43, 1995.

DEY, M. M.; GUPTA, M. V. Socioeconomics of disseminating genetically improved Nile tilapia in Asia: an introduction. **Aquaculture Economics Management**, v. 4, p. 5-11, 2000.

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.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29-36, 1985.

GALLI, L. F.; TORLONI C. E. C. **Criação de peixes**. São Paulo: Nobel, 1999.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, v. 491, p. 39-44, 2001.

HAYASHI, M. et al. Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v. 399, p. 125-133, 1998.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1987.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-190, 1973.

HEDDLE, J. A. et al. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**, v. 18, p. 277-291, 1991.

HEPHER, B.; PRUGININ, Y. **Commercial fish farming**. New York: Wiley, 1981.

HEUVEL, M. R.; POWER, M.; RICHARDS, J.; MACKINNON, M.; DIXON, D. G. Disease and gill lesions in Yellow Pech (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-Associated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 334-341, 2000.

HINTON, D. E. et al. Histopathologic biomarkers. In: HUGGET, R. J. et al. **Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. p.155-209.

HOOFTMAN, R. N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p. 147-152, 1982.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para a avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 680-693, 2008.

JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, v. 18, p. 260-267, 2003.

JORY, D. E.; ALCESTE, C.; CABRERA, T. R. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de norteamérica. **Panorama Acuícola**, v. 5, p. 50-53, 2000.

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

KARNAKY JR., K. J. Osmotic and ionic regulation. In: EVANS, D. H. (Ed.) **The physiology of fishes**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. Cap. 7, p. 157-176.

KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, v. 45, p. 35-41, 1998.

LAURENT, P.; PERRY, S. F. Environmental effects on fish gill morphology. **Physiology Zoology**, v. 64, p. 4-25, 1991.

LICHTENFELS, A. J. E. C. et al. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. **Journal Comparative Pathology**, v. 115, p. 47-60, 1996.

MACHADO, M. R.; FANTA, E. Effects of the Organophosphorous Methyl Paraterion on the Branchias Epithelium of a Frescwater Fisch *Metynnis roosevelti*. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 46, p. 361-372, 2003.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal Fisheries Aquatic Science**, v. 42, p. 630, 1985.

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MC ANDREW, B. J. Evolution, phylogenetic relationship and biogeography. In: BEVERIDGE, M. C. M.; MC ANDREW, B. J. **Tilapias: Biology and Exploitation** Kluwer. Norwell: Academic Publishers, 2000. p. 1-3.

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives Pathology Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414, 1976.

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. **Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, 2003. p. 149-180.

MORGAN, M.; TOWELL, P. W. A. The structure of the gill of the *Salmo Gairdneri* (Richardson). **Zoology Zellforsch**, v. 142, p. 147-162, 1973.

NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endossulfan. **Aquatic Toxicology**, v. 23, p. 65-84, 1992.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109-149, 2004.

OOST, R. V. D.; BEYER J.; VERMEULEN N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

ORLANDO, E. F. et al. A comparison of the reproductive physiology of the largemouth bass, *Micropterus salmoides*, collected from the Escambia and Blackwater rivers in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 199-204, 1999.

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.

PALHARES, D.; GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 281-284, 2002.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. **Suletha and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Rome: FAO, 1994. p. 339-352.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Alabama: Internacional center for aquaculture and aquatic environments, 1996. 23 p.

POTEL, K. **Tratado de anatomia patologica general veterinaria**. Zaragoza: Acribia, 1974. 278 p.

POVH, J. A. et al. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, p. 1-10, 2005.

ROCHA, A. A.; PEREIRA, D. N.; PÁDUA, H. B. Produtos de pesca e contaminantes químicos na água da Represa Billings, São Paulo (Brasil). **Revista Saúde Pública**, v. 19, p. 401-410, 1985.

ROSENFELD, G. Corante pancromico para hematologia e citologia clínica, nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

SANTOS, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; RODRIGUES, E. L. Análise histológica de fígado de Tilápias-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na Represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim Instituto Pesca**, v. 30, p. 141-145, 2004.

SCHMALZ, W. F.; HERNANDEZ, A. D.; WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Environmental Research**, v. 54, p. 539-542, 2002.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Principles and Methods for Their Detection. **Hollaender**, v. 4, p. 31-53, 1975.

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

SENDACZ, S.; KUBO, E. Zooplâncton de reservatórios do Alto Tietê. In: HENRY, R. **Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos sociais**. Botucatu: FAPESP; Fundibio, 1999. p. 509-530.

SOUZA, T. S.; FONTANELLI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluents. **Mutation Research**, v. 605, p. 87-93, 2006.

STEGEMAN, J. J. et al. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R. J. et al. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress**. Chelsea: SETAC/Lewis Publishers, 1992. p. 235-335.

STICKNEY, R. R. Tilapia update 1996. **World Aquaculture**, v. 28, p. 20-25, 1997.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **Fish histology - normal and pathological features**. Tokyo: Kodansha, 1995.

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

THOPHON, S.; KRUAETRACHUE, 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.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA- TUNDISI, T.; CALIJURI, M. C. Limnology and management of reservoirs in Brazil. In: STRASKRABA, M.; TUNDISI, J. G.; DUCAN **Comparative reservoir limnology and water quality management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 25-55.

ZELIKOFF, J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals?. **Toxicology**, v. 129, p. 63-71, 1998.