



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THIAGO RUSSELL MIGUEL SANTOS

**ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS DE TILÁPIAS E CURIMBAS
EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS NIM E ROUNDUP**

LONDRINA
2005

THIAGO RUSSELL MIGUEL SANTOS

**ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS DE BRÂNQUIAS E RIM DE
CURIMBAS E TILÁPIAS EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS
NIM E ROUNDUP**

Monografia apresentada ao curso de Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Estadual
de Londrina, como requisito parcial para o Título
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Claudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2005

THIAGO RUSSELL MIGUEL SANTOS

**ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS DE BRÂNQUIAS E RIM DE
CURIMBAS E TILÁPIAS EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS
NIM E ROUNDUP**

Monografia apresentada ao curso de Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Estadual
de Londrina, como requisito parcial para o Título
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Claudia Bueno dos Reis Martinez

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Dra. Silvia Helena Sofia

Ms. Marina Mori Pires de Camargo

Londrina, 12 de dezembro de 2005.

Agradecimentos

Agradeço acima de tudo à minha mãe, a pessoa responsável por me dar a oportunidade de morar e estudar fora da minha cidade natal. A pessoa que não só me deu , como me ensinou a vida. O meu maior exemplo, obrigado por tudo! E a minha irmãzinha querida, Vanessita, a melhor irmã! Amo vocês!!! Muita coisa se passou, muita ainda está pra vir, mas o que importa é que estaremos sempre juntos pro que der e vier...

A minha grande Orientadora Cláudia Bueno dos Reis Martinez, pela força, ensinamentos, compreensão, carinho, dedicação e pela paciência. Um beijo enorme Cláudia, obrigado por tudo!

A minha companheira de Nim, Elis Ulbricht Winkaler;

A minha companheira de Roundup, Vivian do Carmo Langiano;

Marta Marques de Souza e Silvia Helena Sofia, pela atenção, amizade e pelos dias bem humorados!

A todos os bons professores da Biologia, que me ensinaram e me despertaram pra vida;

A maravilhosa turma de Biologia, amigos de diferentes partes, mas com sentimentos semelhantes, com algumas exceções é claro;

A todo o pessoal do LEFA, excelentes companheiros de trabalho: Andressa (Simplesmente demais), Lígia, Marina, Enê, Alexandre, Bruno Galindo, Bruno Blotta, Gabriel, Lindalva, Catarina, Laura, Indi, Juliana Schiett, Juliana Simonato, Juliana Ruiz e Juliana. Fica aqui o meu muito obrigado;

Aos meus amigos, em especial aos Mussum-Manos, minha segunda família;

Aos peixes e meu querido cão Mussum;

E finalmente à música, por tornar o meu mundo muito mais agradável e feliz, em especial aos robôs Kraftwerk, que acompanharam os meus estudos e experimentos... MUSIC NON STOP !!!
Um beijo em todos, `` Que a força esteja com vocês ``

SANTOS, Thiago Russell Miguel. **Análises histopatológicas de brânquias e rim de curimbas e tilápias expostos aos agrotóxicos nim e Roundup.** 2005. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina.

Resumo

O comércio de pesticidas vem crescendo mundialmente a cada ano. O Roundup é um herbicida muito usado para eliminar plantas indesejáveis não apenas em meios agrícolas, mas também urbanos, domésticos, aquáticos e florestais. Os peixes e os invertebrados aquáticos são os mais sensíveis a este herbicida e aos outros componentes de seus produtos comerciais. Na tentativa de se evitar os diversos problemas causados pelos produtos artificiais, nos últimos anos, tem se utilizado cada vez mais de produtos naturais, como os de origem vegetal em detrimento de produtos sintéticos. Um exemplo bem significativo de planta utilizada como inseticida é o nim (*Azadirachta indica*), que vem sendo bastante pesquisada e utilizada principalmente no controle de pragas, mostrando ser muito eficiente e apresentando resultados bem promissores. Na busca de uma melhoria na produção de peixes, seja no combate de insetos que se alimentam de alevinos ou de parasitas que afetam os peixes, as pisciculturas têm se utilizado amplamente desses produtos originários do nim. Os possíveis efeitos de contaminantes nos peixes podem ser avaliados através da utilização de alguns parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, comumente chamados de biomarcadores. As alterações histopatológicas nos peixes se mostram instrumentos bastante eficazes para a detecção de efeitos diretos causados por compostos químicos em órgãos-alvo de peixes, tais como as brânquias e o rim. O presente estudo teve como objetivos avaliar a ocorrência de alterações histológicas nas brânquias e rim posterior de curimbas (*Prochilodus lineatus*) expostos ao herbicida Roundup e de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e *P. lineatus* expostos ao biopesticida nim e analisar a severidade dessas alterações no comprometimento da função normal dos órgãos. O curimba é um peixe neotropical e a tilápia uma espécie exótica. Para a realização dos experimentos, os órgãos foram retirados e fixados em Bouin, diafanizados em xilol e incluídos em parafina, os cortes corados com H.E, e por fim analisados em microscópio de luz para as análises das alterações morfológicas. As alterações foram avaliadas de acordo com o índice de alteração histopatológica (IAH) e o valor médio de alterações histológicas (VMA). Os resultados indicam que o Roundup demonstrou ser tóxico para curimbas, promovendo alterações histológicas brandas nas brânquias e severas no rim. O biopesticida nim também promoveu alterações semelhantes em curimbas e tilápias. As duas espécies de peixes estudadas, apresentaram sensibilidade semelhante quanto a exposição ao nim. Para ambas as espécies de peixes estudadas o rim mostrou-se muito mais sensível aos pesticidas do que as brânquias.

Palavras-chave: Roundup, Nim, Peixes, Biomarcadores histológicos.

Lista de Tabelas

TABELA 1: Frequência das alterações branquiais em curimbas expostos a 10 ppm de Roundup (grupo experimental) ou apenas a água (grupo controle), durante 24 e 96 horas.....	25
TABELA 2: Frequência das alterações branquiais em curimbas expostos ao nim por 24 horas nas concentrações de 0 (grupo controle), 2,5; 5,0 e 7,5 g.L ⁻¹	27
TABELA 3: Frequência das alterações branquiais em tilápias expostas ao nim (grupo experimental) na concentração de 2,5 g.L ⁻¹ ou apenas à água (grupo controle), durante 24 e 96 horas.....	30
TABELA 4: Frequência das alterações renais em curimbas expostos a 10 ppm de Roundup (grupo experimental) ou apenas a água (grupo controle), durante 24 e 96 horas.....	33
TABELA 5: Frequência das alterações renais em curimbas expostos, durante 24 horas, ao extrato aquoso de folhas de nim nas concentrações 0 (grupo controle), 2,5; 5,0 e 7,5 g.L ⁻¹	34
TABELA 6: Frequência das alterações renais em tilápias expostas ao nim (grupo experimental) na concentração de 2,5 g.L ⁻¹ ou apenas à água (grupo controle), durante 24 e 96 horas.....	35

Lista de Figuras

FIGURA 1: Figura mostrando os quatro arcos branquiais, filamentos e lamelas dos teleósteos...	21
FIGURA 2: Fotomicrografia mostrando lamelas branquiais dispostas ao longo do filamento de uma brânquia sem alterações histológicas.....	22
FIGURA 3: Fotomicrografia de rim de tilápia exposta por 24h ao Nim, mostrando as principais características de um cospúsculo renal.....	24
FIGURA 4: Fotomicrografia mostrando um rim de curimba sem alterações histológicas.....	24
FIGURA 5: Fotomicrografia de brânquia de <i>Prochilodus lineatus</i> exposto ao Roundup.....	26
FIGURA 6: Fotomicrografia de brânquia de <i>Prochilodus lineatus</i> exposto ao Nim [5,0 g.L].....	28
FIGURA 7: Fotomicrografia de brânquia de <i>Prochilodus lineatus</i> exposto ao Nim [7,5 g.L].....	28
FIGURA 8: Fotomicrografia de brânquia de <i>Prochilodus lineatus</i> exposto ao Nim [7,5 g.L].....	29
FIGURA 9: Fotomicrografia de rim de curimba exposto ao Roundup [10 ppm] por 96 horas.....	31
FIGURA 10: Fotomicrografia de rim de <i>Prochilodus lineatus</i> exposto ao Roundup [10ppm] por 24 horas.....	31
FIGURA 11: Fotomicrografia de rim de <i>Prochilodus lineatus</i> exposto ao Roundup [10ppm] por 96 horas.....	32
FIGURA 12: Valor Médio de Alteração (VMA) determinado para brânquia de curimbas expostos ao Roundup.....	37
FIGURA 13: Índice de Alteração Histopatológica (IAH) determinado para brânquias de curimbas expostos ao Roundup.....	37

FIGURA 14: Valor Médio de Alteração (VMA) de brânquias de curimbas expostos ao nim por 24 horas.....	38
FIGURA 15: Índice de Alteração Histopatológica (IAH) de brânquias de curimbas expostos ao nim por 24 horas.....	38
FIGURA 16: Valor Médio de Alteração (VMA) de brânquias de tilápias expostas na concentração de 2,5 g.L ⁻¹ do extrato aquoso da folha de nim.....	39
FIGURA 17: Índice de Alteração Histopatológica (IAH) de brânquias de tilápias expostas na concentração de 2,5 g.L ⁻¹ do extrato aquoso da folha de nim.....	39
FIGURA 18: Valor médio de alteração (VMA) determinado para rim de curimbas expostos ao Roundup [10 ppm].....	41
FIGURA 19: Índice de Alteração Histopatológica (IAH) determinado para rim de curimbas expostos ao Roundup.....	41
FIGURA 20: Valor médio de alteração (VMA) de rins de curimbas expostos ao nim por 24 horas.....	42
FIGURA 21: Índice de Alteração Histopatológica (IAH) de rim de curimbas expostos ao nim por 24 horas.....	42
FIGURA 22: Valor médio de alteração (VMA) de rins de tilápias expostas na concentração de 2,5 g.L ⁻¹ do extrato aquoso da folha de nim.....	43
FIGURA 23: Índice de Alteração Histopatológica (IAH) de rim de tilápias expostas na concentração de 2,5 g.L ⁻¹ do extrato aquoso da folha de nim.....	43

Sumário

1. INTRODUÇÃO	09
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Gera	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Espécies estudadas	16
3.2 Testes de toxicidade	16
3.3 Processamento histológico	18
3.4 Análises morfológicas	19
3.5 Análises estatísticas	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Caracterização histológica das brânquias	21
4.2 Caracterização histológica do rim	23
4.3 Alterações histológicas observadas nas brânquias	25
4.4 Alterações histológicas observadas no rim	30
4.5 Análises semi-quantitativas das lesões branquiais	35
4.6 Análises semi-quantitativas das lesões renais	39
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. Introdução

A formação de grandes aglomerados urbanos e industriais, com crescente necessidade de água para o abastecimento doméstico e industrial, além de irrigação e lazer, faz com que hoje, a quase-totalidade das atividades humanas seja cada vez mais dependente da disponibilidade das águas continentais. A dependência do homem moderno dos ecossistemas aquáticos é ainda mais evidente nas regiões altamente industrializadas, nas quais a demanda de água ``per capita`` tem se tornado cada vez maior. Além disto, nestas regiões, grande parte dos efluentes domésticos e industriais é lançada diretamente nos corpos d'água, reduzindo ainda mais a possibilidade de utilização dos recursos hídricos (ESTEVES, 1988).

Os compostos nocivos que promovem a poluição aquática são inúmeros e derivam principalmente de efluentes domésticos, agrícolas e industriais. As substâncias tóxicas podem ter efeitos prejudiciais bastante visíveis quando presentes em grandes quantidades nos organismos, ao passo que, em quantidades diminutas os produtos tóxicos podem causar efeitos diversos não aparentes (RAND, PETROCELLI, 1985; RAND, 1995). Existe um número enorme de poluentes que afetam o ambiente aquático. Os xenobióticos, como são definidas as substâncias químicas estranhas aos sistemas biológicos, podem ser tóxicos para os organismos aquáticos.

Entre os vários poluentes que atingem os ambientes aquáticos incluem-se os pesticidas. O comércio de pesticidas vem crescendo mundialmente a cada ano. Com as inúmeras inovações e tecnologias desenvolvidas nos setores agrícolas, o uso dos herbicidas é destacado visto que a maioria destas inovações não impede o florescimento de ervas daninhas no campo.

Dos vários herbicidas utilizados, um produto amplamente empregado, representando cerca de 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos é o glifosato, também conhecido pelos nomes comerciais Roundup e Rodeo (AMARANTE et al., 2002). O glifosato é um herbicida

muito usado para eliminar plantas indesejáveis não apenas em meios agrícolas, mas também urbanos, domésticos, aquáticos e florestais. A maioria dos produtos à base de glifosato é feita ou usada com surfactante, que auxilia a penetração do produto no tecido celular das plantas, alguns destes são irritantes sérios, tóxicos para peixes. O surfactante usado no produto mais comum à base de glifosato, o Roundup, é mais tóxico que o glifosato puro, resultando em uma contaminação ainda mais tóxica (COX, 1998).

Apesar de serem citados como pouco tóxicos e descritos pelos fabricantes como pesticidas de “baixa toxicidade e boa compatibilidade ambiental”, os herbicidas à base de glifosato oferecem uma série de riscos para a saúde e meio ambiente, havendo evidências de efeitos deletérios no ambiente, principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de ervas, após o uso prolongado do herbicida (AMARANTE et al., 2002). Estudos laboratoriais detectaram efeitos adversos em todas as categorias de testes toxicológicos, entre eles a toxicidade a médio e longo prazo, danos genéticos, efeitos reprodutivos e carcinogênicos (COX, 1998).

Em relação a contaminação da água, a aplicação direta do herbicida em águas superficiais pode ser responsável pela presença de glifosato em água potável. A toxicidade do glifosato em ambientes aquáticos é acentuada com o aumento da temperatura e do pH (AMARANTE et al., 2002). Quando rapidamente adsorvido pelas partículas do solo, não apresenta as características químicas de um pesticida que escoar para dentro da água, entretanto pode mobilizar-se superficialmente através da água quando as partículas de solo às quais está adsorvido são carregadas para rios e riachos. No caso do uso em água, o glifosato pode ser adsorvido pelos sedimentos, sendo carregado por estes (AMARANTE et al., 2002).

Os peixes e os invertebrados aquáticos são os mais sensíveis a este herbicida e aos outros componentes de seus produtos comerciais. Geralmente o glifosato é ligeiramente tóxico para mamíferos e peixes, mas ele pode causar um impacto no ambiente aquático e também em outros

organismos aquáticos (USDA, 1984). Os efeitos subletais que este herbicida pode causar são muito válidos para se ter uma avaliação de sua toxicologia. A toxicidade aguda do glifosato tem sido investigada em diferentes espécies de peixes, e em diferentes condições ambientais (características físico-químicas da água, pH, temperatura, etc.) (MITCHELL et al., 1987).

Alguns experimentos científicos têm examinado o uso de herbicidas em ecossistemas terrestres e a toxicidade de herbicidas em animais (MEDINA et al., 1994; PISKA, WAGHRAY, 1997). Entretanto, muito pouco se sabe sobre a sua toxicidade em ecossistemas aquáticos, incluindo os peixes.

Nos últimos anos, na tentativa de se evitar os diversos problemas causados pelos produtos artificiais têm se utilizado cada vez mais os produtos naturais, como os de origem vegetal em detrimento de produtos sintéticos, visando buscar o controle de pragas e doenças. Um exemplo bem significativo de planta utilizada como inseticida é o nim (*Azadirachta indica*), que vem sendo bastante pesquisada e utilizada principalmente no controle de pragas, mostrando ser muito eficiente e apresentando resultados bem promissores. Extratos de folhas e de sementes de nim e cinamomo contêm vários compostos ativos, dos quais, azadiractina, salanina, meliantriol e nimbim são os principais e que possuem comprovada ação inseticida (HARIKRISHNAN et al., 2003).

A árvore do nim é originária da Índia e pertence à família Meliaceae, a mesma da santa-bárbara e do mogno, seu porte varia de 15 a 20m de altura e de 30 a 80cm de diâmetro e vem sendo utilizada como planta medicinal há séculos e mais recentemente como inseticida, adubo e para produção de madeira (MARTINEZ, 2002). No Brasil, as primeiras introduções da planta para estudo como inseticida foram feitas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em Londrina (MARTINEZ, 2002).

Para a utilização do nim preparam-se extratos aquosos ou alcoólicos das folhas, das sementes e da casca, podendo também utilizar folhas secas ou em pó e sementes em pó. Assim são formados produtos biodegradáveis que apresentam diferentes intensidades de ação repelente. Como esse biopesticida tem mostrado alta eficiência no controle de insetos, fácil preparação, custo relativamente baixo, e considerando-se ainda que seus compostos são solúveis em água, este composto tem sido amplamente utilizado em piscicultura; seja no combate de insetos que se alimentam de alevinos, de parasitas que afetam os peixes ou até mesmo com função bactericida (DAS et al., 1999). Tal uso, mesmo com aplicações em baixas concentrações, necessita de um estudo aprofundado para verificar se realmente os produtos tóxicos derivados da planta não afetam significativamente a saúde dos peixes, podendo assim alterar diversas funções fisiológicas destes animais (OMOREGIE, OKPANACHI, 1997).

Quando ecossistemas aquáticos estão poluídos com contaminantes orgânicos e inorgânicos, os peixes serão quase que inevitavelmente contaminados (STREIT, 1998). Os possíveis efeitos de contaminantes nos peixes podem ser avaliados por meio da utilização de biomarcadores, que são definidos como as respostas biológicas, assim como os efeitos, provocados pelos poluentes e que identificam sinais de danos iniciais nos peixes (MARTINEZ, CÓLUS, 2002). Estes biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas modernos de monitoramento ambiental (WALKER et al., 1996).

As alterações histológicas em tecidos de peixes são biomarcadores de exposição a estressores ambientais e sinalizam os efeitos e/ou respostas resultantes da exposição a um ou mais agentes tóxicos. Essa categoria de biomarcadores tem a vantagem de permitir o exame de órgãos-alvo e células específicas em animais expostos a poluentes tanto em condições de laboratório como no campo (HINTON *et al.*, 1992) e representa um instrumento bastante eficaz

para a detecção de efeitos diretos causados por compostos químicos em órgãos-alvo. Portanto, a análise da ocorrência de alterações histológicas em peixes que foram expostos a algum tipo de contaminante é um método muito empregado para se avaliar o efeito do agente tóxico na morfologia do órgão em estudo.

As brânquias atuam como órgãos-alvo dos peixes para os contaminantes, pois estão em contato permanente com o ambiente aquático. Frequentemente, são os primeiros órgãos afetados pelos poluentes (HEATH, 1987). Esse órgão atua como interface entre o animal e o ambiente, constituindo o local de tomada e de depuração de contaminantes, onde a detoxificação e o metabolismo dos agentes tóxicos podem ocorrer (STAGG et al., 1992). Já os rins recebem um grande fluxo sanguíneo e podem ser considerados, assim como as brânquias, órgãos-alvo para agentes químicos (HINTON et al., 1992; EVANS 1993). Conseqüentemente, alterações branquiais e renais podem ocorrer em razão da introdução de agentes tóxicos na água e serem utilizadas como parâmetros para o monitoramento ambiental (MEYERS, HENDRICKS, 1985; SCHWAIGER et al., 1997).

A Aqüicultura é uma das áreas que, nos últimos anos, mais tem se expandido no Brasil, destacando-se a piscicultura de água doce, em decorrência do desenvolvimento de tecnologias adequadas à intensificação da produção. O curimba e a tilápia são peixes com significativo valor econômico, o que aumenta a importância como objetos de estudo para a toxicologia.

A espécie de peixe *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecida como curimba, é considerada uma das espécies mais importantes nos rios da região Sul e Sudeste do Brasil (GODOY, 1975) onde apresenta importância econômica e comercial, sendo utilizada largamente na alimentação humana. O curimba é um peixe de grande potencial para a piscicultura, por apresentar bom crescimento, resistência a baixas temperaturas durante o inverno e boa resistência

ao manejo, sendo ainda uma espécie bem estudada quanto a sua biologia (CAETANO FILHO, 1993).

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) foi introduzida no Brasil em 1953, é uma espécie de peixe bastante versátil na piscicultura, pois se adapta tanto ao cultivo extensivo sem qualquer tecnologia empregada, quanto ao sistema de criação em tanques-rede com rações completas com alta tecnologia de produção. As tilápias compõem o grupo de peixes exóticos que mais cresce em termos de comercialização mundial, especialmente pelo aumento da produção destas espécies em países em desenvolvimento, como o Brasil (ZIMMERMANN, FITZSIMMONS, 2004). Estima-se que a tilápia seja o gênero de peixe mais produzido no Brasil desde 1995, com produção anual de 75 mil toneladas em 2002 (ZIMMERMANN, FITZSIMMONS, 2004).

Assim, considerando-se a utilização cada vez maior de agroquímicos em sistemas de cultivo, para o controle de plantas aquáticas, predadores de formas jovens e parasitos dos peixes, esse trabalho propõe a utilização de biomarcadores histológicos para analisar os efeitos do Roundup e do extrato aquoso do nim em curimbas e tilápias.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de alterações histológicas nas brânquias e rim posterior de *Prochilodus lineatus* expostos ao herbicida Roundup e de *Oreochromis niloticus* e *Prochilodus lineatus* expostos ao biopesticida nim e analisar a severidade dessas alterações no comprometimento da função normal dos órgãos.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar as alterações histológicas branquiais e renais de *P. lineatus* expostos a concentrações subletais de Roundup;
- Identificar as alterações histológicas branquiais e renais de *P. lineatus* e *O. niloticus* expostos ao extrato aquoso de nim;
- Quantificar as alterações histológicas branquiais e renais dos animais determinando-se o Valor Médio de Alteração (VMA) e o Índice de Alteração Histopatológica (IAH) para cada órgão analisado;
- Comparar os efeitos dos dois pesticidas testados e a sensibilidade das espécies estudadas, utilizando-se os dados obtidos para cada espécie, baseando-se nas alterações observadas nos órgãos analisados.

3. Material e métodos

3.1 Espécies estudadas

Para os testes de toxicidade com o Roundup e o Nim foram utilizados exemplares jovens de curimba (*Prochilodus lineatus*) e tilápias (*Oreochromis niloticus*), provenientes da estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL).

A espécie de peixe *Prochilodus lineatus* pertence a ordem Characiformes, família Prochilodontidae. Os curimbas são detritívoros, alcançam de 30 a 45 cm de comprimento e de 600 a 1200g, podendo chegar a 6kg (CAETANO FILHO, 1993).

A espécie de peixe *Oreochromis niloticus* pertence a ordem Perciformes, família Cichlidae. As tilápias são herbívoras, porém aceitam outros tipos de alimento facilmente. Essa espécie é nativa da África, não costumam ultrapassar 60 cm e 3 kg. São encontradas em ambientes lânticos, lagos, lagoas e remanso de rios.

3.2 Testes de toxicidade

Os peixes foram transportados da EPUEL para o Laboratório de Bioensaios, localizado no Centro de Ciências Biológicas, onde foram transferidos para um tanque de cimento amianto com capacidade de 600 litros, para aclimação por 5 a 7 dias, com aeração constantante e fotoperíodo de 12C/12E. A temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido e condutividade foram constantemente monitorados. Durante a aclimação os animais foram alimentados com ração peletizada, sendo a alimentação suspensa 24 horas antes do início dos experimentos.

Para a aclimação e realização dos experimentos utilizou-se água proveniente de poço artesiano submetida a aeração constante para a evaporação do cloro.

2a. Roundup

Os curimbas foram expostos durante 24 e 96 horas ao Roundup, na concentração sub-letal de 10 mg.L^{-1} . Os peixes ($n = 32$) foram expostos a essa concentração do herbicida nas seguintes condições:

01) grupo de animais expostos por 24 horas ($n = 8$) + grupo controle ($n = 8$);

02) grupo de animais expostos por 96 horas ($n = 8$) + grupo controle ($n = 8$).

O grupo controle corresponde a um grupo de peixes exposto apenas à água dechlorada, sem adição do contaminante.

2b. Nim

Os curimbas foram expostos, durante 24 horas, a três diferentes concentrações do extrato aquoso de nim: 2,5, 5,0 e $7,5 \text{ g.L}^{-1}$; que correspondem, respectivamente a uma concentração sub-letal, a concentração letal $CL_{50}(96h)$ e uma concentração acima da $CL_{50}(96h)$, de acordo com WINKALER (2004). Os curimbas ($n = 24$) foram divididos nos seguintes grupos:

01) grupo Controle ($n = 6$);

02) grupo Experimental $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ($n = 6$);

03) grupo Experimental $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ ($n = 6$);

04) grupo Experimental $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ ($n = 6$).

As tilápias foram expostas durante 24 e 96 horas a concentração de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ do extrato aquoso de nim, que corresponde a 10% da $CL_{50}(96h)$ estimada para essa espécie por WINKALER (2004). As tilápias ($n = 24$) foram separadas nos seguintes grupos:

01) grupo de animais expostos por 24 horas ($n = 6$) + grupo Controle ($n = 6$);

02) grupo de animais expostos por 96 horas ($n = 6$) + grupo Controle ($n = 6$).

Para ambas as espécies o grupo controle corresponde a um grupo de peixes exposto apenas a água dechlorada, sem adição do contaminante.

3.3 Processamento histológico

Os peixes submetidos aos testes com o Roundup e o Nim, foram amostrados para a retirada de suas brânquias e rim posterior. Após retirar os peixes da água, eles foram anestesiados com benzocaína, sacrificados por secção medular, pesados e medidos (comprimento total e padrão) e então os órgãos foram retirados e fixados em Bouin, para preservação química e estrutural, o rim foi fixado por 12 horas e as brânquias por 8 horas. Após a fixação, os órgãos foram transferidos para o álcool 70% até o momento da inclusão.

Para a inclusão, os órgãos foram desidratados em uma série crescente de álcoois, removendo assim, a água dos tecidos e então diafanizados em xilol (PA). No caso das brânquias, foi retirado para a inclusão, o segundo arco branquial direito que foi descalcificado em uma solução de EDTA (7%) por 15 minutos na estufa a 60° C. A etapa seguinte foi a impregnação em parafina, que penetra no interior das células tornando o tecido mais fácil de cortar e por fim a inclusão, procedimento em que a peça é colocada num molde retangular contendo parafina fundida. Os blocos foram então cortados em micrótomo (Lupe), sendo os cortes de aproximadamente 5 µm de espessura. Os cortes foram esticados em banho-maria com a temperatura em torno de 48° C, aderidos a lâminas e secos em temperatura ambiente para que fossem corados. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para a descrição morfológica. As lâminas permanentes foram montadas com bálsamo do Canadá sintético (Nuclear) para a fixação das lamínulas.

Por fim, as lâminas de cada órgão foram analisadas em teste "cego" no microscópio de luz para a identificação das alterações histológicas e posteriormente, fotografadas por uma câmara digital (Motic Cam) e analisadas utilizando-se o software Motic 2000.

3.4 Análises morfológicas

Os mesmos critérios de classificação das lesões histopatológicas foram adotados para os dois órgãos em estudo, levando-se em conta os possíveis desvios na morfologia normal de cada órgão. Assim, as alterações histopatológicas nas brânquias e rim de cada animal amostrado foram avaliadas semi-quantitativamente de duas formas:

a) Valor Médio de Alteração Histopatológica (VMA)

O VMA está associado à ocorrência de alterações histológicas, tanto nas brânquias quanto no rim. Cada órgão analisado foi classificado, segundo SCHWAIGER et al. (1997), com um valor numérico conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração histológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão). Ao final, foram calculadas as médias desses valores de VMA para cada amostra.

b) Cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH)

A severidade de cada alteração histológica encontrada nos dois órgãos em estudo foi classificada em estágios progressivos quanto ao comprometimento das respectivas funções teciduais, de acordo com POLEKSIC, MITROVIC-TUTUNDZIC (1994): alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do tecido; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis. Esses dados foram utilizados para o cálculo do valor do IAH, empregando-se a fórmula:

$$IAH = 10 \cdot \Sigma I + 10^1 \cdot \Sigma II + 10^2 \cdot \Sigma III$$

onde: *I*, *II* e *III* correspondem ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente.

O valor médio de IAH pode ser dividido em 5 categorias baseado em POLEKSIC, MITROVIC- TUTUNDZIC, 1994:

0-10 = funcionamento normal do órgão;

11-20 = danificação leve para moderada do órgão;

21-50 = modificação moderada para severa do órgão;

51-100 = modificação severa do órgão;

Maior que 100 = danificação irreparável do órgão.

Assim, este índice permitiu a comparação da severidade das lesões branquiais e renais entre os peixes expostos às diferentes concentrações dos pesticidas.

3.5 Análise estatística

Para a análise dos resultados, as médias dos valores obtidos para cada grupo controle e experimental, foram comparadas entre os tratamentos em um mesmo tempo experimental, utilizando-se testes estatísticos adequados, paramétricos (ANOVA e Testes t de student) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney), dependendo da distribuição dos dados. Para a comparação dos diferentes tempos experimentais (24 e 96 horas) foi utilizado o Teste t de student. No caso de indicação de diferenças significativas pela ANOVA ou Kruskal-Wallis, empregou-se o teste de comparações múltiplas (SNK) para a localização das diferenças. Foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização histológica das brânquias

O aparelho branquial de *Prochilodus lineatus* e *Oreochromis niloticus* é semelhante aos de outros teleósteos, sendo constituído de quatro arcos branquiais principais em cada lado da cabeça. Do arco branquial saem duas fileiras de filamentos branquiais, anteriormente também denominadas lamelas primárias. Os filamentos branquiais irradiam como um leque e são sustentados internamente em sua base por elementos esqueléticos, o septo branquial. Dobras externas dos filamentos aparecem como placas laterais, as lamelas branquiais. Os arcos branquiais formam filtros que evitam a passagem de alimentos, detritos e outros materiais sólidos pelas fendas e sobre os filamentos branquiais (Fig.1).

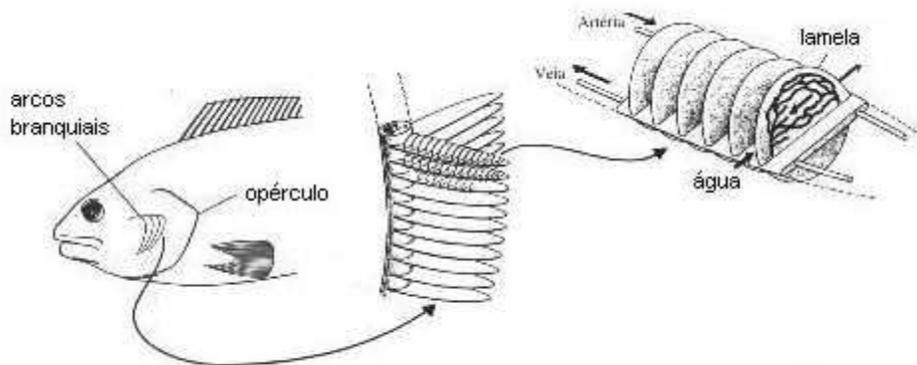


Figura 1. Figura mostrando os quatro arcos branquiais dos teleósteos. Do arco, partem duas fileiras de filamentos branquiais, e nestes filamentos ocorrem as lamelas branquiais, local onde ocorre as trocas gasosas. Esquema modificado de SCHMIDT-NIELSEN (1996).

Acima e abaixo dos filamentos branquiais, elevam-se a intervalos regulares, as lamelas (anteriormente também denominadas lamelas secundárias), que são os locais de trocas gasosas. Cada lamela é constituída pelas células pavimentosas, apoiadas na membrana basal que revestem

as células pilares. As células pilares possuem prolongamentos, que em contato com os prolongamentos das células pilares vizinhas formam espaços (canais), por onde circula o sangue (Fig. 2).

O epitélio respiratório constitui a maior parte da superfície branquial, sendo representado pelas lamelas. Essas lamelas branquiais consistem de uma única camada de um epitélio plano apoiado sobre uma membrana basal em contato direto com uma rica rede de capilares. A direção do fluxo sanguíneo é em sentido contrário aquele do fluxo de água sobre as lamelas, de tal forma que o sangue que abandona as lamelas está em íntimo contato com a água que apresenta tensão máxima de O_2 e mínima de CO_2 (SCHMIDT-NIELSEN, 1996). A superfície restante formada pelo epitélio é denominada não respiratória, sendo representada pelos filamentos branquiais, um tecido estratificado, portanto formado por várias camadas de células. A camada mais externa do epitélio não respiratório é formada principalmente por células pavimentosas, entre estas podem ser encontradas células mucosas e células de cloreto.

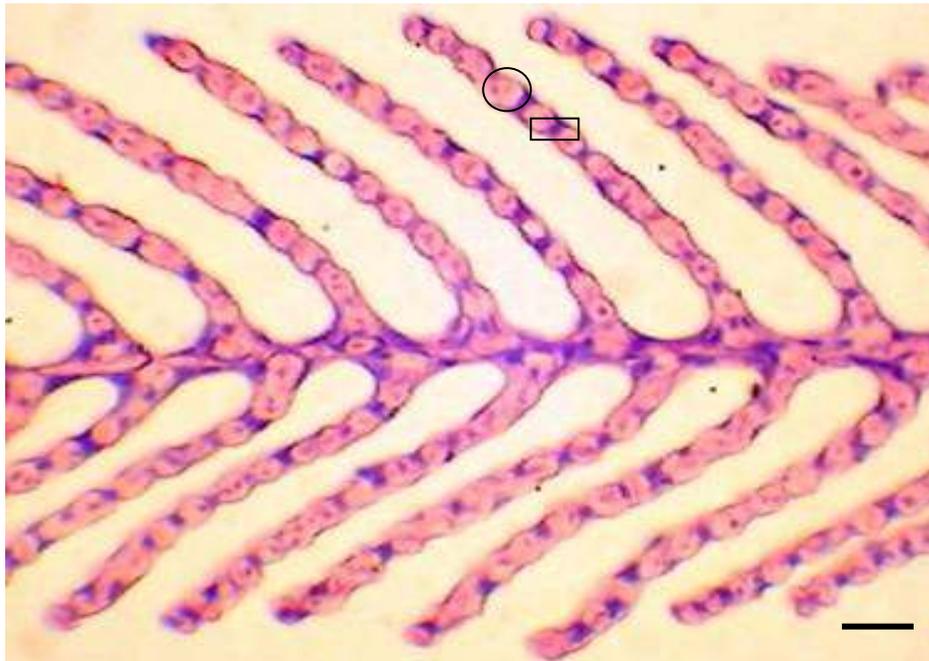


Figura 2. Fotomicrografia mostrando lamelas branquiais dispostas ao longo do filamento de uma brânquia sem alterações histológicas. O retângulo está indicando uma célula pilar, e o círculo indica um canal sanguíneo. H.E. A barra de aumento corresponde a 40 μ m.

4.2. Caracterização histológica do rim

O néfron constitui a parte funcional do rim. A região cortical caracteriza-se por apresentar numerosos corpúsculos renais que se destacam entre as partes dos túbulos renais. A região medular é caracterizada por um parênquima constituído apenas pelas partes dos túbulos renais próprios dessa região. Nos peixes de água doce, a principal função do rim é excretar o excesso de água que entrou no corpo do animal através das brânquias, gerando uma urina diluída (TAKASHIMA, HIBIJA, 1995). Cada estrutura do rim dos teleósteos realiza uma função específica na produção de urina, regulação osmótica e hormonal no animal .

A estrutura morfológica do rim das duas espécies estudadas é caracterizada por apresentar néfron com corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de Bowman) e túbulo renal. O glomérulo constitui um tufo de capilares resultante de uma arteríola que penetra no corpúsculo, sendo responsáveis pela filtração do sangue e estando mais concentrados na porção posterior do rim, onde ocorre extensiva reposição de íons com fluxo do filtrado ao longo dos túbulos renais. A cápsula de Bowman é formada por dois folhetos, um interno e outro externo. Entre esses dois folhetos ocorre um espaço denominado espaço de Bowman, que recebe o filtrado glomerular (Fig.3).

O rim quando observado em microscópio de luz, apresenta-se em geral com uma abundância de túbulos e uma pequena quantidade de glomérulos, que são desenvolvidos e ricamente vascularizados.

Os túbulos renais são divididos em duas porções, uma proximal e uma distal, os túbulos proximais caracterizam-se por apresentar uma borda em escova (microvilosidades). O túbulo contorcido proximal é o segmento mais longo e mais enovelado do néfron. Nos túbulos contorcidos proximais as células são maiores e as células do túbulo contorcido distal são menores e não possuem borda em escova aparente (Fig.4).



Figura 3. Fotomicrografia de rim de tilápia exposta por 24h ao Nim, mostrando as principais características de um cospúsculo renal. A seta está indicando o espaço de Bowman. O glomérulo é toda a região mais escura, que é envolvida pela cápsula de Bowman. O círculo está indicando um capilar do glomérulo. H.E. A barra de aumento corresponde a 100 μ m.

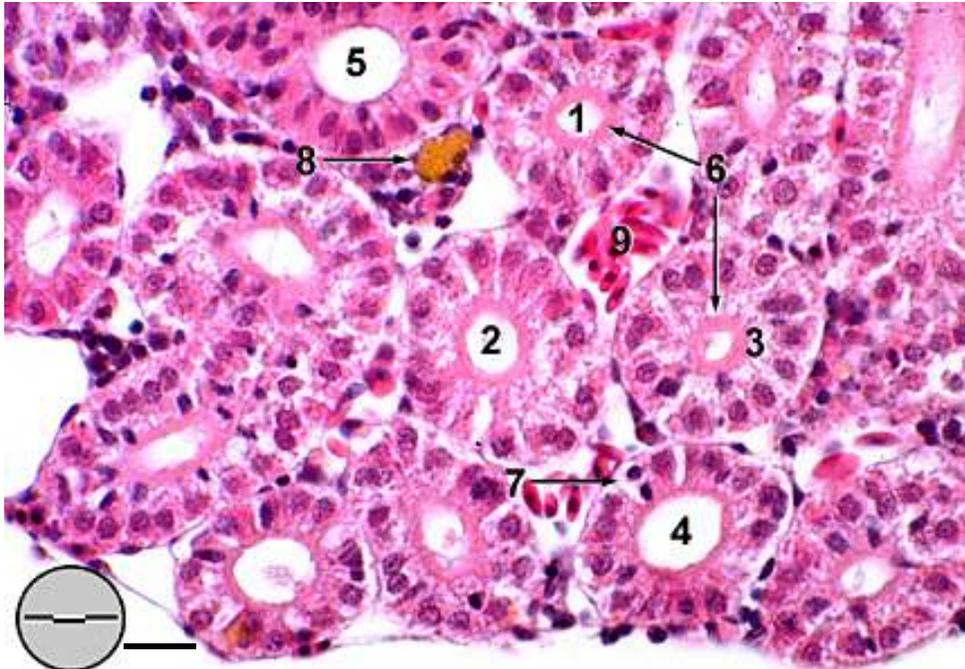


Figura 4. Fotomicrografia mostrando um rim de teleosteo sem alterações histológicas. Os números 1, 2 e 3, indicam túbulos contorcidos proximais, que podem ser diferenciados por apresentar uma borda em escova (indicada pelo número 6) nas células epiteliais. Os números 4 e 5 indicam túbulo distais, que não apresentam a borda em escova. H.E. A barra de aumento corresponde a 40 μ m.

4.3. Alterações histológicas observadas nas brânquias

Na presença de poluentes, as brânquias podem exibir modificações como descolamento do epitélio lamelar, fusão lamelar, aneurisma, congestão vascular, hipertrofia e hiperplasia das células que constituem o epitélio branquial (HEATH, 1987).

As principais alterações branquiais dos curimbas expostos ao Roundup foram: hipertrofia do epitélio lamelar, dilatação do canal marginal, desarranjo lamelar e hiperplasia do epitélio lamelar (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência das alterações branquiais em curimbas expostos a 10 ppm de Roundup (EXP) ou apenas a água (CTR), durante 24 e 96 horas.

Lesões Branquiais	Estágio	CTR	EXP	CTR	EXP
		24 h	24 h	96 h	96 h
Hipertrofia do epitélio respiratório	I	+++	+++	+++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0+	++	0+	++
Dilatação do canal marginal	I	+++	+++	+++	+++
Elevação epitelial da lamela	I	0+	0+	0	+
Fusão incompleta de várias lamelas	I	0	0+	0	+
Congestão vascular	I	+	++	0+	+
Desarranjo lamelar	I	0	+++	+++	++
Dilatação do seio sanguíneo	I	0+	++	0+	+
Constricção do seio sanguíneo	I	0+	++	0	0+
Ruptura do epitélio lamelar	II	0	0+	0+	0
Aneurisma	II	0	0+	0+	0+

Nota: 0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente.

A elevação epitelial foi uma alteração que ocorreu com pouca frequência nos curimbas expostos ao Roundup, mas que nos peixes expostos ao nim foi muito frequente. A elevação epitelial (Fig.5) é uma das primeiras alterações que ocorrem quando o animal está sob algum tipo de estresse (WINKALER et al., 2001). Portanto, esta alteração serve como defesa, com o aumento da distância de difusão entre a água e o sangue, diminuindo a vulnerabilidade da área superficial das brânquias. Entretanto, pode prejudicar a eficiência das trocas gasosas e transporte iônico (WINKALER et al., 2001).

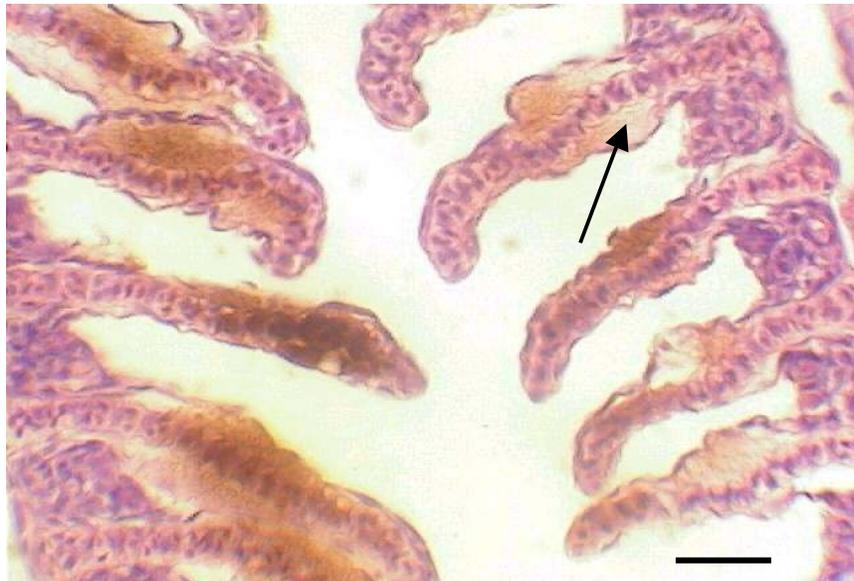


Figura 5. Fotomicrografia de brânquia de *Prochilodus lineatus* exposto ao Roundup. A seta está indicando uma elevação epitelial, que é uma alteração de estágio I. H.E. A barra de aumento corresponde a 40 μ m.

Os curimbas expostos ao nim apresentaram algumas alterações histológicas no tecido branquial. Dentre as alterações observadas destacaram-se a elevação do epitélio lamelar com redução da distância interlamelar; hipertrofia das células pavimentosas e das células epiteliais do filamento e mudanças vasculares, caracterizadas por congestão vascular e dilatação dos canais vasculares (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência das alterações branquiais em curimbas expostos ao nim por 24 horas nas concentrações de 0 (Grupo controle), 2,5; 5,0 e 7,5 g.L⁻¹.

Lesões Branquiais	Estágio	Concentrações do extrato de folha de Nim (g.L ⁻¹)			
		0	2,5	5,0	7,5
Hiperplasia epitelial do filamento	I	0	0+	++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0+	+	+++	+++
Diminuição do espaço interlamelar	I	0	0+	+++	+++
Elevação epitelial da lamela	I	0	0	+++	+++
Fusão incompleta de várias lamelas	I	0	0	0	0+
Fusão completa de várias lamelas	I	0	0	0+	0
Desarranjo lamelar	I	+	++	++	+++
Dilatação do seio sanguíneo	I	0	0+	+	++
Constricção do seio sanguíneo	I	+	+	+++	+++
Ruptura do epitélio lamelar	II	0	0	+	0

Nota: 0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente.

A constricção do seio sanguíneo, uma alteração de estágio I, foi muito encontrada nos curimbas expostos ao nim, e indica uma diminuição do calibre do seio sanguíneo, prejudicando o fluxo de sangue nestes canais (Fig. 6) de acordo com HEATH (1987). A congestão vascular (Fig. 7) também uma alteração de estágio I, é provocada por um aumento do fluxo de sangue no canal, sendo caracterizada como um aneurisma em estágio inicial, esse por sua vez é uma alteração mais grave, de estágio II e ocorre quando o sangue é extravasado no interior da lamela causando rompimento das células pilares.



Figura 6. Fotomicrografia de brânquia de *Prochilodus lineatus* exposto ao Nim [5,0 g.L]. As setas estão indicando uma coarctação do seio sanguíneo, que é uma alteração de estágio I. H.E. A barra de aumento corresponde a 40 μ m.

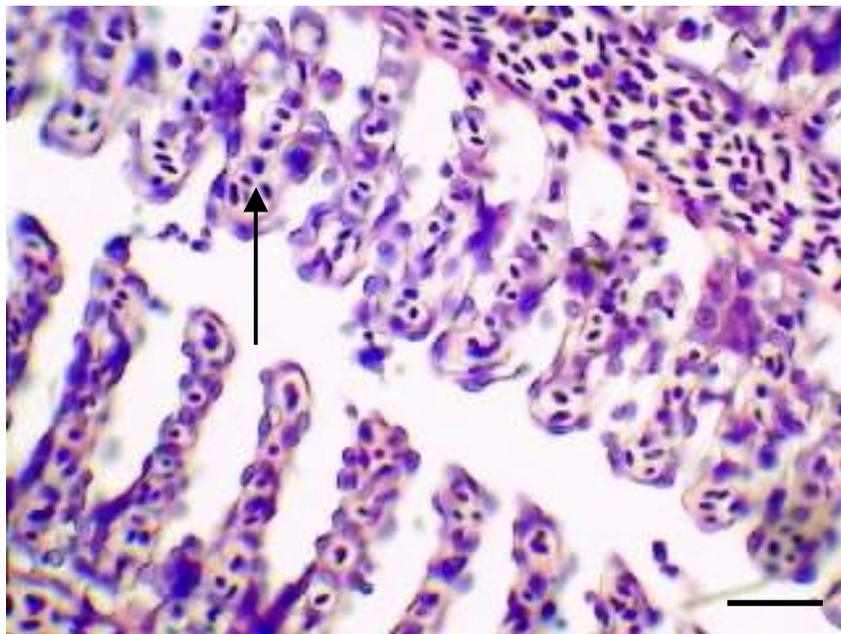


Figura 7. Fotomicrografia de brânquia de *Prochilodus lineatus* exposto ao Nim [7,5 g.L]. A seta está indicando uma congestão vascular, que é uma alteração de estágio I. H.E. A barra de aumento corresponde a 40 μ m.

Uma outra alteração também muito encontrada nas concentrações de 5,0 e 7,5 g.L⁻¹ do extrato aquoso da folha de nim foi a hiperplasia, que consiste em uma proliferação de células entre lamelas secundárias adjacentes, reduzindo este espaço interlamelar, podendo culminar na fusão de lamelas (HEATH, 1987; HINTON et al., 1992), podendo assim, diminuir a captação de oxigênio (Fig. 8).

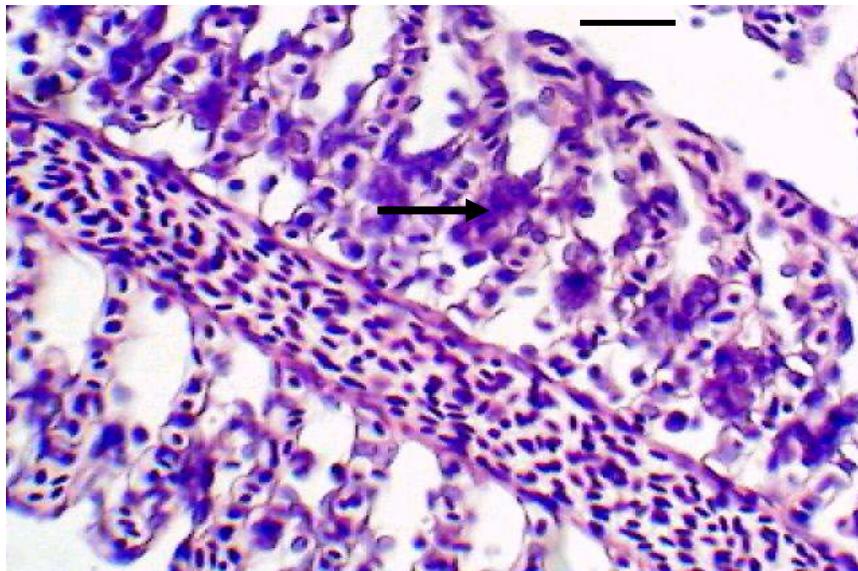


Figura 8. Fotomicrografia de brânquia de *Prochilodus lineatus* exposto ao Nim [7,5 g.L]. A seta está indicando uma hiperplasia focal, que é uma alteração de estágio I. H.E. A barra de aumento corresponde a 40 μ m.

Para as tilápias expostas ao nim, as principais alterações branquiais observadas foram: hipertrofia do epitélio respiratório, elevação epitelial, desarranjo lamelar, dilatação do canal marginal e hiperplasia (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência das alterações branquiais em tilápias expostas ao nim (EXP) na concentração de 2,5 g.L⁻¹ ou apenas à água (CTR), durante 24 e 96 horas.

Lesões Branquiais	Estágio	CTR	EXP	CTR	EXP
		24 h	24 h	96 h	96 h
Hipertrofia do epitélio respiratório	I	+++	+++	+++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	++	+++	++	+
Dilatação do canal marginal	I	+++	++	+++	++
Elevação epitelial da lamela	I	+++	+++	+++	+++
Fusão incompleta de várias lamelas	I	0	+	0	0+
Congestão vascular	I	+++	+++	+++	+
Desarranjo lamelar	I	+++	+++	+++	+++
Dilatação do seio sanguíneo	I	++	++	+++	++
Constricção do seio sanguíneo	I	0+	0+	++	+

Nota: 0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente.

4.4. Alterações histológicas observadas no rim posterior

As alterações renais foram abundantes e amplamente distribuídas pelo rim dos curimbas expostos ao herbicida, sendo que muitas alterações encontradas eram de estágio II, que são mais severas e prejudicam o funcionamento normal do órgão (Tabela 4). Dentre as lesões renais mais encontradas no rim de curimbas expostos ao Roundup podemos citar alterações no glomérulo, como a redução do espaço de Bowman (Fig. 9) que foi muito freqüente. Esta redução é uma alteração de estágio II e pode estar ligada ao aumento dos capilares do glomérulo. Nos túbulos, as mais encontradas foram a hipertrofia nuclear, vacuolização citoplasmática, degeneração granular (Fig. 10) e estreitamento da luz tubular. Mudanças degenerativas podem ser possivelmente o

resultado de material tóxico no filtrado do glomérulo (MEYERS, HENDRICKS, 1985). Uma alteração que esteve presente apenas nos grupos experimentais foi a degeneração hialina (Fig. 11), que é uma alteração de estágio II, caracterizada pela formação de grânulos grandes, sendo uma alteração que pode levar à necrose.

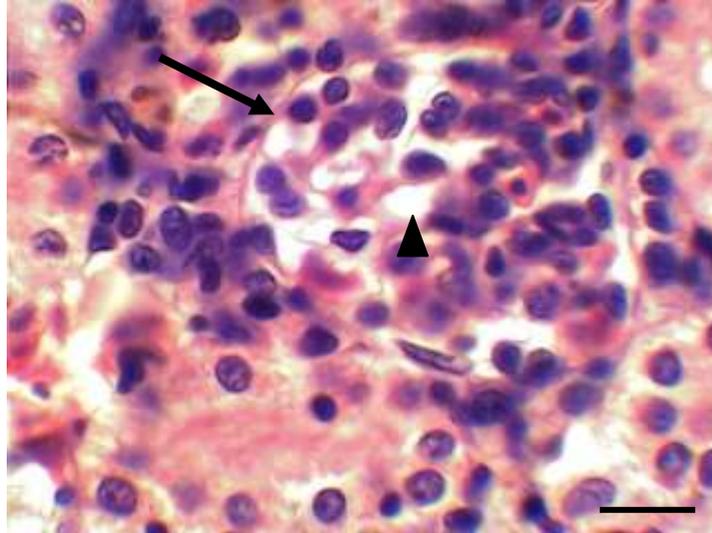


Figura 9. Fotomicrografia de rim de curimba exposto ao Roundup [10 ppm] por 96h. A seta indica uma redução do espaço de Bowman, que é uma alteração de estágio I. Esta redução pode estar ligada ao aumento dos capilares do glomérulo, indicada pela cabeça da seta. H.E. A barra de aumento corresponde a 100 μ m.



Figura 10. Fotomicrografia de rim de *Prochilodus lineatus* exposto ao Roundup [10ppm] por 24 h. O círculo indica uma degeneração granular, que é uma alteração de estágio I. H.E. A barra de aumento corresponde a 100 μ m.

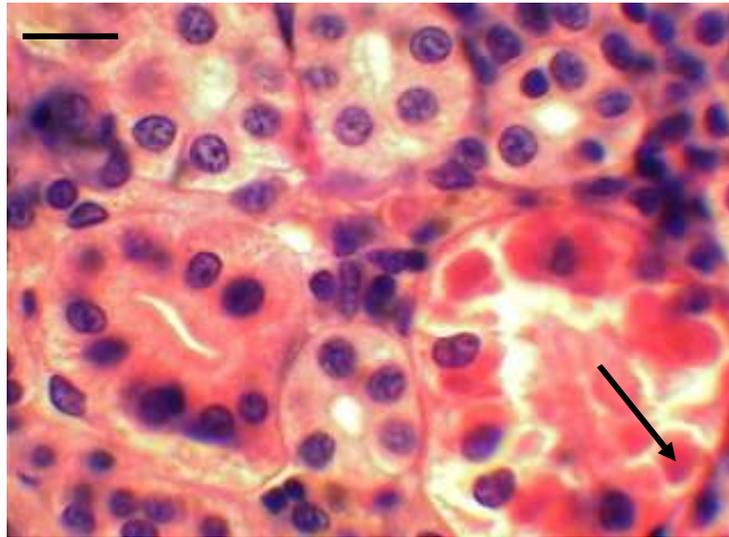


Figura 11. Fotomicrografia de rim de *Prochilodus lineatus* exposto ao Roundup [10ppm] por 96h. A seta indica uma degeneração hialina, que é uma alteração de estágio II. H.E. A barra de aumento corresponde a 100 μ m.

A degeneração granular conforme foi visto na figura 10 e a degeneração nuclear são freqüentemente observadas no epitélio dos túbulos contorcidos proximais. A célula sofre hipertrofia e o citoplasma exibe alguns grânulos. O contorno celular não pode ser visto claramente e o calibre do lúmen diminui (TAKASHIMA, HIBIYA, 1995). Outro tipo de degeneração celular inclui a degeneração hialina (MEYERS, HENDRICKS, 1985).

A presença de compostos químicos e o excesso de sangue no rim podem levar a algumas mudanças patológicas na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal. Além disso, pode ocorrer o aparecimento de células sanguíneas, ou de matéria estranho no espaço de Bowman (HINTON et al., 1992; TAKASHIMA, HIBIYA, 1995). Quando se encontra grande quantidade de hemácias nos capilares glomerulares se percebe uma dilatação do glomérulo que pode resultar na redução do espaço de Bowman (TAKASHIMA, HIBIYA, 1995) que pode ser observado na figura 9.

Tabela 4. Frequência das alterações renais em curimbas expostos a 10 ppm de Roundup (EXP) ou apenas a água (CTR), durante 24 e 96 horas.

Lesões Renais	Estágio	CTR	EXP	CTR	EXP
		24 h	24 h	96 h	96 h
Alterações nos Túbulos					
Hipertrofia nuclear	I	+	+++	+++	+++
Vacuolização citoplasmática	I	+++	+++	+++	+++
Degeneração granular	I	+++	+++	+++	+++
Estreitamento da luz tubular	I	+++	+++	+++	+++
Regeneração tubular	I	0+	0+	+++	0+
Degeneração celular	I	++	++	+	++
Degeneração tubular	II	0	+	0+	+
Degeneração nuclear	II	0	0+	0	0+
Oclusão da luz do túbulo	II	0	++	0	++
Degeneração hialina	II	0	+	0	+
Alterações no Corpúsculo					
Aumento do glomérulo	I	+	++	+	+
Redução do espaço de Bowman	II	+++	+++	+++	+++
Hemácias no espaço de Bowman	II	0	0+	0	0+

Nota: 0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente.

O rim dos curimbas expostos ao nim apresentou alterações histológicas renais. As lesões predominantes nos túbulos renais como: degeneração tubular e regeneração tubular (Tabela 5). Alterações glomerulares também foram observadas, dentre elas destacou-se a redução do espaço da cápsula de Bowman.

Tabela 5. Frequência das alterações renais em curimbas expostos, durante 24 horas, ao extrato aquoso de folhas de nim nas concentrações 0 (Grupo controle), 2,5; 5,0 e 7,5 g.L⁻¹.

Lesões Renais	Estágio	Concentrações do extrato de folha de Nim (g.L ⁻¹)			
		0	2,5	5,0	7,5
Alterações nos Túbulos					
Hipertrofia nuclear	I	0	+	+	+
Vacuolização citoplasmática	I	+	++	+++	+++
Degeneração granular	I	+	++	+++	+++
Estreitamento da luz tubular	I	+	+++	++	++
Regeneração tubular	I	0	0	++	0
Ruptura celular	II	0	0+	+	+
Degeneração tubular	II	0	0+	++	++
Degeneração nuclear	II	0	+	++	++
Degeneração hialina	II	0	0	+	++
Alterações no Corpúsculo					
Aumento do glomérulo	I	0+	+	++	++
Redução do espaço de Bowman	II	0	++	+++	+++
Hemácias no espaço de Bowman	II	0	0	+	+

Nota: 0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente.

As principais alterações renais nas tilápias expostas ao nim ocorreram nos túbulos renais sendo degeneração granular, vacuolização citoplasmática e hipertrofia nuclear as mais encontradas (Tabela 06).

Tabela 6. Frequência das alterações renais em tilápias expostas ao nim (EXP) na concentração de 2,5 g.L⁻¹ ou apenas à água (CTR), durante 24 e 96 horas.

Lesões Renais	Estágio	CTR	EXP	CTR	EXP
		24 h	24 h	96 h	96 h
Alterações nos Túbulos					
Hipertrofia nuclear	I	++	+++	0+	+++
Vacuolização citoplasmática	I	+++	+++	+++	+++
Degeneração granular	I	+++	+++	+++	+++
Estreitamento da luz tubular	I	++	+	+++	+
Regeneração tubular	I	+	+	0+	++
Degeneração celular	I	++	+++	++	++
Degeneração tubular	II	+	+++	0	++
Oclusão da luz do túbulo	II	0	0+	0	0
Alterações no Corspúsculo					
Aumento do glomérulo	I	0	0	0	0+
Redução do espaço de Bowman	II	0	+	0	+++

Nota: 0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente.

4.5. Análise semi-quantitativa das lesões branquiais

As alterações branquiais observadas nos peixes foram classificadas quanto a sua distribuição e seu grau de severidade e comprometimento da função tecidual, resultando em valores de VMA e IAH.

Para os curimbas expostos aos testes com o Roundup [10ppm], os resultados mostram diferenças significativas para o VMA branquial em comparação ao grupo controle somente no tempo experimental de 96 horas, sendo o VMA = 2,67 para o grupo experimental, e VMA = 2,0 para o grupo controle (Fig. 12). Para os valores de VMA, comparando o grupo controle 24h com o controle 96h e o experimental 24h com o experimental 96h, os valores não foram significativamente diferentes em nenhum tempo experimental. As médias de IAH foram inferiores a 10 (Fig. 13). Não foram observadas diferenças significativas quanto ao tempo de exposição (24 e 96 horas). Nem em relação ao grupo controle.

Em relação aos resultados obtidos para os curimbas expostos ao nim por 24 horas nas concentrações (2,5; 5,0 e 7,5 g.L⁻¹), para o VMA branquial não foi encontrado diferenças significativas em nenhum tratamento (Fig. 14). Para as duas maiores concentrações de nim testadas nos peixes (5,0 e 7,5 g.L⁻¹), os valores de IAH branquial foram significativamente diferentes do grupo controle e do experimental 2,5 g.L⁻¹ (Fig. 15).

Para as tilápias, os resultados mostram que para as brânquias os valores de VMA (Fig. 16) e IAH (Fig. 17) não foram significativamente diferentes entre o grupo controle e o grupo experimental, sendo os valores de IAH inferiores a 10.

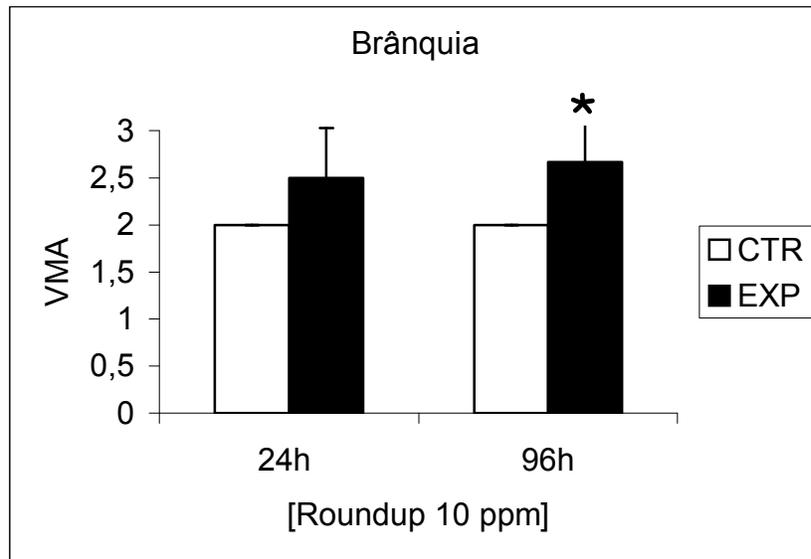


Figura 12. Valor Médio de Alteração (VMA) determinado para brânquia de curimbas expostos ao Roundup. O * indica valores significativamente diferentes do grupo controle ($P \leq 0,05$). A linha vertical indica o desvio padrão.

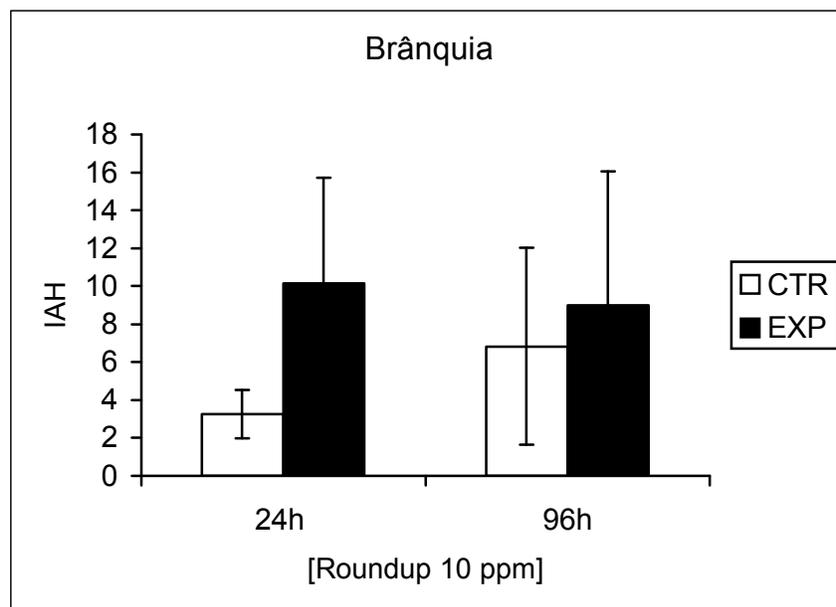


Figura 13. Índice de Alteração Histopatológica (IAH) determinado para brânquias de curimbas expostos ao Roundup. A linha vertical indica o desvio padrão.

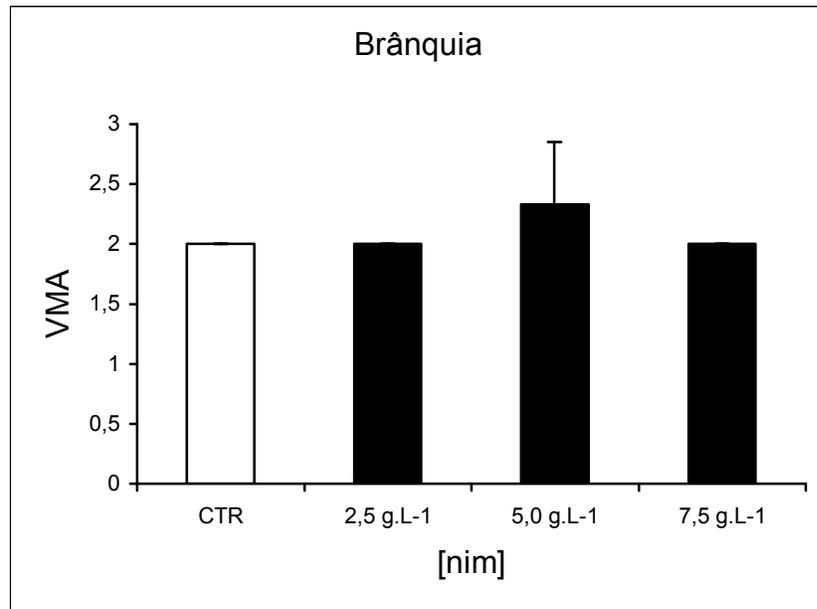


Figura 14. Valor Médio de Alteração (VMA) de brânquias de curimbas expostos ao nim por 24 horas. A linha vertical indica o desvio padrão.

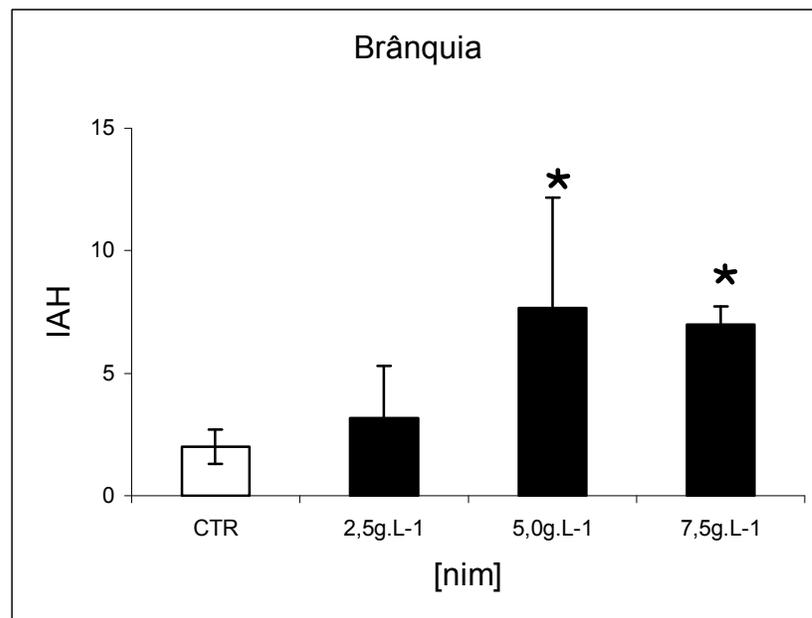


Figura 15. Índice de Alteração Histopatológica (IAH) de brânquias de curimbas expostos ao nim por 24 horas. O * indica valores significativamente diferentes do grupo controle e do grupo experimental de concentração 2,5 g.L⁻¹ ($P \leq 0,05$). A linha vertical indica o desvio padrão.

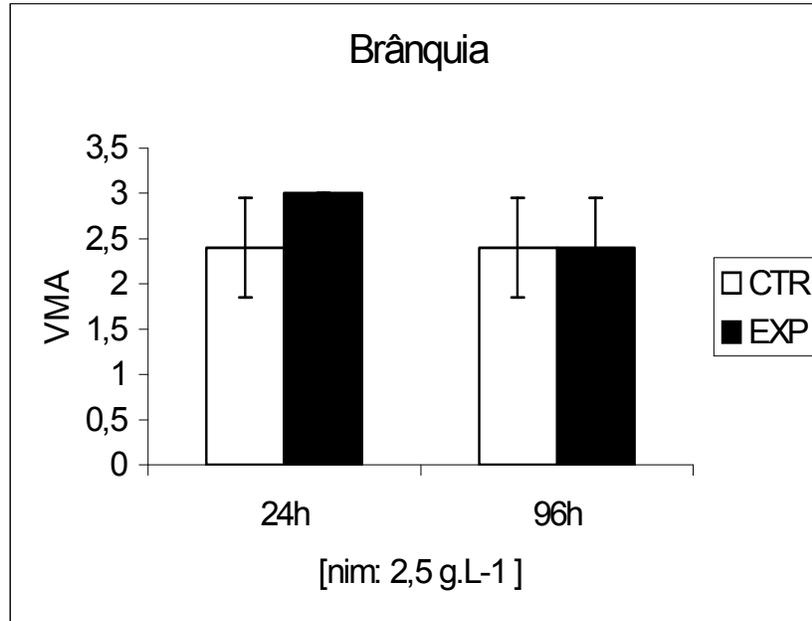


Figura 16. Valor Médio de Alteração (VMA) de brânquias de tilápias expostas na concentração de 2,5 g.L⁻¹ do extrato aquoso da folha de nim. A linha vertical indica o desvio padrão.

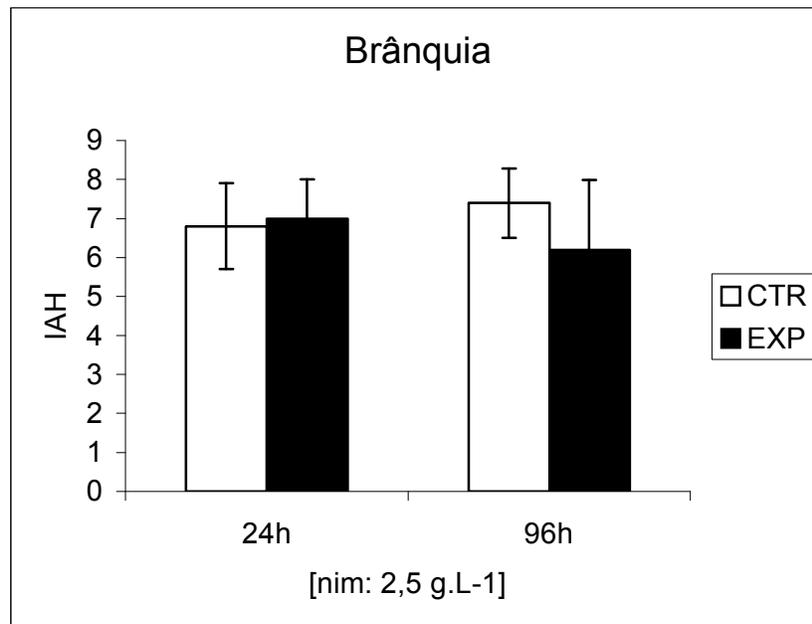


Figura 17. Índice de Alteração Histopatológica (IAH) de brânquias de tilápias expostas na concentração de 2,5 g.L⁻¹ do extrato aquoso da folha de nim. A linha vertical indica o desvio padrão.

4.6. Análise semi-quantitativas das lesões renais

As alterações renais observadas para os peixes, assim como as brânquiais foram classificadas quanto à distribuição e ao grau de severidade e comprometimento da função tecidual, obtendo valores de VMA e IAH.

Para o rim dos curimbas expostos ao Roundup, o VMA apresentou valores significativamente diferentes entre os grupos controle e experimental em ambos os tempos experimentais, com todos os animais expostos ao Roundup mostrando VMA = 3 (Fig. 18). Para o IAH renal, as diferenças foram significativas entre o grupo controle e experimental e os valores foram superiores a 40 nos grupos experimentais (Fig. 19). Não houve, porém, diferenças significativas quanto ao tempo de exposição (24 e 96 horas).

Em relação aos resultados obtidos para os curimbas expostos ao nim por 24 horas nas concentrações 2,5; 5,0 e 7,5 g.L⁻¹, para o VMA não foram encontradas diferenças significativas em nenhum tratamento (Fig. 20). Os valores de IAH obtidos para o rim dos animais expostos a todas as concentrações de nim foram maiores que 20 (Fig. 21) e significativamente diferentes do controle.

Nos experimentos realizados com as tilápias expostas ao nim, os valores de VMA não foram significativamente diferentes (Fig. 22) Para os valores de IAH, as diferenças foram significativas em relação ao controle e esses valores foram superiores a 20 (Fig. 23).

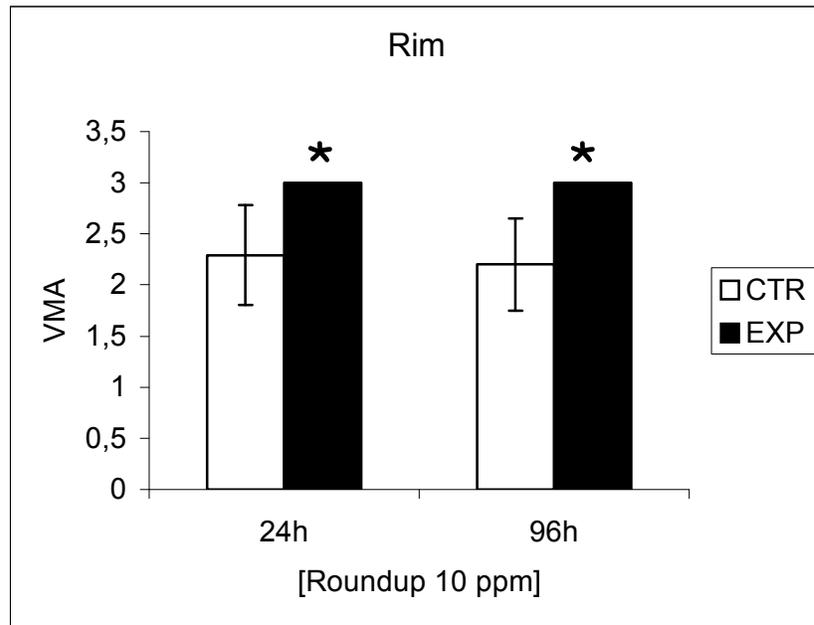


Figura 18. Valor médio de alteração (VMA) determinado para rim de curimbas expostos ao Roundup [10 ppm]. O * indica valores significativamente diferentes do grupo controle no respectivo tempo experimental ($P \leq 0,05$). A linha vertical indica o desvio padrão.

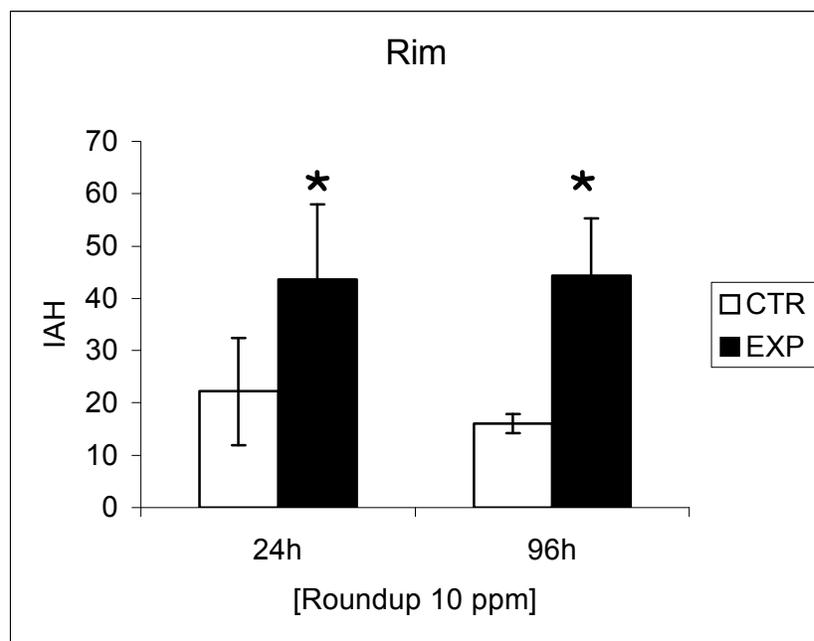


Figura 19. Índice de Alteração Histopatológica (IAH) determinado para rim de curimbas expostos ao Roundup. O * indica valores significativamente diferentes do grupo controle no respectivo tempo experimental ($P \leq 0,05$). A linha vertical indica o desvio padrão.

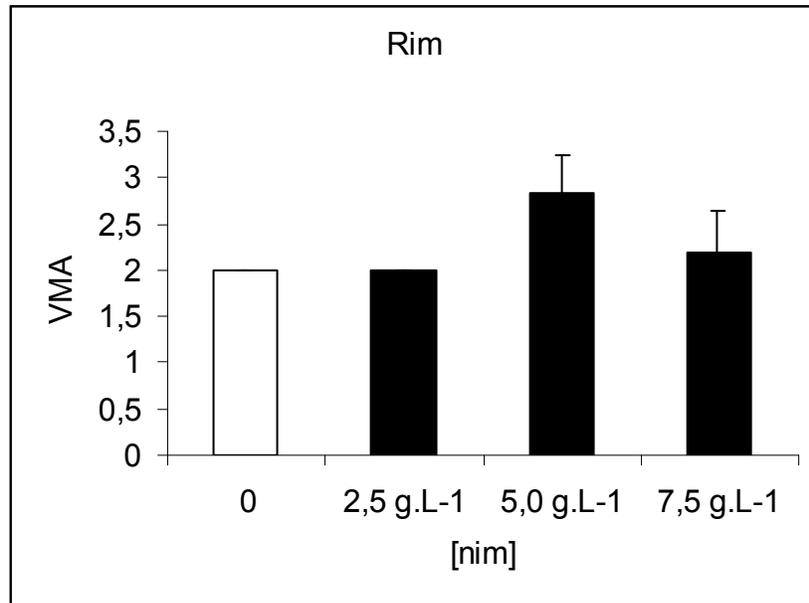


Figura 20. Valor médio de alteração (VMA) de rins de curimbas expostos ao nim por 24 horas. A linha vertical indica o desvio padrão.

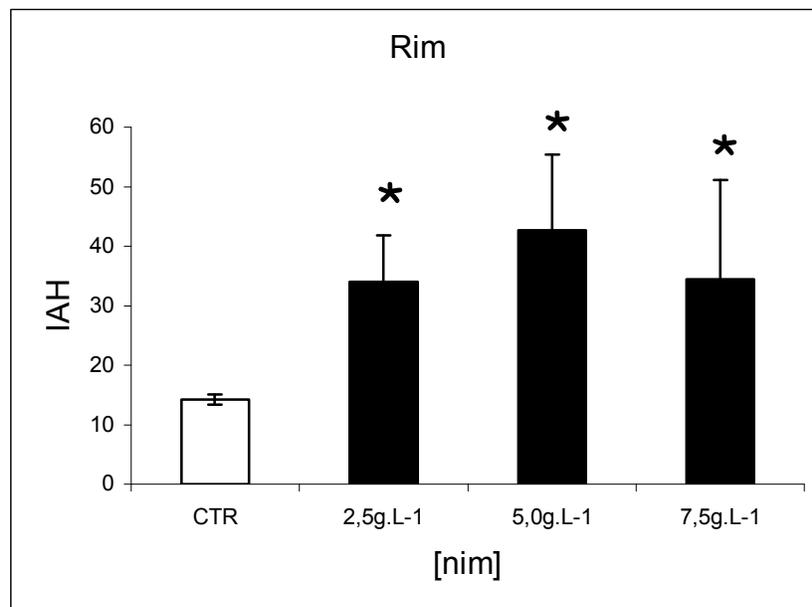


Figura 21. Índice de Alteração Histopatológica (IAH) de rim de curimbas expostos ao nim por 24 horas. O * indica valores significativamente diferentes do grupo controle ($P \leq 0,05$). A linha vertical indica o desvio padrão.

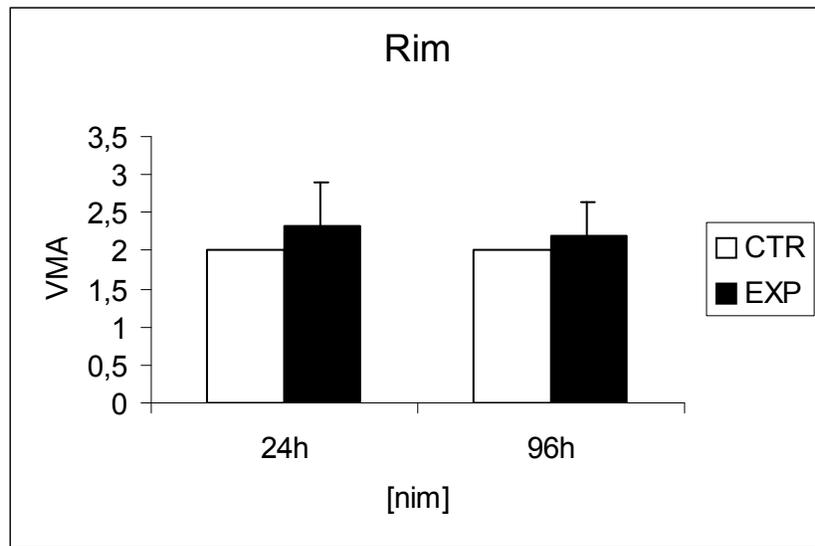


Figura 22. Valor médio de alteração (VMA) de rins de tilápias expostas na concentração de 2,5 g.L⁻¹ do extrato aquoso da folha de nim. A linha vertical indica o desvio padrão.

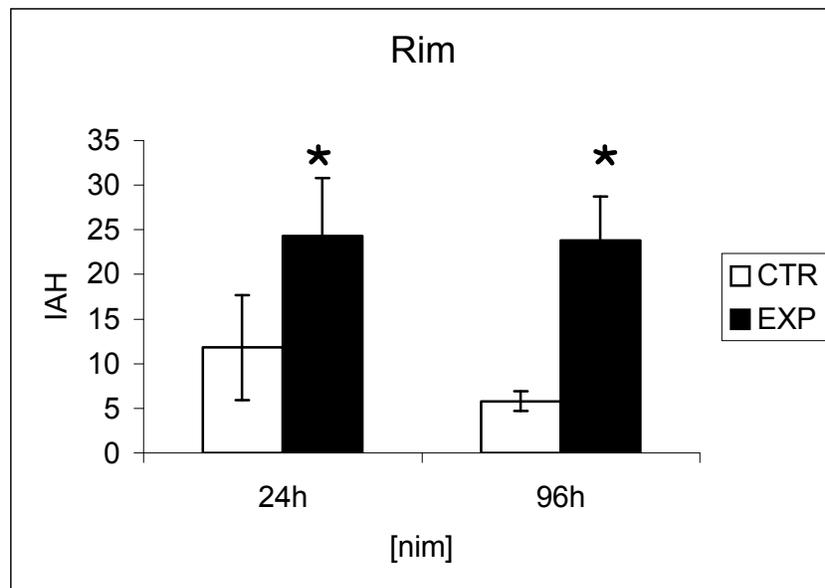


Figura 23. Índice de Alteração Histopatológica (IAH) de rim de tilápias expostas na concentração de 2,5 g.L⁻¹ do extrato aquoso da folha de nim. O * indica valores significativamente diferentes do grupo controle no respectivo tempo experimental ($P \leq 0,05$). A linha vertical indica o desvio padrão.

Como as brânquias estão em contato direto com o meio externo e representam uma barreira entre este meio e o interno, o tecido branquial é altamente susceptível às alterações ambientais (POLEKSIK, MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Segundo alguns estudos, como de HINTON e LAUREN (1990), a maioria das lesões branquiais que ocorrem em exposições subletais afeta o epitélio da lamela secundária. Na análise das brânquias o epitélio lamelar é o local onde foi encontrada a maioria das alterações. Nos curimbas que foram expostos ao Roundup, o maior valor no VMA dos grupos experimentais em comparação com os controles, indica que a distribuição das alterações no tecido branquial foi ampla e que, portanto, atingiu uma maior área do órgão, resultando assim em um maior prejuízo das funções branquiais. Para o IAH branquial, os valores ficaram abaixo de 10, isso indica que as alterações em geral não comprometeram o órgão, pois, em geral, as alterações foram brandas e apenas alguns peixes que obtiveram o IAH acima desse valor. Como não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao tempo de exposição, não se pode dizer que o aumento do tempo de 24 para 96 horas promoveu um maior número de lesões histológicas, nem mesmo que os peixes conseguiram apresentar outras respostas que possibilitassem uma melhor defesa contra o agente tóxico.

Para os experimentos realizados com os curimbas expostos ao nim, os resultados mostraram que as brânquias sofreram alterações, mas que de maneira geral essas lesões não comprometem muito suas funções de tomada de oxigênio e osmorregulação. No entanto, é importante dizer que o epitélio branquial de peixes é extremamente sensível, dinâmico e metabolicamente ativo (POLEKSIK, MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994), e que portanto mesmo as lesões mais brandas consistem em sinais iniciais de que o órgão está respondendo a estas alterações.

Em relação às tilápias que foram expostas ao nim, os resultados foram muito semelhantes aos dos curimbas também expostos a este biopesticida. Para as brânquias os valores de VMA e IAH não foram significativamente diferentes entre o grupo controle e o grupo experimental, sendo que os valores de IAH foram inferiores a 10, o que indica alterações brandas, que não afetam as funções das brânquias.

Em outros estudos, como no de SANTANA (2004) as brânquias de lambaris e cascudos também se mostraram ser menos sensíveis aos poluentes.

Quando os peixes estão sob um estresse mais severo, podem ocorrer alterações vasculares nas lamelas. Ou seja, com um aumento do fluxo sanguíneo para o interior da lamela ou mesmo a ação direta dos contaminantes pode desestruturar as células pilares ou até mesmo rompe-las causando lesões mais severas (HEATH, 1987).

De acordo com a intensidade do fluxo sanguíneo e a severidade do dano das células pilares podem originar alterações de estágio I, como a dilatação marginal e a congestão vascular, ou de estágio II, como o aneurisma (TAKASHIMA, HIBIYA, 1995).

A grande superfície que está em contato com o meio externo e a alta taxa de perfusão facilitam a entrada dos poluentes nas lamelas (HEATH, 1987).

A hiperplasia foi uma das principais alterações encontradas por SILVA, 2002 em curimbas confinados em lagos da cidade de Londrina. A hiperplasia pode levar a fusão lamelar, que é um mecanismo natural de defesa, para manter a superfície da lamela mais longe do contato direto com os agentes tóxicos (HEATH, 1987).

A congestão vascular, que é considerada uma como uma fase inicial de um aneurisma, e o aneurisma foram alterações também muito encontradas por SILVA (2002) nos lagos de Londrina. O aneurisma é caracterizado pelo acúmulo de sangue nas lamelas respiratórias, podendo levar ao rompimento das células pilares (HEATH, 1987).

Estas alterações histológicas podem afetar diretamente os mecanismos de respiração e osmorregulação (MEYERS, HENDRICKS, 1985).

Na presença de poluentes o rim pode apresentar alterações morfológicas como degeneração granular, hialina e nuclear, dilatação dos capilares do glomérulo, redução do espaço de Bowman, presença de hemácias no espaço de Bowman, dilatação da luz tubular, estreitamento da luz tubular, oclusão da luz tubular, túbulos em regeneração e desenvolvimento de novos néfrons (MEYERS, HENDRICKS, 1985; HINTON et al., 1992; TAKASHIMA, HIBIYA, 1995; SCHWAIGER et al., 1997).

Os glomérulos são responsáveis pela ultrafiltração do sangue, estão mais concentrados na região posterior do rim, onde ocorre extensiva reposição de íons com fluxo do filtrado ao longo dos túbulos renais, produzindo fluido filtrado que dará origem a urina (JOBLIN, 1995; TAKASHIMA, HIBIJA, 1995; EVANS, 1998).

Para o rim de curimbas expostos ao Roundup, os resultados encontrados sugerem que, no caso dos maiores valores de VMA apresentados pelos grupos experimentais quando comparados ao controle indica que o Roundup causou quantitativamente uma maior ocorrência de alterações histológicas em todos os peixes dos grupos experimentais e que estes apresentaram uma ampla distribuição das lesões por todo o tecido analisado. É importante ressaltar que em todos os rins analisados dos peixes expostos ao Roundup, tanto em 24 como em 96 horas, o valor do VMA foi igual a 3, ou seja, esse valor representa lesões amplamente distribuídas pelo órgão, indicando que os rins de todos esses curimbas tiveram seu tecido bastante comprometidos. O IAH encontrado para os rins foi superior a 40, o que indica um comprometimento de moderado a severo das funções renais e que a recuperação do órgão com a retirada do agente tóxico ainda é possível. Esse elevado valor de IAH significa que o órgão apresentou um maior número de alterações, promovendo assim um prejuízo maior em seu funcionamento normal.

A oclusão da luz tubular, é uma alteração de estágio II que foi frequente somente nos curimbas expostos ao Roundup, sendo raramente encontradas ou até mesmo ausente nos curimbas e tilápias expostos ao nim, talvez isso ocorreu devido as características próprias do Roundup. O acúmulo de material no lúmen dos túbulos proximais ou distais pode levar à oclusão da luz tubular, assim como, o aumento no volume das células endoteliais pode resultar na redução do lúmen, levando ao estreitamento da luz tubular (TAKASHIMA, HIBIYA, 1995). Estes tipos de alterações podem prejudicar a passagem do filtrado, além de comprometer o processo de reabsorção e secreção tubular (MEYERS, HENDRICKS, 1985).

Os valores de IAH obtidos para o rim dos curimbas expostos a todas as concentrações de nim foram maiores que 20, o que indica um comprometimento de moderado a severo da função renal, sendo a recuperação do órgão ainda possível com a retirada do agente tóxico.

Para as alterações renais das tilápias, que foram expostas ao nim, as diferenças foram significativas e os valores de IAH foram superiores a 20, o que indica um comprometimento mais severo da função renal.

Para ambas as espécies de peixes estudadas o rim mostrou ser um órgão muito mais sensível aos pesticidas do que as brânquias. Isso pode ter ocorrido em função do rim ser um órgão que possivelmente recebe uma concentração maior de contaminantes pelo fluxo sanguíneo. Por outro lado, a brânquia é um órgão que apesar de estar em contato direto com o ambiente aquático, possui muitos mecanismos de defesa para evitar a exposição aos contaminantes como a elevação epitelial e a hiperplasia, sendo um local onde ocorre a depuração de agentes tóxicos. Assim como nestes experimentos, em outros estudos como de SANTANA (2004), o tecido renal mostrou-se mais sensível para lambaris capturados nos ribeirões Jacutinga e Lindóia.

Não foi possível constatar uma diferença significativa em relação à sensibilidade das espécies (curimba e tilápia), quanto a exposição ao nim. Isso pode ser observado na comparação

dos grupos expostos durante 24 horas na concentração de 2,5 g.L do extrato aquoso de nim. Para o VMA renal e o VMA e IAH branquial não foi observado diferenças significativas em relação ao grupo controle para ambas as espécies e os valores do IAH branquial foram todos inferiores a 10. No entanto, para o IAH renal as diferenças foram significativamente diferentes do grupo controle e esses valores foram superiores a 20 tanto para curimbas, como para tilápias.

Lesões no tecido branquial e renal podem ser indicações de toxinas específicas, e assim poderiam ser utilizados como indicadores para o monitoramento de efeito de contaminantes (SCHWAIGER et al., 1997).

Conclusões

- a) O Roundup demonstrou ser tóxico para curimbas, promovendo alterações histológicas brandas nas brânquias e severas no rim;
- b) O biopesticida nim, citado muitas vezes como inofensivo para os peixes, também promoveu alterações histológicas brandas nas brânquias e severas no rim de curimbas e tilápias;
- c) As duas espécies de peixes estudadas apresentaram sensibilidade semelhante quanto a exposição ao nim;
- d) O rim mostrou ser um órgão mais sensível aos pesticidas do que as brânquias;
- e) Estes resultados sugerem fortemente que o biopesticida nim, apesar de aparentemente “inofensivo” e o Roundup citado como de “baixa toxicidade”, promovem alterações histológicas significativas nas brânquias e no rim de peixes;
- f) Para a utilização do nim em sistemas de cultivo de peixes e o uso indiscriminado do Roundup, seja na sua aplicação direta na água ou em locais que possa atingir o meio aquático, mais estudos são necessários para que sejam estabelecidos critérios seguros para os animais.

Referências Bibliográficas:

AMARANTE JR., O.P.; SANTOS, T., C., R.; BRITO, N. M. & RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação. **Química Nova**. 25 (4), p. 589-593, 2002.

CAETANO FILHO, M. **Análise comparativa do crescimento e da produção de duas densidades de *Schizodon intermedius* (Piava) Garavello e Britski, 1990, em viveiros de policultivo**. 1993. Monografia de bacharelado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

COX, C. Northeast Coalition for Alternatives to Pesticides. **Journal of Pesticide Reform**. Eugene, Oregon. Vol. 18, nº 3 ,1998.

DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C.; SAHU, B.B.; MURJANI, O. Neem (*Azadiractha indica*) extract as an antibacterial agent against fish pathogenic bacteria. **Indian Journal of Experimental Biology**, 37, 1097-1100, 1999

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência: FINEP, 1988, 575 pp.

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

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil – Subordem Claracoidei**. V. 6, Piracicaba: Franciscana, p. 847, 1975.

HARIKRISHNAN, R.; RANI, M.N; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture** 221, 41-50, 2003.

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

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.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. (Eds.), **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, cap. 4, p. 155-209, 1992.

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

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

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. et al (Eds.). **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina, Paraná, C(29): 551-577. 2002.

MARTINEZ, S. O. NIM – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos e produção. Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). Londrina, PR. 2002.

MEDINA, H. S. G., LOPATA, M. E., BACILA, M. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 37, 895-906, 1994

MEYERS, T.R & J.D.HENDRICKS. HISTOPATHOLOGY. in: RAND G.M. & S.R.PETROCELLI, **Fundamentals of Aquatic Toxicology - Methods and Applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, p.283-331. 1985

MITCHELL D.G., CHAPMAN PM, LONG TJ. Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicide to rainbow trout, Chinook and coho salmon. **Bull Environ Contam Toxicol** 39: 1028-1035, 1987

OMOREGIE, E.; OKPANACHI, M. A. Acute toxicity of water extracts of bark of the Neem plant, *Azadirachta indica* (Lodd) to the cichlid *Tilapia Zilli* (Gervais). **Acta Hydrobiologica** 39, 47-51, 1997.

POLEKSIK, 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, cap. 30, p. 339-352, 1994.

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

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

SANTANA, L. M. B. M. **Biomarcadores histopatológicos para o monitoramento ambiental da bacia do ribeirão Jacutinga (Londrina, PR).** 2004. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade estadual de Londrina, Paraná.

SILVA, A. G. **Análise de parâmetros morfológicos de curimbas, *Prochilodus lineatus*, submetidos a testes *in situ*, para o monitoramento ambiental.** 2002. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade estadual de Londrina, Paraná.

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

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W. & TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.**:75-86. 1997.

STAGG, R.; GOKSØYR, A.; RODGER, G. Changes in branchial Na^+ , K^+ , ATPase, metallothionein and P4501A1 in dab *Limanda limannda* in the German Bight: indicators of sediment contamination? **Marine Ecology Progress Series**, 91: 105-115, 1992.

STREIT, B. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: BRAUNBECK, T., HINTON, D. E.; STREIT, B. (Eds). **Fish Ecotoxicology.** Berlin: Birkhauser Verlag, 1998, p. 353-387.

TAKASHIMA, F.; HIBYIA, T. **An atlas of fish histology normal and pathological features.** 2. ed. Kodansha: Gustav Fisher verlag, 1995

USDA, Herbicide Background Statement: Glyphosate. In: **Pesticide Background Statements.** V. 1: Herbicides USDA Forest Service, Agricultural Handbook No 633: G-1-72, 1984

WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B. (eds.) **Principles of Ecotoxicology.** Taylor & Francis, Londres. 321p. 1996.

WINKALER, E. U. **Efeitos do extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos de peixes (*Prochilodus lineatus* e *Oreochromis niloticus*).** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, 2004.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. 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.

ZIMMERMANN, S & FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C; Fracalossi, D.M; Castagnolli, N., (Eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce intensiva.** Tecart cap. 9, p. 239-266, 2004.