



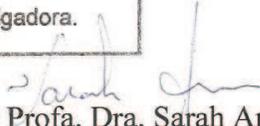
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIANA FREM PETERLINI

**“AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA EM BRÂNQUIAS E
TEGUMENTO COMO BIOMARCADORES DA INTOXICAÇÃO
AGUDA INDUZIDA POR ATRAZINA EM ALEVINOS DE PACU,
Piaractus mesopotamicus”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Mariana Frem Peterlini
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Histologia.


Orientadora: Profa. Dra. Sarah Arana

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDO VE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P441a Peterlini, Mariana Frem, 1980-
Avaliação morfológica em brânquias e tegumento
como biomarcadores da intoxicação aguda por atrazina
em alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* /
Mariana Frem Peterlini. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Sarah Arana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Herbicidas triazínicos. 2. Teleósteos. 3.
Histopatologia. 4. Poluição da água. 5.
Ecotoxicologia. 6. *Piaractus mesopotamicus*. 7. Pele.
I. Arana, Sarah, 1962-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Morphological assessment in gills and skin as biomarkers of acute toxicity induced by atrazine in pacu fingerlings, *Piaractus mesopotamicus*

Palavras-chave em Inglês:

Triazine herbicides

Teleostei

Histopathology

Water pollution

Ecotoxicology

Piaractus mesopotamicus

Skin

Área de concentração: Histologia

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Sarah Arana

Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais

Áureo Tatsumi Yamada

Edson Aparecido Adriano

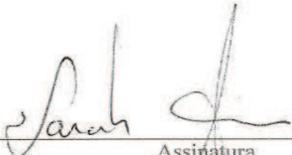
Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 27 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

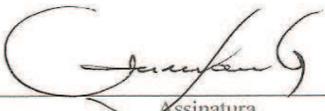
Profa. Dra. Sarah Arana (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais


Assinatura

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada


Assinatura

Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano


Assinatura

Profa. Dra. Laurecir Gomes

Assinatura

**Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e paciência
durante a realização deste sonho.**

**Aos amigos e familiares pela dedicação e auxílio nos
momentos difíceis.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me amparado na realização de mais essa etapa na minha vida profissional e por ter me carregado no colo muitas vezes durante esses anos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural por possibilitar a realização do meu mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Programa de Financiamento à Exportação (CAPES/PROEX) e o Programa de Apoio à Pós-Graduação (CAPES/PROAP) pelo auxílio ao desenvolvimento do projeto.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sarah Arana, pela oportunidade de ser sua aluna. Obrigada por todos os ensinamentos e desafios.

À Liliam Alves Senne Panagio, secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela disponibilidade, eficiência e amizade.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes e Profa. Dra. Maria Júlia Marques pelo ótimo trabalho para manter o nível do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À Profa. Dra. Ivanira José Bechara por me motivar aos estudos, por me acolher como estagiária no seu laboratório e por me incentivar a concluir cada etapa desta escolha que fiz em 2008. Obrigada pelo carinho, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Áureo T. Yamada por me estimular à reflexão durante o preparo de uma aula que ministrei na disciplina de PED (Programa de Estágio Docente). Foi mais ou menos assim: “Mariana, ao montar uma aula você já precisa ter em mente o que pretende perguntar ao aluno numa futura avaliação. Isso vai auxiliar na organização da sua aula, o que realmente é importante que eles ouçam durante a aula, afinal as informações eles podem encontrar nos livros”. Hoje consigo dar o devido valor àquelas palavras. Todas as ações necessitam do “ter em mente o que pretende com”. Muito obrigada.

Aos professores que contribuíram com suas sugestões e comentários durante a correção da pré-banca desse trabalho: Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais; Profa. Dra. Laurecir Gomes e Prof. Dr. Áureo T. Yamada.

Aos membros da banca examinadora que se propuseram a dedicar mais um valioso tempo na releitura da dissertação bem como por contribuírem mais uma vez para o aperfeiçoamento desse trabalho.

À técnica Cleusa Oliveira Franco pelo carinho, amizade, pela sua risada contagiante, por tudo que me ensinou em relação às técnicas de laboratório e pelas inúmeras vezes que me auxiliou, principalmente nos cortes dos materiais e nas trocas de favores. Aprendi muito com você.

À técnica Célia Aparecida Almeida Chaves Garcia, que mesmo nova no laboratório, me auxiliou e ensinou em vários momentos. Obrigada pelo seu carinho, amizade, pelos bilhetinhos e pelos brigadeiros que animaram muitas tardes.

Ao técnico Juvani Lago, pelo auxílio e ensinamento, pela amizade, carinho e confidências.

Aos amigos e funcionários do departamento de Histologia e Embriologia: Rita, Baltazar, Marta, Raquel e D. Neusinha, pelo apoio e contribuição na execução deste trabalho e pelos bons momentos de descontração.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelas disciplinas cursadas e pela contribuição à minha formação profissional.

Aos docentes do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelos conhecimentos transmitidos e pelo carinho nos corredores.

Ao pessoal do transporte do IB/UNICAMP, em especial Joaquim e Carlinhos, pela contribuição com a busca e destino dos peixes.

À Guabi Nutrição Animal, especialmente ao Sr. João Manoel Cordeiro Alves e Sra. Dulcelene Lizard, pelo fornecimento de ração durante todo o experimento.

Ao Sr. Francisco Lozano, da Estação Experimental de Paulínia da Bayer do Brasil, pela consultoria técnica.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão – IB/UNICAMP, em nome de Antônia, Adriane, Aparecida (Cidinha) e Aparecida (Loló) pelo apoio técnico prestado a esta pesquisa.

À Piscicultura Polletini pelo fornecimento dos alevinos de pacu empregados no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais, José Rubens e Leila e irmãos Rafael e Míriam, pelo amor, carinho e paciência. Amo vocês!!!!

À minha filha maltês, Kapitú, pela companhia nos dias e noites de trabalho e por me descontrair querendo brincar com a bolinha.

Às amigas de uma vida inteira: Giovanas, Lilian, Cláudia, Vera, Priscilas, Andressa e Naicily. Agradeço pelas palavras de conforto e coragem, bem como pelos puxões de orelha necessários, além dos muitos risos.

Às minhas primas queridas Dri, Jú e Débora e demais familiares, avó, tios e tias.

À madrinha Carmo e amigos Roberto, Taís, Beatriz, Lívia, Mel, Marilda, Gordo, Mário, Edson, Ciça, Marlene, Joaquim, Sueli, Bail e Suzana, Caio, Ricardo Lebet, Deise, Clélia seus filhos e agregados. Aos amigos espíritas da Sepi.

Ao pessoal da Zoologia: Paulo César, Ricardinho, Adílson, Luizinho, Marli, Sophie, Juliana, Renata e Paulo Roberto.

Aos amigos da balada: Dalmi, Lisiane, Talita, Grazi, Dani, Alessandra, Ágatha, Bárbara, Gallo, Regina, Thaíse, Telma, Esmeralda, Adriano, Célio, César Guarizzo, Carol,

Fábio, Paulo Eduardo, Edu irmãozinho, Canela, Diego, Paiato, André – cunhado, Kléber, Toninho, Quel, Pablo, Guilherme, Míriam, Carina, Mariana, Marília, Lú, Vanessa, Lê, DJ Bado, Jé, Denílson, Puff, Jack, Milton, Eduardo e Leonel.

Aos amigos do hospital de São Paulo em especial aos que me aturam todos os finais de semana de plantão, tanto de dia quanto a noite.

Aos amigos e familiares que se foram no meio do percurso e que continuam iluminando minha vida no plano superior: Vó Esméria, Carlinhos, Vera, Zé Povia e Jefferson.

Aos amigos: Aline Fernanda Tagliaferro, Rodrigo Castanha, Beatriz Ochandio, Paula Pereira de Paiva, Patrick Vianna, Andréa Camargo, Aline Carolina de Nadai, Alexandre, Cíntia, Bianca, Christiane Tarsitano, Anderson e Mariana pelo convívio no laboratório.

Amiguinha, agradeço pela acolhida, pela disponibilidade, companhia, moradia, amizade e família compartilhada.

Amiguinho, obrigada pelas risadas, conselhos, moradia e por confessar que gostava de fazer o que eu pedia porque sei explorar com jeito.

Bia, obrigada por dar continuidade ao trabalho que iniciei, por ter sido minha chaveirinho, pelas risadas, companheirismo e amizade.

Paula, obrigada pela recepção no laboratório, pela moradia, convivência, por compartilhar dos mesmos experimentos que eu e pela amizade.

Patrick, obrigada por participar da minha vida, você é uma pessoa iluminada e muito querida, não tenho palavras para agradecer cada conselho, conversa e auxílio a mim prestados.

À Andrea Camargo e Anderson que alegraram o laboratório durante suas passagens por aqui. Descobri que não fui a única estabana no LHHEE. Vocês deixaram muita experiência e alegria.

É por isso que eu digo: Amo vocês, meus amiguinhos!

Aos amigos do DHE: Claudinha, Júnia, Carol, Patrícia, Karina, Petra, Carla, Júlio, Maria Amália, Marlúcia, Renata, Juarez, Eliane, Denner, Sílvio, Débora, Lucimara, Camila, Ricardo, Marília, Maynara, Angélica, Carolina, Amanda e professoras recém-chegadas pela convivência, troca de experiências e alegrias.

Aos plantonistas da guarda costeira da Praia de Copacabana, Rio de Janeiro por terem me auxiliado num momento muito difícil, com tanta atenção e carinho. Valquíria e Bruno, vocês e sua equipe foram meus anjos da guarda.

Aos peixes que deram suas vidas para a realização desta pesquisa.

**“Se não for hoje, um dia será.
Algumas coisas, por mais impossíveis e malucas
que pareçam, a gente sabe, bem no fundo, que
foram feitas para um dia dar certo”
(Caio Fernando Abreu)**

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	10
3. Material e Métodos.....	11
3.1. Animais, manejo sanitário e manejo alimentar.....	11
3.2. Determinação da Concentração Média Letal (CL ₅₀).....	12
3.2.1. Animais e manejo sanitário.....	12
3.2.2. Preparação da solução de atrazina.....	13
3.2.3. Procedimento do experimento de intoxicação aguda.....	13
3.3. Análise anatomo-histopatológica.....	14
3.3.1. Processamento de material para análise em microscopia de luz.....	14
3.4. Análises estatísticas.....	15
4. Resultados.....	17
4.1. Parâmetros físico - químicos da água.....	17
4.2. Determinação da CL ₅₀	17
4.3. Análise anatomopatológica.....	18
4.4. Análise histopatológica.....	21
4.4.1. Brânquia.....	21
4.4.2. Pele.....	25
5. Discussão.....	29
5.1. Determinação da CL ₅₀	29
5.2. Análise Anatomopatológica.....	29
5.3. Análise histopatológica.....	30
5.3.1. Brânquia.....	30
5.3.2. Pele.....	33
6. Conclusões.....	35
7. Referências bibliográficas.....	36

Anexo I.....	53
--------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

A: arco branquial
C: controle
Cc: célula “club”
Cl: célula do cloro
CL₅₀: Concentração Letal Média
CM: célula mucosa
CP: célula pilar
CRM: célula rica em mitocôndria
DHE: Departamento de Histologia e Embriologia
DP: desvio-padrão
DPr: derme profunda
DS: derme superficial
EP: erro-padrão
ER: epitélio respiratório
F: filamento branquial
HE: Hematoxilina-Eosina
LHHEE: Laboratório de Histofisiologia e Histopatologia Experimental em Ectotérmicos
LP: lamela primária
LS: lamela secundária
MET: microscopia eletrônica de transmissão
ML: microscopia de luz
PAS: ácido periódico de Schiff
R: rastelo
RI: região interlamelar
RIP: região interlamelas primárias
RIS: região interlamelas secundárias
SV: sistema vascular
T: tratado
TM: tecido muscular

RESUMO

Peterlini, M.F. “**Avaliação morfológica em brânquias e tegumento como biomarcadores da intoxicação aguda induzida por atrazina em alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus***”. 2012. 68f. Dissertação: (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Área de Concentração: Histologia. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

A agricultura intensiva no Brasil tem aumentado o risco de contaminação dos recursos hídricos e dos organismos aquáticos por agroquímicos. Esse é o caso da atrazina, detectada em alta frequência em rios e córregos da região. Assim, neste trabalho, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foi escolhido como bioindicador por sua importância econômica e ecológica em Bacias do Pantanal. As brânquias e o tegumento foram aqui avaliados como biomarcadores da toxicidade induzida por atrazina, uma vez que estes órgãos se encontram em contato direto com o ambiente aquático. Para avaliar a sensibilidade de alevinos de pacu e determinar a Concentração Letal Média (CL_{50}) à atrazina foram conduzidos experimentos, em duplicata, em sistema estático por 96 horas, com as seguintes concentrações: 0,0; 13,2; 17,6; 22,0; 26,4; 30,8; 35,2; 39,6 mgL^{-1} . A CL_{50} obtida para a atrazina foi de 28,58 mgL^{-1} (96h). Foram realizadas análises anatomopatológica, histopatológica qualitativa e semi-quantitativa para brânquias e análises anatomopatológica e histopatológica qualitativa para o epitélio tegumentar. Amostras de brânquia e de pele dorsal e ventral foram fixadas em Bouin e incluídas em parafina. Para o grupo controle não foi registrada qualquer alteração com os métodos empregados. Os alevinos expostos à atrazina apresentaram alterações comportamentais como: escurecimento da pele, boquejamento intenso e distúrbios motores, além disso, nesses aquários houve constante presença de muco na água; e, alterações anatomopatológicas, como: hiperemia na pele, dilatação da região ventral, presença de líquido no estômago e ascite sanguinolenta. Nas brânquias dos grupos tratados foram observadas as seguintes alterações morfológicas: edema e afastamento na região interlamelar, hipertrofia e hiperplasia na região interlamelar, destacamento do epitélio respiratório, hipertrofia de células do epitélio respiratório,

congestão, telangiectasia e fusão de lamelas secundárias. Na pele dorsal e ventral dos grupos tratados não se observou alteração histopatológica. As alterações motoras observadas são provavelmente decorrentes do efeito neurotóxico da atrazina. As análises branquiais confirmam o comprometimento respiratório e de osmoregulação nesse órgão, sendo que a análise semi-quantitativa indicou a hipertrofia de células do epitélio respiratório como a lesão mais severa. Finalmente, as brânquias mostraram-se biomarcadores adequados na avaliação dos efeitos tóxicos da atrazina em pacu e o valor da CL_{50} sugere que a atrazina é levemente tóxica para o pacu, porém pelos demais resultados observados, se infere que só analisar a mortalidade não é o suficiente para determinar o dano causado por agrotóxicos em peixes, assim, recomenda-se o emprego de vários biomarcadores, como por exemplo, análise de vários outros órgãos. Os resultados obtidos reforçam a importância de estudos desta natureza, para embasar medidas ambientais preventivas e reguladoras quanto ao uso desse herbicida.

Palavras-chave: Herbicida; Pele; Teleósteo; Histopatologia; Contaminação aquática; Ecotoxicologia.

ABSTRACT

Peterlini, M.F. “**Morphological assessment in gills and skin as biomarkers of acute toxicity induced by atrazine in pacu fingerlings, *Piaractus mesopotamicus***”. 2012. 68f. Dissertação: (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Área de Concentração: Histologia. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

The intensive agriculture in Brazil has caused growing increase of pollution risks of hydric resources and the aquatic organisms by agrochemicals. This is the case of atrazine, detected in high frequency in the rivers and streams. Therefore, in this research, the pacu (*Piaractus mesopotamicus*) was chosen by bioindicator because of its great economic and ecological importance to the water ecosystem of the Pantanal region. The gills and skin were assessed here as biomarkers of induced toxicity by atrazine, considering that these organs are in direct contact with the aquatic environment. To evaluate the sensitivity of pacu fingerlings and determine the Median Lethal Concentration (LC₅₀) by atrazine, experiments were conducted, performed in duplicate, in static system for 96 hours, with the following concentrations: 0.0; 13.2; 17.6; 22.0; 26.4; 30.8; 35.2; 39.6 mgL⁻¹. The LC₅₀ for pacu was 28.58 mgL⁻¹ (96h). Anatomopathological, qualitative histopathological and semi-quantitative histopathological analyses were performed for the gills, and anatomopathological and qualitative histopathological analysis were performed for the skin epithelium. Gills and dorsal and ventral skin samples were fixed in Bouin and processed for the inclusion in paraffin. The control group did not register any other alterations with the methods used. The fingerlings exposed to atrazine presented behavioral changes, such as: darkening of the skin, an increase in the frequency of gasping and motor disturbances. Furthermore, these aquariums presented the constant presence of mucus in the water; and, anatomopathological alterations, such as: skin hyperemia, dilation of the ventral region, the presence of liquid in the stomach and bloody ascites. In the gills of treated groups were found the following morphological alterations: edema and spacing in the interlamellar region, hypertrophy and hyperplasia in the interlamellar region, epithelial lifting, hypertrophy of respiratory epithelium cells, congestion, telangiectasis and fusion of the secondary lamellae. For dorsal and ventral skin of treated groups no histological alterations

were observed. The motor alterations observed are probably due to the neurotoxic effects of atrazine. The gills analysis confirm respiratory and osmoregulatory compromise in this organ, noting that semi-quantitative analysis indicated the hypertrophy of respiratory epithelium cells as the most severe lesion. Finally, the gills showed adequate biomarkers in the assessment of toxic atrazine effects in pacu and the LC₅₀ value suggests that atrazine is lightly toxic to pacu. However, by other results observed, it is concluded that analyzing the mortality index alone is not enough to determine the damages caused by agrotoxics in fishes, so the use of other biomarkers is recommended, like for instance, analysis some other organs. The results obtained reinforce the importance of research of this nature, in order to establish preventive and regulatory environmental measures regarding the use of this herbicide.

Keywords: Herbicide; Skin; Teleostei; Histopathology; Aquatic contamination; Ecotoxicology.

1. Introdução

Embora, os agroquímicos sejam essenciais para a agricultura moderna, eliminando organismos que possam representar obstáculos à produção, é crescente a preocupação com possíveis contaminações do meio ambiente por agrotóxicos. Assim, numerosas pesquisas têm sido conduzidas objetivando avaliar a contaminação de águas com agroquímicos: água da chuva (Goolsby *et al.*, 1997; Dubus *et al.*, 2000; Laabs *et al.*, 2002), água de superfície em rios, lagos e represas (Pereira e Hostettler, 1993; Thurman *et al.*, 2000; Armas *et al.*, 2005 e 2007), bem como sedimento (Daniels *et al.*, 2000; Armas *et al.*, 2007), uma vez que esse tipo de contaminação além de carrear o contaminante para outros sítios ampliando o dano ambiental, compromete seriamente o ecossistema aquático, cujo comprometimento alcança até mesmo espécies animais terrestres (inclusive o homem) e aves em função do consumo de água e dos organismos aquáticos contaminados.

Pesquisas, como as citadas acima, têm abordado principalmente a contaminação aquática de regiões temperadas (Bishop *et al.*, 2000, Okamura *et al.*, 2003, Silva *et al.*, 2006, Villa *et al.*, 2006) sendo cada vez mais frequente os trabalhos que avaliam a ocorrência de contaminação ambiental por agroquímicos em regiões neotropicais e tropicais (Salazar *et al.*, 1997, Caldas *et al.*, 1999, Castilho *et al.*, 2000, Castillo *et al.*, 2000, Carvalho *et al.*, 2002) e mais recente é a investigação científica nessa área no Brasil (Botello *et al.*, 2000, Doris e De-Lamonica-Freire, 2001, Primel *et al.*, 2005, Botelho *et al.*, 2009, Paulino, 2011), embora o Brasil tenha se mostrado um dos maiores mercados para agroquímicos no mundo (Racke *et al.*, 1997), tendo movimentado cifras da ordem de 6,03 bilhões de dólares entre janeiro e agosto de 2011, um crescimento de 7% sobre o mesmo período de 2010, respondendo os herbicidas, particularmente, por mais de um terço das vendas nos nove primeiros meses de 2011, ou cerca de US\$ 2,1 bilhões (SINDAG, 2011).

Laabs *et al.* (2002) realizaram detalhado levantamento da presença de agrotóxicos na água da chuva, água de superfície e sedimentos em Bacias da Região do Pantanal Brasileiro, relatando a presença de variado grupo de agroquímicos. De fato, uma intensiva agricultura mecanizada tem se espalhado pela região desde a década de 70 (Resck, 1998), com aplicação de agrotóxico consideravelmente intensificada com a introdução de soja e

mais recentemente algodão. Assim, é preocupante que parte desses agroquímicos alcança os rios da região, sendo que os das áreas mais elevadas da região matogrossense drenam diretamente para o Pantanal, considerada a maior região alagada de água doce do planeta com uma privilegiada biodiversidade (Laabs *et al.*, 2002).

Dessa biodiversidade, particularmente, várias espécies de peixes têm despertado grande interesse, não só por sua importância para esse ecossistema, como por seu valor sócio-econômico. Esse interesse econômico se justifica tanto pela pesca esportiva na região como pela introdução de muitas dessas espécies em sistema de cultivo intensivo. O interesse para a piscicultura se dá em função do crescimento rápido, do sabor agradável da carne com boa aceitação no mercado nacional e ainda rusticidade de algumas espécies, o que favorece o manejo das mesmas, como é o caso do pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Contudo, mesmo sendo uma realidade a presença de agrotóxicos na bacia do Pantanal (Laabs *et al.*, 2002), não há muitos registros até o momento de pesquisas que avaliam a ação de agroquímicos sobre sua ictiofauna em condições laboratoriais (Ranzani-Paiva *et al.*, 1997; Veiga *et al.*, 2002; Aguiar *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2006; Tagliaferro, 2009; Paiva, 2010; Paulino, 2011), e menos registros ainda de trabalhos de biomonitoramento dessas espécies em rios onde ocorrem, seja na Bacia do Pantanal ou em outras bacias (Matsushita e DeSouza, 1994).

Buss *et al.*, 2003, em trabalho de revisão sobre as bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios, cita diversos autores como Matthews *et al.*, 1982, que define o biomonitoramento como o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antropogênicas. O uso das respostas dos organismos é a base dos índices biológicos. Para Armitage (1995 *apud* Buss *et al.*, 2003), o termo “resposta biológica” se refere ao conjunto de reações de um indivíduo ou uma comunidade em relação a um estímulo ou a um conjunto de estímulo, sendo que por estímulos entende-se algo que induza uma reação do indivíduo que possa ser percebida e medida na população ou na comunidade.

Segundo Metcalfe (1989), o uso das respostas biológicas como indicadores de degradação ambiental é vantajoso em relação às medidas físicas e químicas da água, pois

estas registram apenas o momento em que foram coletadas, como uma fotografia do rio, necessitando assim de um grande número de análises para a realização de um monitoramento temporal eficiente. Outra desvantagem das medições químicas, segundo Pratt & Coler (1976) é que, quando realizadas longe da fonte poluente, não são capazes de detectar perturbações sutis sobre o ecossistema.

Por sua vez, os organismos integram as condições ambientais durante toda a sua vida, permitindo que a avaliação biológica seja utilizada com bastante eficiência na detecção tanto de ondas tóxicas intermitentes agudas quanto de lançamentos crônicos contínuos (De Pauw & Vanhooren, 1983). Além disso, as metodologias biológicas são bastante eficazes na avaliação de poluição não pontual (difusa), tendo, portanto, grande valor para avaliações em escala regional (Pratt & Coler, 1976).

Mesmo em casos de lançamentos contínuos dentro das normas estabelecidas por lei, o uso da biota aquática é uma importante ferramenta na avaliação da qualidade da água. Isso devido a um processo natural denominado biomagnificação, que é a transmissão de compostos que não são metabolizados ou excretados pelos organismos para o nível superior da cadeia trófica. Em alguns casos esses componentes podem ser tóxicos se acumulados, como no caso de metais pesados e de agroquímicos. Portanto, mesmo estando dentro das normas legais de lançamento, esses efluentes podem estar degradando as inter-relações biológicas, extinguindo espécies e gerando problemas de qualidade de vida para as populações que utilizam aquele recurso (Buss *et al.*, 2003).

Os indicadores biológicos são muito úteis por sua especificidade em relação a certos tipos de impacto, já que inúmeras espécies são comprovadamente sensíveis a um tipo de poluente, mas tolerantes a outros (Washington, 1984). Assim, índices podem ser criados especificamente para detectar derramamento de óleo, poluição orgânica, alteração de pH da água, lançamento de agroquímicos entre outros (Buss *et al.*, 2003).

Conforme o relato de Laabs *et al.* (2002), 22 substâncias empregadas como agroquímicos (fungicidas, herbicidas e inseticidas) foram detectadas em águas da chuva, em águas de superfície de córregos e rios e em sedimentos na região do Pantanal, variando sua presença e sua concentração conforme o tipo e origem do material analisado. Nesse

estudo, um dos grupos de agroquímicos de alta frequência de detecção e/ou persistência foram as triazinas (atrazina, simazina e ametryn).

As triazinas, utilizadas como herbicidas, trazem sérios danos ao meio ambiente, por sua longa persistência, mantendo-se de 3 a 12 meses no solo, pela mobilidade no solo e na água, e por ser cumulativo em alguns ecossistemas (Graymore *et al.*, 2001; Phyu *et al.*, 2006; Jablonowski *et al.*, 2011). Segundo relato da “Extension Toxicology Network” (EXTOXNET) (1996), as triazinas são classificadas como levemente a moderadamente tóxicas para humanos e outros animais. Podem ser absorvidas oralmente, dermatologicamente e por inalação. Sintomas de envenenamento incluem dores abdominais, diarreia e vômitos, irritação nos olhos, irritação nas membranas das mucosas e erupções na pele. Praticamente atóxico para os pássaros e abelhas é levemente tóxico para os peixes e outros organismos aquáticos (EXTOXNET, 1996).

Oliveira-Brett e Silva (2002), investigando a ação cancerígena de derivados de triazinas, verificaram que estes provocam danos no DNA, como formação de aductos. Dentro desse grupo de herbicidas, a atrazina apresenta grande importância sendo largamente empregada em culturas de milho, cana-de-açúcar e soja, as quais são as mais produtivas do Brasil, sendo que de 70.000 a 90.000 toneladas foram mundialmente aplicadas por ano na década de 90 (Steinberg *et al.*, 1995). A atrazina é um dos herbicidas mais comumente utilizados no mundo (Tillitt *et al.*, 2010).

No Brasil a atrazina ainda é bastante utilizada, tendo o seu valor máximo permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na Resolução nº 357 de 2005 de $2 \mu\text{gL}^{-1}$ em água doce de Classe 1, a qual é destinada: ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e, à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; e também em água doce de Classe 3, a qual é destinada: ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas, forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; e à dessedentação de animais.

Quanto aos efeitos tóxicos da atrazina em mamíferos, particularmente, são referidos na literatura: interferência na síntese e na ação de hormônios (Larson *et al.*, 1998; Stoker *et*

al., 1999; Cooper *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2011), possível ação cancerígena (Eldridge *et al.*, 1999; Birnbaum e Fenton, 2003; Manske *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2007), e ainda, comprometimento de órgãos hematopoiéticos e do sistema imune (Devos *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2007).

Quanto ao efeito da atrazina em organismos aquáticos, particularmente em peixes, são vários os efeitos já registrados avaliando-se distintos biomarcadores. Esses efeitos da intoxicação aguda por atrazina variam em relação à concentração e à espécie analisada, com concentração média letal (CL₅₀) variando de 3 a 45 mgL⁻¹ (Elia *et al.*, 2002; Spanò *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2006; Paiva, 2010), embora efeitos danosos tenham sido registrados com o emprego de baixas concentrações em experimentos de intoxicação crônica, como 5 µgL⁻¹ em truta arco-íris (Fischer-Scherl *et al.*, 1991). Entre os efeitos descritos por ação da atrazina, pode-se destacar: alterações no comportamento (Fischer-Scherl *et al.* 1991; Steinberg *et al.*, 1995; Saglio e Trijasse, 1998, Solomon *et al.*, 2008), alterações morfológicas e conseqüentemente funcionais em: brânquias (Neskovic *et al.*, 1993; Alazemi *et al.*, 1996, Paulino, 2011), rins (Fischer-Scherl *et al.* 1991; Oulmi *et al.*, 1995, Paiva, 2010) e fígado (Neskovic *et al.* 1993; Biagianti-Risbourg e Bastide, 1995; Paiva, 2010), além de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (Ventura, 2004).

Embora estudos para verificação da presença de xenobióticos em coleções de água, como aquele realizado por Laabs *et al.* (2002) e mais recentemente por Giari *et al.* (2012), sejam muito importantes para alertar sobre o risco de contaminação por xenobióticos, analisar somente as condições físico-químicas da água não é suficiente para afirmar se esta se apresenta adequada para os organismos ali presentes, pois tais análises fornecem uma resposta momentânea do que pode ser altamente dinâmico.

Assim, ensaios em ecotoxicologia aquática se propõem à verificação da ação dos xenobióticos, através do emprego de bioindicadores, espécies escolhidas por sua sensibilidade ou tolerância a vários parâmetros, como poluição orgânica ou outros tipos de poluentes (Washington, 1984; Lopes *et al.*, 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Nestes organismos essa verificação ocorre através de biomarcadores, que são respostas biológicas que refletem uma medida de exposição do xenobiótico ou seu efeito tóxico (Peakall, 1994; Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Os biomarcadores são aplicados a fim de avaliar um estresse induzido nos organismos pela acumulação de xenobióticos, como os agrotóxicos, em seus tecidos. A ação rápida desse xenobiótico em nível celular e molecular faz o biomarcador capaz de fornecer um aviso prévio para o efeito de longo prazo do contaminante. Portanto, as respostas prévias e as alterações pré-patológicas podem ser detectadas antes de distúrbios como a ocorrência de doença, mortalidade ou mudança na população. Conseqüentemente, a estratégia de biorremediação pode ser aplicada antecipadamente a fim de prevenir algum dano irreversível ao meio ambiente (Koukouzika e Dimitriadis, 2005). Assim, existem biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes (Livingstone, 1993).

No caso de agrotóxicos, particularmente, biomarcadores histológicos têm se mostrado bastante adequados para avaliação da ação dessas substâncias em peixes (Paiva, 2010; Paulino, 2011; Piancini, 2011), uma vez que estas podem comprometer diferentes tecidos e órgãos, refletindo-se este comprometimento em alta taxa de mortalidade, principalmente em indivíduos mais jovens e, portanto, mais sensíveis ou, ainda, afetando a capacidade reprodutiva (Tillit, *et al.*, 2010; Hayes *et al.*, 2011) e a preservação da espécie, já que muitas dessas substâncias podem atuar como disruptores endócrinos (Versonnen *et al.*, 2004 a, b; Versonnen e Janssen, 2004; Stuchal *et al.*, 2006; Rohr e McCoy, 2010; Hayes *et al.*, 2011).

Em peixes, as brânquias consistem em biomarcadores de escolha quase obrigatória, uma vez que correspondem a um dos órgãos de primeiro contato com o ambiente aquático e é extremamente sensível dada a sua função respiratória e de osmoregulação (Mallat, 1985; Au, 2004; Dezfuli *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2009; Tagliaferro, 2009; Paulino, 2011). Vários autores, que compararam diferentes órgãos quanto à sensibilidade aos xenobióticos testados, comentam que as brânquias muito frequentemente correspondem a um dos órgãos mais comprometidos e onde o conjunto de alterações se mostra mais severo (Neskovic *et al.*, 1993; Yildirim *et al.*, 2006).

Assim, dada a relevância do emprego de brânquias de peixes como biomarcador em ensaios de ecotoxicologia, apresentamos a seguir alguns aspectos anatômicos, fisiológicos e histológicos desse órgão.

Os peixes possuem quatro pares de arcos branquiais em cada lado, sustentados por uma peça cartilaginosa, de onde partem projeções digitiformes curtas, os rastelos, que ficam voltados para a cavidade bucal e longos e numerosos filamentos, as lamelas primárias (LP) voltadas para a cavidade opercular. Em ambos os lados de cada lamela primária, estendem-se prolongamentos como projeções digitiformes denominadas lamelas secundárias (LS), lamelas respiratórias ou lamelas branquiais (Sabóia-Morais, 1997; Severi *et al.*, 2000).

Os rastelos são recobertos por um epitélio estratificado pavimentoso e podem apresentar células mucosas e botões sensitivos (Severi *et al.*, 2000).

A LP é revestida por um epitélio estratificado pavimentoso contendo: células mucosas (CM), células ricas em mitocôndrias (CRM) e células basais não diferenciadas.

Na LP a região que se encontra entre os locais de projeção digitiforme de duas LS consecutivas é chamada de região interlamelar (RI) ou região interlamelas secundárias (RIS) (Machado, 1999).

As CM são principalmente encontradas na base da LP e também no epitélio rastelar. São células largas ovóides, com núcleo localizado na porção basal. As CRM ou células do cloro (Cl), como eram denominadas anteriormente na literatura, estão localizadas na base das LP ou LS, também chamada de região interlamelas primárias (RIP) e secundárias (RIS), respectivamente. Apresentam forma ovóide com núcleo grande, central e cromatina descondensada, o citoplasma é eosinófilo. As células indiferenciadas (basais ou intermediárias) possuem núcleo grande comparado com o citoplasma (Machado, 1999; Lima *et al.*, 2009).

Basicamente, cada LS é composta de uma ou duas camadas de células epiteliais que são mantidas separadas por células pilares (CP). Este epitélio é denominado de epitélio respiratório (ER). As CP apresentam prolongamentos que delimitam os espaços sanguíneos, no interior dos quais o sangue flui. O tecido epitelial está sustentado por uma membrana basal que está em contato íntimo com as CP (Ferguson, 1995).

Quanto às alterações histopatológicas em brânquias, as mais comuns são: destacamento do epitélio respiratório (Rudnick *et al.*, 2009; Tagliaferro, 2009; Giari *et al.*, 2012), hipertrofia de células do epitélio respiratório (Tagliaferro, 2009), hiperplasia na

região interlamelar (Fanta *et al.*, 2003; Oropesa-Jiménez *et al.*, 2005; Dezfuli *et al.*, 2006; Velisek *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010), fusão de lamelas secundárias (Dezfuli *et al.*, 2006; Rudnicki *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010) e telangiectasia (aneurisma no vaso branquial) em LS (Dezfuli *et al.*, 2006; Rudnicki *et al.*, 2009; Tagliaferro, 2009; Yang *et al.*, 2010).

Assim como as brânquias, a pele dos peixes se encontra em contato direto e constante com o ambiente aquático e exibe adaptabilidade sob a influência de fatores ambientais, estações do ano e estado fisiológico (Wilkins e Jancsar, 1979 *apud* Shúilleabháin *et al.*, 2006; Pankhurst, 1982), refletindo-se assim como um órgão alvo da ação de poluentes (Kilemade *et al.*, 2002; Fujimoto *et al.*, 2008; Giari *et al.*, 2012). De fato, investigadores têm demonstrado que contaminantes ambientais podem alterar a estrutura bem como a composição celular da epiderme (Zaccone *et al.*, 1985 *apud* Shúilleabháin *et al.*, 2006; Burkhardt-Holm *et al.*, 2000).

De forma similar ao que foi comentado para brânquias acima, será descrito a seguir o aspecto geral da pele de teleósteos, mais particularmente em pacu, a partir dos relatos de Souza *et al.* (2003) e Fujimoto *et al.* (2008). Assim nessa espécie estes autores observaram uma epiderme delgada composta por um epitélio estratificado pavimentoso com três camadas de células: camada basal composta por dois tipos de células cilíndricas, uma com citoplasma claro e núcleo central denominada de células “club” (Cc) e outro tipo com citoplasma róseo e núcleo apical, a camada intermediária composta por células arredondadas com citoplasma róseo e núcleo central e a camada externa (faz contato com o meio externo) composta por células achatadas e pavimentosas e células mucosas (CM). As Cc podem ser encontradas em todas as camadas da epiderme. As CM apresentam formato arredondado, com núcleo basal e ocorrem na camada superficial e intermediária da epiderme. A epiderme pode conter botões sensitivos imersos entre as camadas de tecido epitelial de revestimento (Fujimoto *et al.*, 2008).

Entre a epiderme e a derme existe uma fina membrana basal. A derme superficial (DS) é delgada e apresenta melanóforos isolados ou aglomerados em determinadas regiões, sendo que muitas vezes estão dispostos em linha contínua.

Notou-se a disposição das escamas no corte longitudinal e transversal ao corpo do peixe, verificando-se, assim, a inserção das mesmas na derme.

A derme do pacu está constituída por tecido conjuntivo frouxo na camada superficial e por tecido conjuntivo denso modelado na derme profunda (DPr). Na DS, as fibras colágenas se apresentam finas, juntas e entrelaçadas, sem diferenciação quanto à disposição das mesmas. Na DPr encontram-se fibras colágenas que se prolongam em direção ao tecido muscular (TM) estriado esquelético localizado imediatamente após a camada dérmica profunda (Souza *et al.*, 2003).

Segundo Rajan e Banerjee (1991), as CM da camada superficial da epiderme, na presença de substâncias tóxicas, tornam-se, inicialmente hiperativas (produzindo grande quantidade de muco); persistindo o estímulo lesivo elas entram em degeneração, morrendo posteriormente. Assim, o estímulo tóxico atinge primeiramente as CM, no entanto, outros tipos celulares da epiderme podem ser igualmente afetados se a injúria persistir.

Assim, pelo exposto acima, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a sensibilidade de alevinos de pacu à atrazina, espécie escolhida por sua importância ecológica e sócio-econômica e também por que já se mostrou um bom bioindicador de contaminação aquática em outras pesquisas (Tagliaferro, 2009; Paiva, 2010). Assim, foi determinada a CL₅₀ para alevinos de pacu expostos à atrazina, bem como as alterações em brânquias e tegumento decorrentes dessa exposição aguda, com o intuito de verificar a validade de cada um destes biomarcadores nesta espécie frente à ação desse herbicida.

2. Objetivos

- Determinar em alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, a CL₅₀ em 96 horas para a atrazina;
- Avaliar os efeitos da intoxicação aguda induzida pela atrazina em brânquias e tegumento de pacu, empregando para tanto análise anatomopatológica, histopatológica qualitativa e semi-quantitativa para brânquias e no caso da pele análise anatomopatológica e histopatológica qualitativa da epiderme;
- Analisar a adequação dos biomarcadores empregados na avaliação dos efeitos tóxicos da atrazina em pacu.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais, manejo sanitário e manejo alimentar

Exemplares de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887), com peso médio de 3g, foram adquiridos em piscicultura localizada em Mogi Mirim/SP, que realiza desova e criação de pacu dentro dos princípios adequados, apresentando fonte própria de água, isenta de risco de contaminação com efluentes agrícolas, industriais e/ou esgoto. Lotes de 100 alevinos foram transportados em sacos plásticos – próprios para transporte de peixes – com capacidade para 50 litros, contendo aproximadamente 25 litros de água do tanque onde se encontravam originalmente os peixes, completando-se a capacidade desses sacos com oxigênio injetado. A captura e transporte dos peixes foram realizados no período da manhã, para minimizar ao máximo o estresse resultante dessas atividades.

Os alevinos foram transferidos para tanques-estoque no Laboratório de Bioensaios em Peixes, Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP onde foram mantidos em aclimatação por 30 dias. Nesses tanques plásticos, com capacidade para 140 litros, foi empregada água declorada com temperatura adequada para a manutenção de pacus, entre 24°C e 27°C, a qual foi constantemente oxigenada através de bombas aeradoras. O controle do pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido foram realizados diariamente e a avaliação de dureza da água duas vezes por semana, antes e após a remoção de sedimentos. Para o controle do pH foi utilizado o pHmetro - Q400A da Quimis[®], para concentração de oxigênio dissolvido foi utilizado o medidor portátil de oxigênio dissolvido - Q758P da Quimis[®] e para avaliação da dureza, o Kit Labcon test – Indústria e Comércio de Alimentos Desidratados Alcon Ltda. (Alcon[®]).

Após a transferência dos peixes para o tanque-estoque foi administrado sal de cozinha comercial na água dos tanques na concentração de 9gL⁻¹ por 24 horas. A sifonagem dos tanques ocorreu por 3 dias consecutivos com renovação de 1/3 da quantidade de água do tanque por dia. Este procedimento é realizado sempre que novos lotes chegam ao laboratório e tem a finalidade de eliminar ectoparasitas.

Os alevinos dos tanques-estoque foram alimentados com arraçoamento de 1,5% da biomassa (o cálculo para o arraçoamento foi realizado quinzenalmente) em duas parcelas diárias, uma pela manhã e outra à tarde. Foi utilizada ração comercial para alevinos (Pirá 36 2-4 mm, Guabi Nutrição Animal), a qual foi alíquotada e mantida sob refrigeração, para se evitar contaminação por fungos e, conseqüentemente, micotoxinas.

A remoção de sedimentos (resíduos de ração e fezes) foi realizada em dias alternados, sendo em seguida renovado 1/3 da quantidade de água do tanque. Finalmente, os peixes foram submetidos a um fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

3.2. Determinação da concentração média letal (CL₅₀)

3.2.1. Animais e manejo sanitário

Após aclimação dos alevinos às condições de laboratório, a rotina para os experimentos, realizados em duplicata, constou da transferência de alevinos de pacu dos tanques-estoque para os aquários experimentais, sendo 8 peixes por aquário. Foi feito novo cálculo da biomassa para esse lote reduzido, mantendo-se o arraçoamento de 1,5% ao dia dividido em duas parcelas.

Os alevinos pesados foram aleatoriamente distribuídos em oito aquários de vidro, cada um com 45L de água dechlorada; um aquário serviu como controle e os outros sete aquários foram destinados aos grupos tratados com atrazina. Por sete dias (período de aclimação às condições experimentais), os peixes foram mantidos em condições semelhantes àsquelas dos tanques-estoque, quanto à aeração, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dureza e manejo sanitário.

Finalizado o período de aclimação, a dieta foi suspensa dois dias antes do início do experimento, sendo que no dia do experimento foi realizada a última remoção de sedimentos e substituição de 1/3 do volume de água do tanque.

3.2.2. Preparação da solução de atrazina

Para obtenção da solução estoque, empregou-se a atrazina em solução comercial (6-chloro-N²-ethyl-N⁴-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine, 500gL⁻¹ na formulação Gesaprim 500 - CIBA-GEIGY Syngenta), a qual foi diluída em água destilada, e mantida a 4°C. A solução foi obtida na concentração 12,5gL⁻¹. A partir dessa solução foram obtidas as demais soluções com as concentrações nominais empregadas na avaliação de toxicidade aguda, sendo que o solvente empregado sempre foi água destilada.

3.2.3. Procedimento do experimento de intoxicação aguda

Em seguida teve início a avaliação da CL₅₀, em 96 horas em sistema estático para o herbicida em teste (OECD,1995).

Foram utilizados oito alevinos de pacu (5,06 ± 0,31g, média ± DP) para cada concentração, sendo que como o experimento foi realizado em duplicata, o número total de peixes por concentração foi de 16 (n=16)*.

A partir de experimentos preliminares, foram estabelecidas as concentrações nominais a serem testadas para a determinação da CL₅₀** , conforme protocolo experimental padrão para bioensaios em ecotoxicologia aquática (US-EPA, 2002). As seguintes concentrações nominais foram utilizadas, incluindo-se o controle: 0,0; 13,2; 17,6; 22,0; 26,4; 30,8; 35,2 e 39,6 mgL⁻¹. O controle da mortalidade foi realizado a cada 24 horas até o período final de exposição, sendo que os exemplares que não apresentaram movimentação opercular ou resposta táctil em cada intervalo foram retirados do aquário, obtendo-se em seguida a massa total e comprimento dos mesmos.

* Todo o manejo dos peixes está de acordo com as normas da Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, tendo sido o presente projeto submetido e aprovado por essa Comissão – Protocolo nº 1196-1 (Anexo I).

** Toda a água resultante dos tanques de tratamento e de lavagem de material contaminado com o herbicida foi recolhida. O armazenamento e a destinação dos resíduos químicos seguiram as normas da Comissão de Resíduos Químicos da UNICAMP, estando sob responsabilidade do Instituto de Biologia o descarte adequado das substâncias.

A concentração média letal (CL₅₀) com 95% de intervalo de confiança foi obtida utilizando o Método TSK (Trimmed Spearman-Kärber method) Versão 1.5, disponível nas normas da “United States Environmental Protection Agency” (US-EPA, 2002) (Trimmed Spearman-Kärber method disponível em: <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htm>) (Hamilton *et al.*, 1977).

3.3. Análise anatomo-histopatológica

Após a exposição de 96 horas, todos os exemplares sobreviventes de cada grupo foram necropsiados, sendo os exemplares sacrificados através de anestesia profunda empregando-se 2-fenoxietanol (1:600; SIGMA, St. Louis, MO, EUA). Em seguida foi realizada a análise anatomopatológica, observando-se a superfície externa do peixe e os órgãos internos *in locu*. Por fim, foram obtidas amostras de brânquia e pele, desses exemplares necropsiados, para análise histopatológica, em nível de microscopia de luz.

Nos experimentos de determinação da CL₅₀ foi realizada análise anatomopatológica em todos os alevinos, isto é, naqueles que morreram durante as 96 horas e nos que sobreviveram a esse período experimental, totalizando 16 peixes analisados por concentração.

3.3.1. Processamento de material para análise em microscopia de luz

Para realização da análise histopatológica foram colhidas, dos exemplares sobreviventes, duas amostras de brânquia, sendo uma da brânquia esquerda e outra da brânquia direita, e amostras de tegumento de duas regiões do lado esquerdo do corpo: região dorsal (entre a linha lateral e a nadadeira dorsal) e região ventral (na proximidade da nadadeira ventral). As amostras de brânquias e tegumento foram fixadas em solução de Bouin, em temperatura ambiente, por 24 horas. As amostras de brânquia, sem prévia descalcificação, e pele foram processadas para inclusão em parafina (Histosec – Merck).

Cortes de 5µm obtidos em micrótomo eletrônico (Leica RM 2145) foram corados pela Hematoxilina-Eosina para observação geral da morfologia de brânquias e pele.

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio fotônico (Nikon Eclipse E-800) equipado com câmera de vídeo Cool SNAP - Pro-color (Media Cybernetics, San Diego, CA, USA). Para captura das imagens foi utilizado o software Image Pro-plus (Media Cybernetics – versão 4.1.1.2). A documentação e análise das imagens foram realizadas no Laboratório de Criométodos e Embriologia Experimental, no DHE/IB – UNICAMP.

Para a avaliação semi-quantitativa das análises histopatológicas de brânquias, empregou-se o seguinte “*score*”: 0 para ausência da característica; 1 (pouco frequente) – para ocorrência da característica pontualmente localizada; 2 (média frequência) – para ocorrência intermediária da característica; e, 3 (muito frequente) – para ocorrência da característica amplamente distribuída pelo órgão (modificado de Schwaiger *et al.*, 1997). As características observadas foram: edema e afastamento na região interlamelar, hipertrofia e hiperplasia na região interlamelar, destacamento do epitélio respiratório, hipertrofia de células do epitélio respiratório, congestão, telangiectasia e fusão de lamelas secundárias.

3.4. Análises estatísticas

Para avaliar a ocorrência de diferença significativa entre o número de animais mortos por concentração foi utilizado o estimador de sobrevivência de Kaplan-Meier (Kaplan e Meier, 1958).

Para avaliar a alteração anatomopatológica na pele, manifestada na forma de hiperemia, foram observadas durante o experimento de determinação da CL₅₀ o número de animais com presença ou ausência da lesão em relação à concentração de atrazina testada e então foi comparado com o uso do teste Qui-quadrado. O teste exato de Fisher foi usado para verificar as diferenças significantes entre peixes dos grupos tratados e controles.

Em relação às análises histopatológicas, a média e o desvio padrão obtidos para cada tipo de lesão observada em brânquia, foram avaliados estatisticamente através do teste F da Análise de Variância (ANOVA) em níveis de 5% e 10% de significância e através do

teste de Dunnett em nível de 1%, 5% e 10% de significância dependendo do tipo de lesão. Essas mesmas metodologias foram utilizadas para avaliar estatisticamente a média do conjunto das lesões branquiais. Este procedimento foi realizado, também, para avaliação de ocorrência de diferença significativa na comparação da média do conjunto de lesões entre os grupos. Todas essas análises estatísticas foram realizadas com o uso do software Minitab 15.1 (Minitab Company Information – State College, PA, USA).

4. Resultados

4.1. Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água registrados (média \pm DP) durante os períodos de aclimação e do experimento de determinação da CL_{50} mantiveram-se em: pH (8,17 \pm 0,15), temperatura (24,1 \pm 2,7), oxigênio dissolvido (9,6 \pm 2,5) e dureza branda (50 a 150 mgL⁻¹ de CaCO₃).

4.2. Determinação da CL_{50}

A taxa de mortalidade dos alevinos variou de acordo com a concentração de atrazina testada (Tabela 1).

Não houve mortalidade no grupo controle e nos grupos tratados com as menores concentrações (13,2 e 17,6 mgL⁻¹).

Nos demais grupos tratados se observou mortalidade, sendo que para o grupo T6 (35,2 mgL⁻¹) 87,5% da mortalidade ocorreu dentro das primeiras 24 horas e os 12,5% restantes ocorreu dentro das 24 horas seguintes de exposição. Para o grupo T7 (39,6mgL⁻¹) 100% da mortalidade ocorreu dentro das primeiras 24 horas de exposição.

Como observado na tabela 1, a análise de significância da mortalidade através do estimador de sobrevivência de Kaplan-Meier, indicou que as concentrações aplicadas nos grupos T5, T6 e T7 (30,8; 35,2; e, 39,6 mgL⁻¹, respectivamente) são estatisticamente significativas ao nível de probabilidade de 1%, enquanto que a concentração aplicada no grupo T3 (22,0 mgL⁻¹) foi estatisticamente significativa ao nível de probabilidade de 5%.

Tabela 1. Taxa de mortalidade (%) de alevinos de pacu no estudo da toxicidade aguda induzida pela atrazina.

	C	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	0,0mgL ⁻¹	13,2mgL ⁻¹	17,6mgL ⁻¹	22,0mgL ⁻¹	26,4mgL ⁻¹	30,8mgL ⁻¹	35,2mgL ⁻¹	39,6mgL ⁻¹
24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	87,5**	100,0**
48h	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5	0,0	12,5	0,0
72h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
96h	0,0	0,0	0,0	25,0*	0,0	50,0**	0,0	0,0
Total	0,0	0,0	0,0	25,0*	12,5	50,0**	100,0**	100,0**

* Valor significativo para p<0,05 comparado ao grupo controle.

** Valor significativo para p<0,01 comparado ao grupo controle.

A CL₅₀ (95% de limite de confiança) para atrazina em alevinos de pacu após 24h e 96h de exposição ao herbicida foi 34,4 mgL⁻¹ (33,63 – 35,15 mgL⁻¹) e 28,58 mgL⁻¹ (26,16 – 31,23 mgL⁻¹), respectivamente.

4.3. Análise anatomopatológica

Os alevinos de pacu do grupo controle apresentaram a anatomia típica para a espécie: corpo de forma romboidal, alto e comprimido lateralmente (Figura 1A).

O grupo controle apresentou pele e brânquias com as características anatômicas usuais para a espécie (Figuras 1A, 1B e 1C).

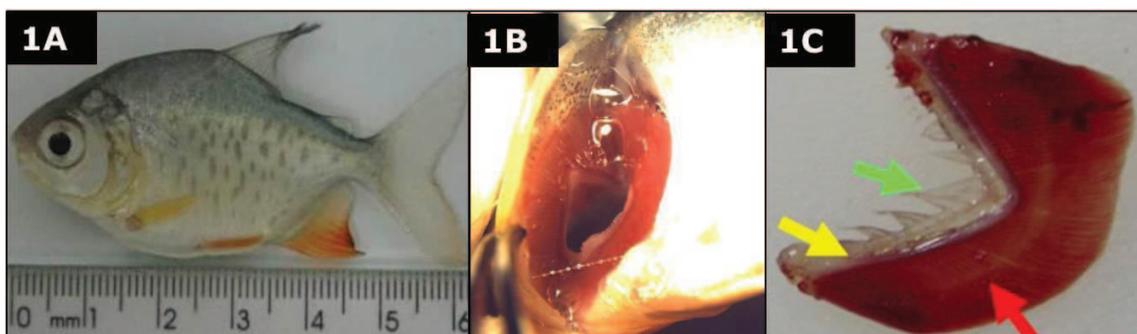


Figura 1 (A – C) Alevinos de pacu do grupo controle. (A) Notar a estrutura macroscópica normal da pele com coloração da região ventral mais clara que a da região dorsal, bem como a típica distribuição de pigmento em alevinos da espécie. (B) Cavidade opercular onde se observa a localização das brânquias de coloração vermelho rubro. (C) Brânquia de pacu onde se nota o arco branquial (seta amarela), o rastelo (seta verde) e os filamentos branquiais (seta vermelha).

Anatomicamente a pele dos alevinos expostos às concentrações de 13,2 e 17,6mgL⁻¹ apresentaram as mesmas características anatômicas descritas para o controle. Já nos exemplares expostos às concentrações maiores que 22,0mgL⁻¹ se observou hiperemia em várias regiões do corpo (Figura 2A).

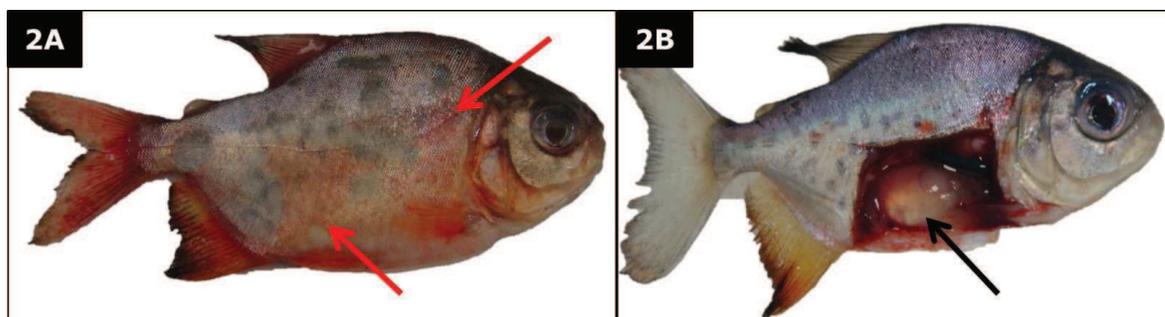


Figura 2 (A – B) Alevinos de pacu tratados com 30,8 mgL⁻¹ de atrazina. (A) Notar hiperemia na pele (setas vermelhas). (B) Observar a dilatação do estômago (seta preta).

Quanto às brânquias, os exemplares tratados com as diferentes concentrações de atrazina apresentaram as características anatômicas descritas para o grupo controle.

Na análise anatomopatológica, também se verificou: a presença de dilatação da região ventral, ao ser removido o estômago notou-se a presença de líquido com aspecto claro e aquoso na cavidade deste (Figura 2B) e, finalmente, ascite sanguinolenta.

Os resultados anatomopatológicos observados em cada grupo experimental estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de peixes com alterações anatomopatológicas em cada grupo experimental.

Grupo	Concentração Atrazina (mgL ⁻¹)	Alterações anatomopatológicas (%)				
		Dilatação da região ventral	Dilatação do estômago	Ascite	Hiperemia na pele	Brânquia
C	0,0	0	0	0	0	0
T1	13,2	0	0	0	0	0
T2	17,6	50% ^{ab}	50% ^{ab}	0	0	0
T3	22,0	75% ^{ab}	75% ^{ab}	25% ^a	12,5%	0
T4	26,4	100% ^{ab}	100% ^{ab}	25% ^a	25% ^a	0
T5	30,8	100% ^{ab}	100% ^{ab}	0	100% ^a	0
T6	35,2	100% ^{ab}	100% ^{ab}	62,5% ^a	100% ^a	0
T7	39,6	100% ^{ab}	100% ^{ab}	0	100% ^a	0

C – controle; T – tratado.

n=16 (equivalente a 100%).

^ap<0,01 comparada ao grupo controle (atrazina= 0,0 mgL⁻¹).

^bAlterações anatomopatológicas mais significantes (p<0,01).

Quanto às características anatomopatológicas observadas no grupo tratado, com base no teste exato de Fisher, a partir do grupo tratado com 17,6 mgL⁻¹ foi evidenciado ao

nível de 1% de significância ($p < 0,01$) que existe efeito significativo dos tratamentos sobre as alterações de dilatação da região ventral e dilatação do estômago (Tabela 2).

No caso da ascite sanguinolenta foi evidenciado ao nível de 1% de significância ($p < 0,01$) que existe efeito dos tratamentos nas concentrações 22,0; 26,4; e, 35,2 mgL^{-1} (Tabela 2).

A análise de significância para hiperemia na pele através do teste exato de Fisher indicou que as concentrações aplicadas nos grupos T4 a T7 (26,4 a 39,6 mgL^{-1}) são estatisticamente significativas, ao nível de probabilidade de 1% para esta alteração.

Por fim, observou-se que as variáveis mais sensíveis aos tratamentos, ou seja, as alterações que mais evidenciaram diferenças entre os tratamentos foram: a dilatação da região ventral e a dilatação do estômago.

4.4. Análise histopatológica

4.4.1. Brânquia

Nos alevinos de pacu do grupo controle a estrutura histológica geral das brânquias seguiu o padrão dos demais teleosteos (Figura 3), contudo em alguns exemplares se notou algumas alterações como: destacamento do ER, hipertrofia de células do ER, hiperplasia na RI, fusão lamelar, congestão na LS e telangiectasia na L, porém sempre registradas com nível de “*score*” equivalente a 1, ou seja, pouco frequente na área analisada (Tabela 3).

As alterações branquiais observadas nos alevinos dos grupos expostos às diferentes concentrações de atrazina foram: telangiectasia nas LS (Figuras 4 A, B e G), fusão lamelar (Figuras 4C, E e F), destacamento do ER (Figuras 4C e D), hiperplasia na RI (Figuras 4C, E – G), hipertrofia de células do ER (Figuras 4D e F), edema na RI e afastamento do epitélio interlamelar (Figuras 4E e G), hipertrofia de células do epitélio interlamelar (Figura 4E) e congestão nas LS (Figura 4G) (Tabela 3).

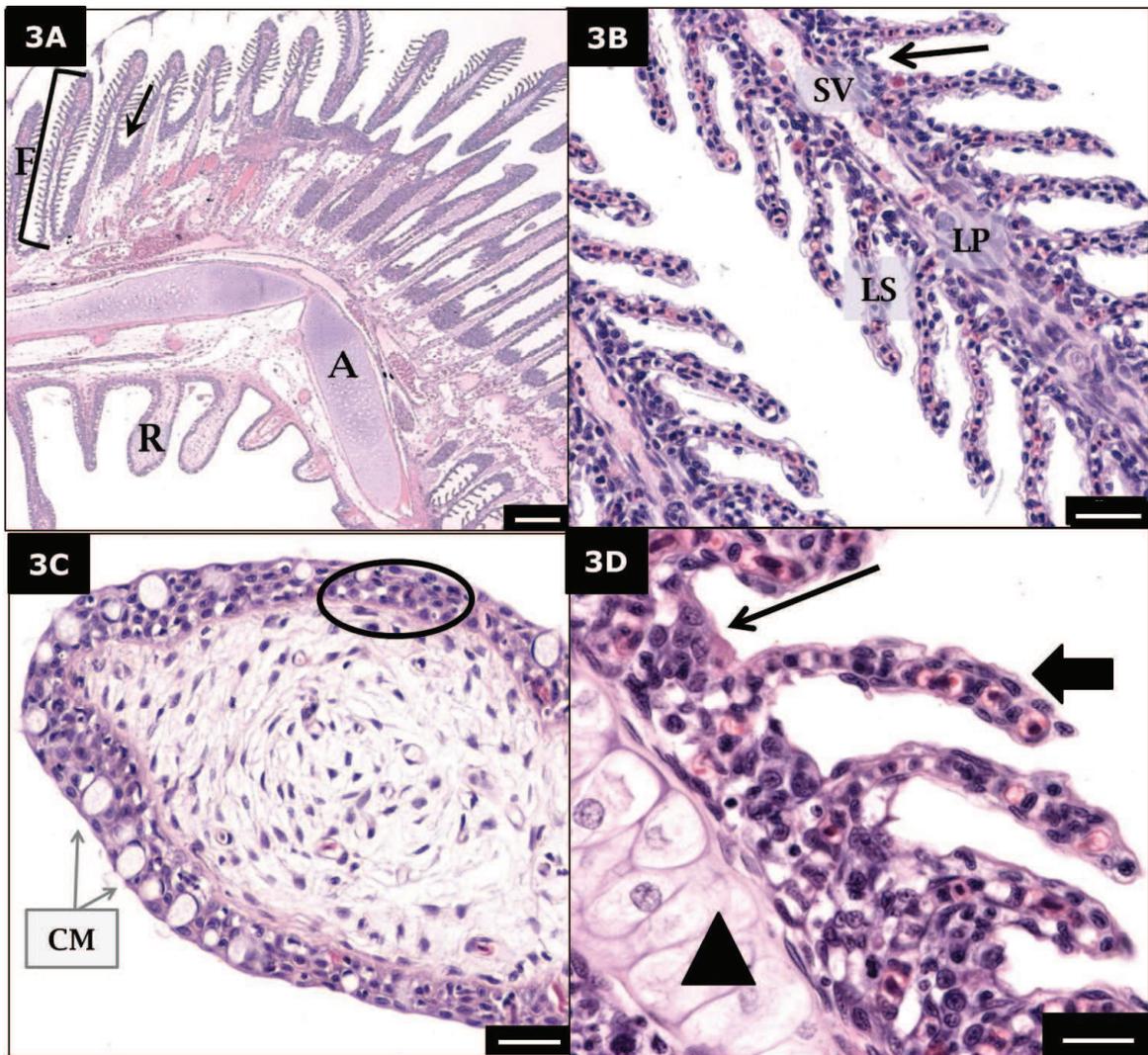


Figura 3 (A – D) Fotomicrografias de brânquia de alevinos de pacu do grupo controle. (A) Fotomicrografia panorâmica onde se notam: rastelo (R), arco branquial (A), filamentos branquiais (área demarcada – F) e região interlamelas primárias (seta preta). (B) Observar a integridade das lamelas primária (LP), secundária (LS) e região interlamelar (seta preta estreita). No eixo da LP notar o sistema vascular (SV). (C) Notar no rastelo, o epitélio estratificado pavimentoso (elipse preta) e a presença de células mucosas (CM). (D) Notar a integridade do epitélio (ER) que recobre as LS (seta preta larga) e a região interlamelar (seta preta estreita) e no eixo da LP o suporte cartilaginoso (cabeça de seta). Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE). Barra: 200 μ m (A), 30 μ m (B e C) e 10 μ m (D).

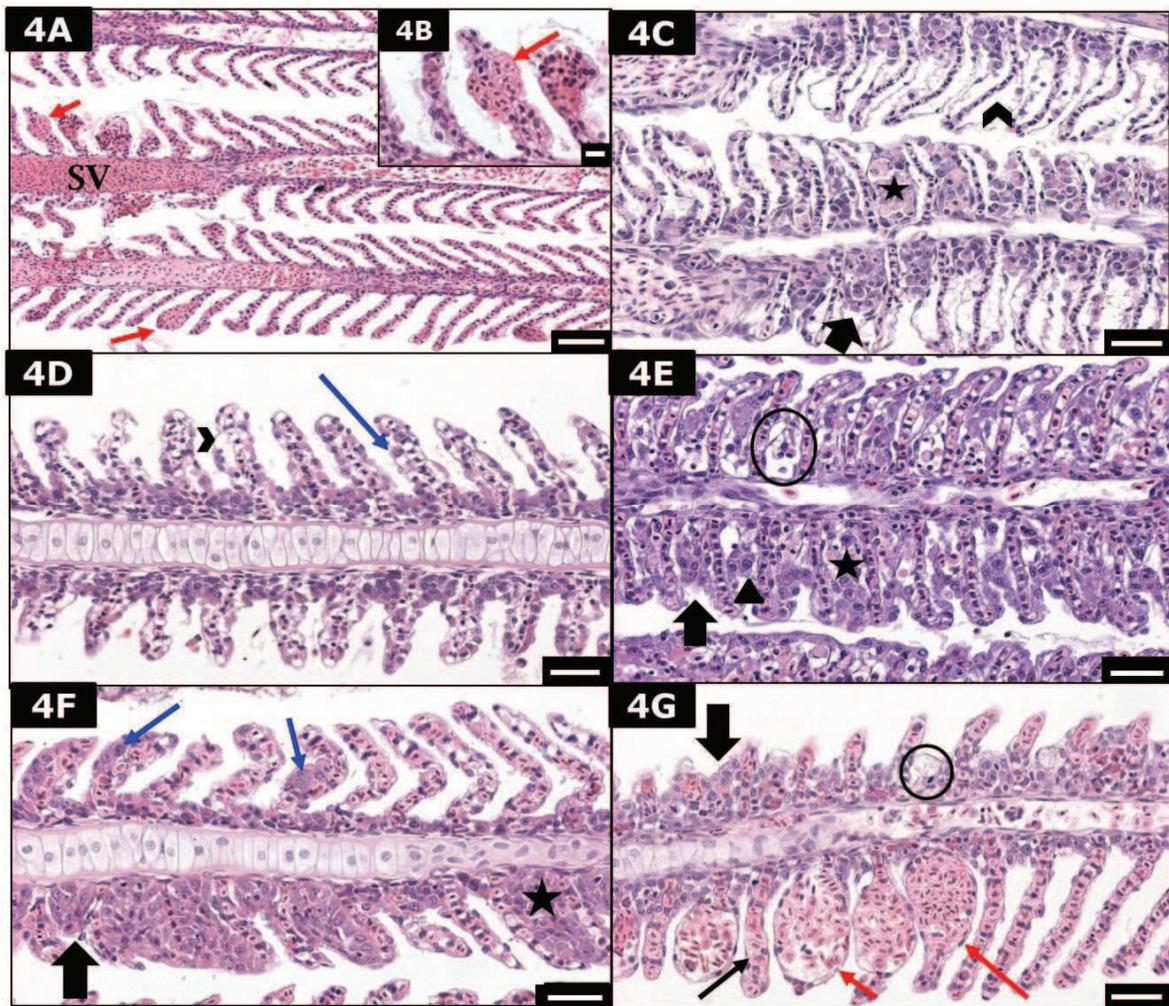


Figura 4 (A – G) Fotomicrografias de brânquias de alevinos de pacu dos grupos tratados com diferentes concentrações de atrazina. (A) Brânquia de alevino do grupo tratado 1 ($13,2 \text{ mgL}^{-1}$). Observar SV da LP com congestão e telangiectasia na LS (seta vermelha). (B) Detalhe de 4A. (C) Brânquia de alevino do grupo tratado 2 ($17,6 \text{ mgL}^{-1}$). Notar destacamento do ER (cabeça de seta), hiperplasia da RI (seta larga) e fusão lamelar (estrela). (D) Grupo tratado 3 ($22,0 \text{ mgL}^{-1}$). Observar na LS, destacamento do ER (cabeça de seta) e hipertrofia de células do ER (seta azul). (E) Grupo tratado 4 ($26,4 \text{ mgL}^{-1}$). Notar hipertrofia em célula de revestimento da LP (cabeça de seta), edema na RI (círculo), hiperplasia da RI (seta larga) e fusão lamelar (estrela). (F) Grupo tratado 5 ($30,8 \text{ mgL}^{-1}$). Observar hipertrofia de célula do ER (seta azul), hiperplasia da RI (seta larga) e fusão lamelar (estrela). (G) Grupo tratado 5 ($30,8 \text{ mgL}^{-1}$). Notar congestão (seta delgada preta) e telangiectasia (seta vermelha) na LS, hiperplasia (seta larga preta) e edema na RI (círculo). Coloração: HE. Barra: $50 \mu\text{m}$ (A), $5 \mu\text{m}$ (B) e $30 \mu\text{m}$ (C – G).

A frequência de ocorrência de cada tipo de alteração branquial é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência de ocorrência de cada tipo de alteração branquial

Grupos	C	T1	T2	T3	T4	T5
Concentrações	0 mgL ⁻¹	13,2mgL ⁻¹	17,6mgL ⁻¹	22,0mgL ⁻¹	26,4mgL ⁻¹	30,8mgL ⁻¹
Alterações	Frequência de			Ocorrência		
Destacamento do ER	0,88±0,342	1	1,00±0,516	1,67±0,985	1,71±0,914	1,25±0,463
Edema e afastamento na RI	0	0,13±0,342	0,50±0,730	0,33±0,492	1,29±1,204	0,75±0,463
Hipertrofia de células do ER	0,75±0,447	0,88±0,342	1	1,83±0,937	2,43±0,514	1,50±0,926
Hipertrofia de células da RI	0	0,88±0,957	0,75±1,00	0,17±0,389	0,14±0,363	0,25±0,463
Hiperplasia da RI	1	1,13±0,342	2,00±0,730	1,17±0,389	1,29±0,726	1,25±0,463
Fusão lamelar	0,75±0,447	1	1,63±0,719	0,50±0,522	0,86±0,663	1
Congestão (LS)	0,88±0,342	1,25±0,447	0,75±0,447	1,17±0,389	1,14±0,363	2,00±0,756
Telangiectasia (LS)	0,88±0,342	1,63±0,885	0,75±0,447	1,50±0,798	1	1

Dados apresentados como média±DP.

C: controle; T: tratado.

* Valor significativo para p<0,10 pelo teste de Dunnett.

≠ Valor significativo para p<0,05 pelo teste de Dunnett.

§ Valor significativo para p<0,01 pelo teste de Dunnett.

Com base na análise comparativa, como mostrado em destaque (elipse) na tabela 3, a hipertrofia de células do epitélio respiratório foi a alteração estatisticamente mais significativa pelo teste de Dunnett quando comparada com às demais alterações registradas em brânquia.

4.4.2. Pele

Os exemplares do grupo controle apresentaram o arranjo histológico da pele com a morfologia típica para a espécie.

A epiderme se mostrou delgada, composta por camadas sobrepostas de células epiteliais (Figuras 5A – D). Nessa epiderme também foram observadas células mucosas (Figuras 5A, C e D) e células “club” (Figuras 5C e D).

As células “club” (Cc) foram observadas distribuídas em todas as camadas da epiderme.

As células mucosas (CM) apresentaram formato arredondado, com núcleo basal e localizadas nas camadas superficial e intermediária da epiderme (Figuras 5A, C e D). Botões sensitivos também foram observados na epiderme (Figura 5B).

A derme do pacu se mostrou composta por tecido conjuntivo frouxo na camada superficial e por tecido conjuntivo denso modelado na derme profunda (DPr). Na derme se observou a presença de melanóforos, isolados ou aglomerados em determinadas regiões, sendo que muitas vezes estão dispostos em linha contínua (Figura 5A). Notou-se a presença de escamas (Figuras 5A – D) e tecido muscular estriado esquelético (TM) localizado imediatamente após a DPr (Figura 5A).

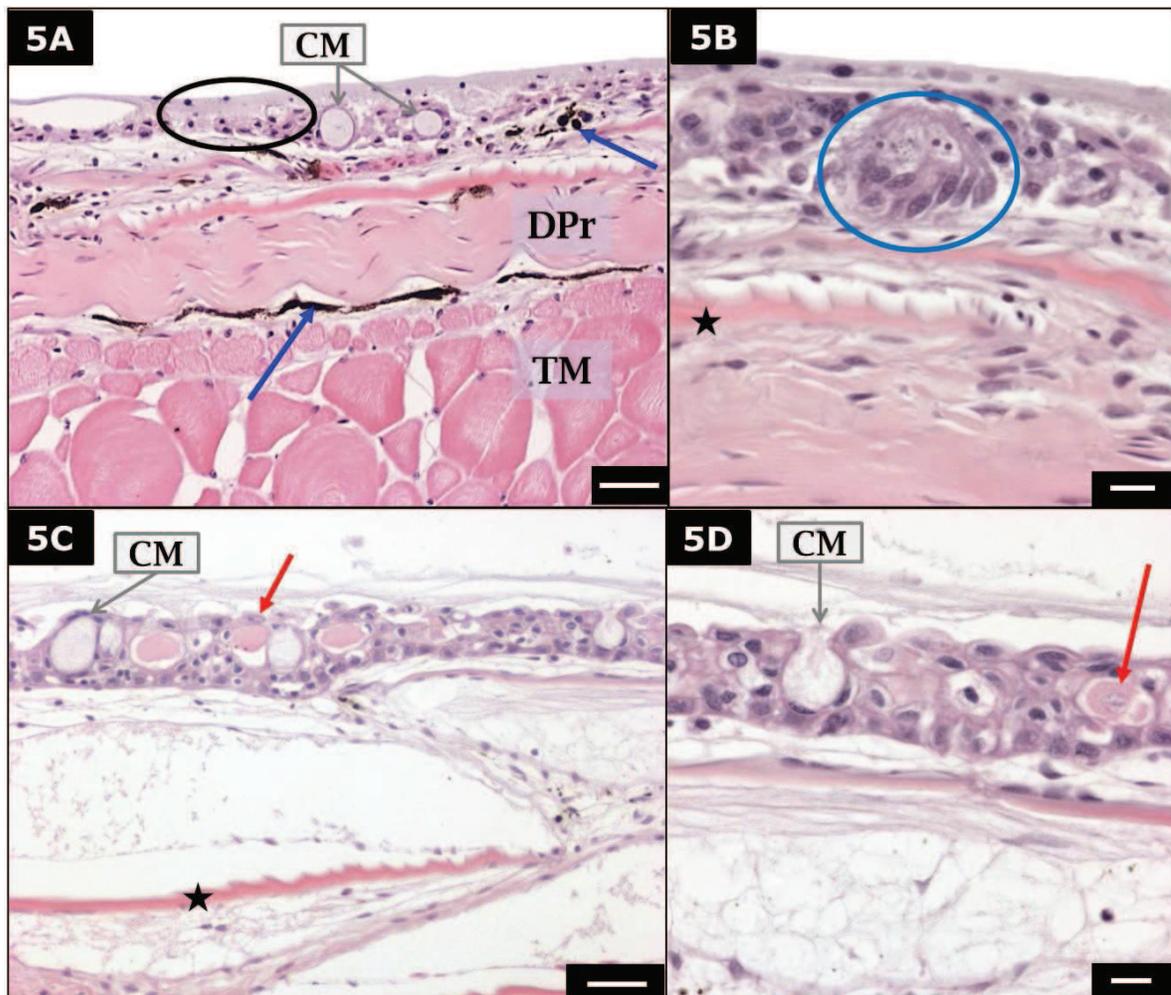


Figura 5 (A – B) Fotomicrografias das peles dorsal e (C – D) ventral de alevinos de pacu do grupo controle. (A) Notar a integridade do epitélio de revestimento (elipse preta), a presença de CM e de melanóforos (setas azuis) na epiderme; e, sob a derme profunda (DPr), notam-se melanóforos dispostos de modo contínuo e tecido muscular (TM). (B) Observar um botão sensitivo (círculo azul) no epitélio estratificado de revestimento e escama (estrela). (C) Observar a presença de CM e Cc (seta vermelha) entre as células epiteliais que revestem este órgão e escamas na derme (estrela). (D) Notar CM com abertura para o exterior do órgão e Cc (seta vermelha). Coloração HE. Barra: 30 μ m (A e C) e 10 μ m (B e D).

Quanto ao arranjo estrutural observado na análise histológica do tegumento dos alevinos pertencentes aos grupos tratados (Figuras 6 e 7) foram observadas as mesmas camadas e composição celular descritas para o grupo controle. As únicas alterações observadas foram desarranjo do epitélio de revestimento e edema abaixo da escama (Figura 6B), características essas observadas em 2 exemplares expostos às concentrações de 26,4 mgL⁻¹ e 1 exemplar exposto à concentração de 30,8mgL⁻¹ de atrazina.

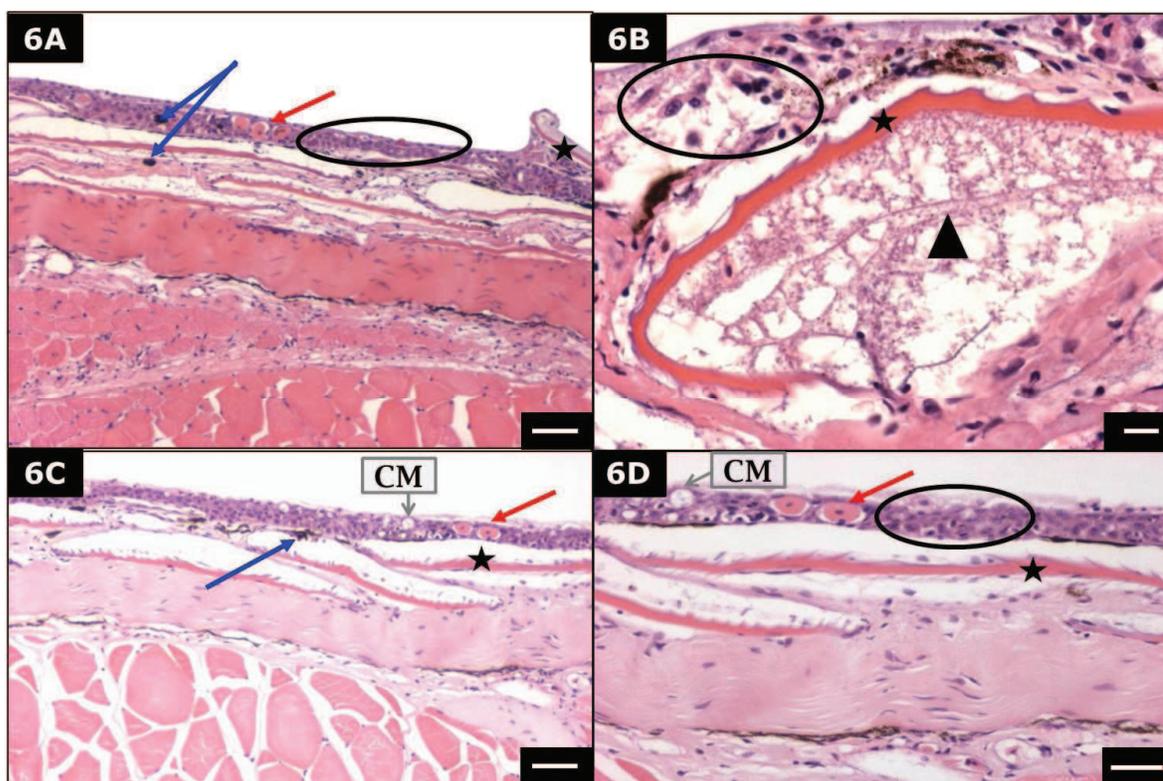


Figura 6 (A – D) Fotomicrografias da pele dorsal de alevinos de pacu dos grupos tratados com 26,4mgL⁻¹ (A e B) e 30,8mgL⁻¹ (C e D) de atrazina. (A) Notar a integridade do epitélio estratificado pavimentoso (elipse preta) bem como a presença de Cc (setas vermelhas), melanóforos (setas azuis) e escama na epiderme (estrela). (B) Observar que as células que compõem o epitélio de revestimento (elipse preta) não se encontram dispostas de maneira organizada como na figura 6A, além da presença de edema (cabeça de seta) abaixo da escama (estrela). (C) Notar a presença de CM e Cc (seta vermelha) na epiderme. Na derme, também íntegra, presença de escamas (estrela) e melanóforos (seta azul). (D) Notar a integridade do ER (elipse preta). Detalhe para a CM, Cc (seta vermelha) e escama (estrela) demonstradas na figura 6C. Coloração HE. Barra: 50µm (A e C), 10µm (B) e 30µm (D).

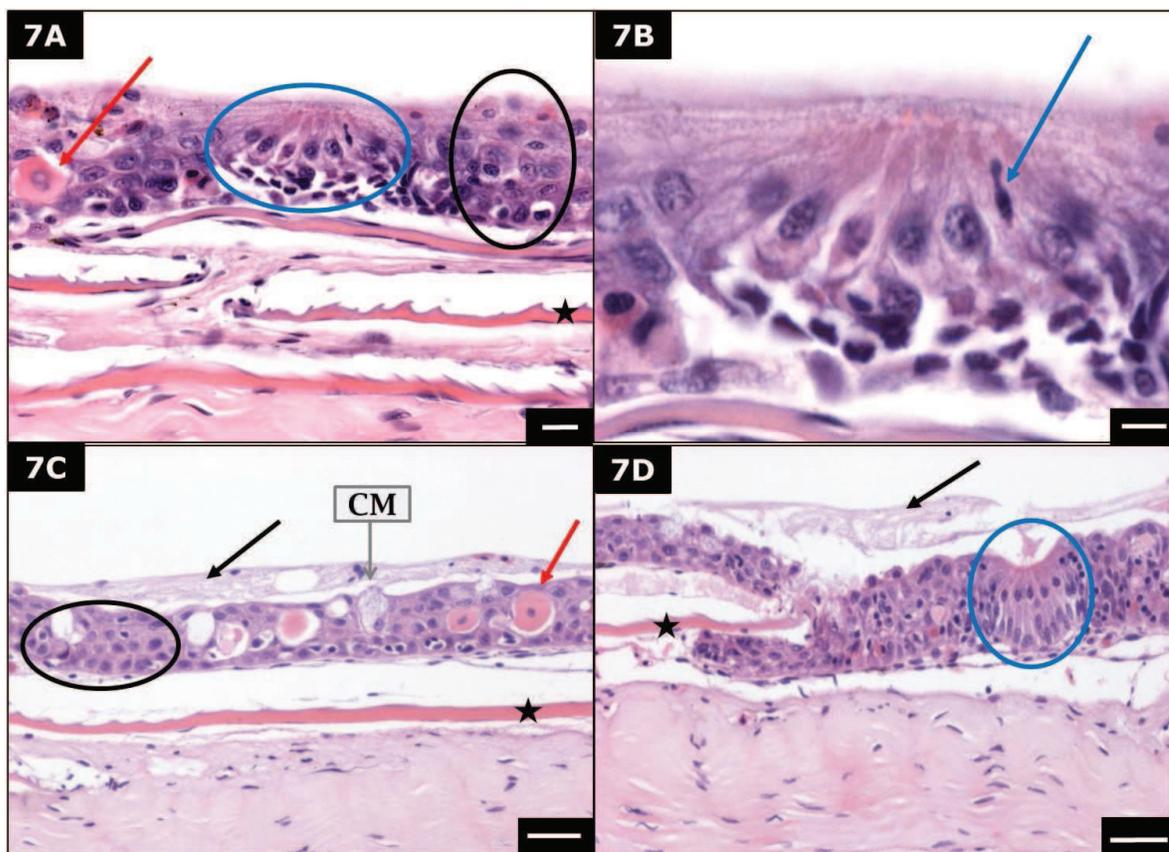


Figura 7 (A – D) Fotomicrografias da pele ventral de alevinos de pacu dos grupos tratados com $26,4\text{mgL}^{-1}$ (A e B) e $30,8\text{mgL}^{-1}$ (C e D) de atrazina. (A) Observar, além das Cc (seta vermelha), integridade das células do ER (elipse preta) e escamas (estrela), a presença de um botão sensitivo que faz contato com o exterior (círculo azul). (B) Detalhe do botão sensitivo demonstrado na figura 7A. Notar a presença de uma célula de sustentação do botão com cromatina condensada e núcleo afilado (seta azul). (C) Observar a integridade do epitélio estratificado pavimentoso (elipse preta), a presença de CM, Cc (seta vermelha) e a deposição de muco na superfície (seta preta) do mesmo. Na derme, uma escama (estrela). (D) Notar um botão sensitivo que faz contato com o exterior (círculo azul), uma escama em processo de externalização (estrela) e a deposição de muco na superfície (seta preta). Coloração HE. Barra: $10\mu\text{m}$ (A), $5\mu\text{m}$ (B) e $30\mu\text{m}$ (C e D).

5. Discussão

5.1. Determinação da CL₅₀

Em alevinos de pacu com peso médio de $5,06\text{g} \pm 0,31$ a CL₅₀ para atrazina em 96h de exposição em sistema estático foi de $28,58\text{ mgL}^{-1}$. Entre os teleósteos de água doce, já pesquisados, nota-se uma considerável variação nos valores obtidos de CL₅₀ para atrazina, o que ocorre em função da maior ou menor sensibilidade da espécie a xenobióticos, do peso ou tamanho dos exemplares, do tipo de ensaio (estático ou semi-estático) e, ainda, se no ensaio as soluções teste foram preparadas com a atrazina padrão para análise (98% pureza), ou formulação comercial de herbicida contendo atrazina. Assim, em ensaios similares ao realizado neste trabalho, com alevinos expostos à formulação comercial em sistema estático, os valores de CL₅₀ obtidos foram: $5,02\text{ mgL}^{-1}$ em tilápia, *Oreochromis niloticus*, com comprimento entre 1,5cm e 3cm (Botelho *et al.*, 2009) e $10,2\text{ mgL}^{-1}$ em jundiá, *Rhamdia quelen*, com peso médio de $15,7 \pm 3,3\text{ g}$ (Kreutz *et al.*, 2008). Assim, o pacu demonstrou ser mais resistente que essas espécies à mortalidade induzida pela atrazina, contudo a análise das alterações branquiais nos exemplares sobreviventes indicou sérios danos que podem implicar em comprometimento da respiração e osmoregulação. Nesse contexto, Neskovic *et al.* (1993) reforçaram que a mortalidade como único biomarcador de contaminação aquática é de utilidade limitada, razão pela qual ensaios de toxicidade, em geral, empregam vários biomarcadores.

5.2. Análise anatomopatológica

As alterações anatomopatológicas mais significantes observadas em alevinos de pacu expostos à atrazina foram: dilatação da região ventral e dilatação do estômago com presença de líquido de aspecto claro e aquoso. A dilatação da região ventral provavelmente decorreu de edema e transudado na cavidade celomática, bem como da dilatação do

estômago, neste caso possivelmente também decorrente de comprometimento vascular na mucosa gástrica e outras túnicas que resultariam em acúmulo de líquido na luz do órgão.

Dilatação ventral também foi notada por Velisek *et al.* (2008), em experimento de intoxicação aguda (96h) pelo herbicida metribuzina ($89,3 \text{ mgL}^{-1}$), da família das triazinas, em truta arco - íris, o que atribuíram à presença de transudado na cavidade do corpo. Segundo esses autores, o transudado aparentou resultar do escape de proteínas seguido de danos em células epiteliais do túbulo renal, uma conclusão baseada na presença de hipoproteinemia nestes peixes. De fato, Paiva (2010) também observou alterações renais, como degeneração tubular, em alevinos de pacu expostos à atrazina, que poderiam contribuir para a formação de ascite.

Assim, a dilatação da cavidade celomática e do estômago, em conjunto com a hiperemia cutânea também notada em pacu, sugerem comprometimento vascular resultante da ação sistêmica da atrazina, inclusive efeitos vasculares em mamíferos já foram associados a esse herbicida (Chan *et al.*, 2007), porém em peixes e outros organismos aquáticos ensaios mais específicos são necessários para avaliar esta ação da atrazina.

5.3. Análise histopatológica

5.3.1. Brânquia

A morfologia branquial de alevinos de pacu descrita neste estudo apresenta os mesmos aspectos gerais descritos para os teleósteos (Fernandes e Perna-Martins, 2001; Vigliano *et al.*, 2006; García-Santos *et al.*, 2007), bem como aspectos anatômicos descritos para a espécie (Severi *et al.*, 2000; Rudnicki, 2004; Cruz, 2005; Tagliaferro, 2009).

Segundo Mallat, 1985, a brânquia em peixes é um dos órgãos mais sensíveis por causa do seu contato íntimo e contínuo com a água.

De fato, mesmo alevinos do grupo controle apresentaram alterações, embora notadamente com ocorrência pouco frequente quando comparadas às alterações descritas nos grupos tratados. Estas alterações podem ter sido induzidas pela manipulação do

material, durante a colheita e preparação do mesmo para análise histopatológica, bem como pela presença de cistos de parasitas. De fato, Barassa *et al.* (2012) descreveram para *Leporinus obtusidens* alterações branquiais similares decorrentes da infecção por mixosporídeos, que são frequentemente encontrados em peixes de rios e de piscicultura (Lom e Dyková, 2006).

As alterações histopatológicas branquiais observadas em decorrência da intoxicação aguda induzida por atrazina em alevinos de pacu ocorreram apenas em filamentos e lamelas branquiais. Assim, na região interlamelar foi possível observar edema e afastamento epitelial, hipertrofia de células do epitélio interlamelar e hiperplasia; no epitélio respiratório houve destacamento e hipertrofia celular; e, nas lamelas secundárias, congestão, telangiectasia e fusão lamelar. Vários outros estudos demonstraram efeitos similares em brânquias de peixes expostos à atrazina (Neskovic *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2010; Paulino, 2011) e outros agroquímicos (Oropésa-Jiménez *et al.*, 2005; Dezfuli *et al.*, 2006; Ramírez-Duarte *et al.*, 2008), indicando que estas alterações histopatológicas são características de injúria química, porém não permitem a direta associação com o agente indutor.

Quanto ao destacamento do epitélio respiratório e a fusão lamelar, Mallat (1985) comentou ser esta uma resposta adaptativa do organismo, pois o destacamento epitelial aumenta a distância entre o agroquímico e a corrente sanguínea; e a fusão lamelar pode ser uma medida de proteção por diminuir a quantidade de áreas superficiais branquiais disponíveis. De fato, notou-se em pacu que estas alterações tornaram-se mais evidentes em exemplares expostos às maiores concentrações. Mallat (1985) também comentou que o destacamento do epitélio respiratório ocorre com mais frequência em peixes de água-doce do que em peixes marinhos. Isso se deve ao fato dos peixes dulcícolas se mostrarem hiperosmóticos em relação ao ambiente, facilitando o influxo de água através da lesão epitelial, aumentando o volume do edema, e conseqüentemente o destacamento epitelial (Machado e Fanta, 2003).

Ainda seguindo o raciocínio de lesões adaptativas, no caso do edema interlamelar observado em brânquias de alevinos de pacu expostos à atrazina, ele pode ser resultado do aumento da pressão hidrostática causada pela redução do retorno venoso ou pelo aumento

da permeabilidade vascular, ambos utilizados como mecanismo de prevenção à entrada do poluente na corrente sanguínea (Kumar *et al.*, 2008).

A análise comparativa indicou a hipertrofia de células do epitélio respiratório como a alteração histopatológica branquial mais significativa em alevinos de pacu tratados com atrazina. Segundo Kumar *et al.*, 2008, essa alteração pode, assim como a hiperplasia desse tipo celular, ser considerada como uma adaptação celular ao estresse.

Paulino (2011) também observou hipertrofia dessas células como uma das alterações mais frequentes em curimatá (*Prochilodus lineatus*), espécie da ictiofauna brasileira, após exposição aguda (48h) e crônica (14 dias). Este autor também comentou a possibilidade desta alteração branquial ser decorrente de processo adaptativo.

Quanto à congestão, este é um processo passivo, resultante de um retorno venoso ineficiente, como comentado acima. Assim, a obstrução venosa isolada pode causar congestão local. A congestão do leito capilar está intimamente relacionada com o desenvolvimento do edema, de forma que congestão e edema estão quase sempre associados (Kumar *et al.*, 2008). Realmente, em brânquias de alevinos de pacu, ambas as alterações ocorreram concomitantemente.

Entre as alterações vasculares observadas em pacu a telangiectasia em lamelas secundárias foi notada mesmo em exemplares expostos às menores concentrações de atrazina. Essa alteração também chamada de aneurisma lamelar resulta da ruptura no sistema de células pilares com perda de sua capacidade de suporte do eixo vascular levando à liberação de grande quantidade de sangue (vasodilatação) que empurra o epitélio respiratório para fora (Alazemi *et al.*, 1996; Garcia-Santos *et al.*, 2007).

No tocante ao conjunto das alterações branquiais usualmente induzidas por xenobióticos, Kumar *et al.* (2008) apresentaram colocações interessantes quanto à questão das adaptações patológicas, que vem de encontro aos comentários de Richmonds e Dutta (1989): estas respostas ao estresse permitem às células modular sua estrutura e função escapando, assim, da lesão, nesse contexto as células podem alterar seu estado funcional em resposta a um estresse de intensidade moderada. Segundo Pawert *et al.* (1998), as alterações branquiais não indicam somente um prejuízo do organismo em questão, mas também sua adaptação ao ambiente poluído.

Dessa maneira, os resultados obtidos nas análises anatomopatológicas (hiperemia cutânea, exsudado na cavidade celomática entre outros) e histopatológicas quando comparados aos dados relatados na literatura, sugerem que o grau de comprometimento vascular observado em pacu pode estar relacionado com ação endotelial sistêmica da atrazina no organismo. Em peixes ainda não existe na literatura registro de ensaios específicos para avaliar este efeito da atrazina ou de outros herbicidas, porém em mamíferos já é referido o comprometimento vascular induzido por atrazina, particularmente pela formulação comercial da mesma (Chan *et al.*, 2007), exatamente a mesma formulação testada em pacu.

Finalmente, se pode inferir que em pacu as alterações branquiais, estabelecidas primeiramente como medida de proteção das funções do órgão, adquiriram um grau mais elevado de comprometimento, verificado pelo aumento da frequência de ocorrência de cada alteração, em função da exposição às maiores concentrações de atrazina, refletindo-se isto em prejuízo funcional às brânquias e até mesmo ao organismo como um todo. Assim, neste trabalho a brânquia se mostrou um biomarcador interessante e adequado para avaliação da intoxicação aguda por atrazina.

5.3.2. Pele

Quanto à estrutura e organização histológica da pele dos alevinos de pacu utilizados nos experimentos, grupos controle e tratados, mostraram-se coincidentes com a descrição feita para esta espécie (Souza *et al.*, 2003; Fujimoto *et al.*, 2008).

Assim como as brânquias, a pele dos peixes é um dos órgãos em contato direto com o ambiente aquático e assim com qualquer composto ou substância presente no mesmo, razão pela qual neste trabalho buscamos verificar a validade de empregar a pele de pacu como biomarcador de toxicidade induzida pelo herbicida atrazina. Porém, de maneira distinta ao que ocorreu com as brânquias, a pele não se mostrou um órgão tão sensível à atrazina mediante análise histopatológica de rotina.

De forma similar ao que ocorreu no presente trabalho, outros autores também não identificaram alterações no tegumento de peixes frente às substâncias testadas. Assim, Velisek *et al.*, 2008, não relataram alteração histopatológica em pele de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) juvenis após exposição aguda à metribuzina, uma triazina assimétrica. Yildirim *et al.*, 2006, em experimento de toxicidade aguda em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) expostos ao deltametrin (inseticida piretróide sintético) também não observaram alterações histopatológicas na pele.

Segundo Shephard, 1994, a pele de peixes é um tecido dinâmico com combinações celulares conhecidas por serem influenciadas por fatores incluindo estresse e condições ambientais. Porém, nas concentrações testadas de atrazina e com as ferramentas metodológicas empregadas a pele de pacu não refletiu alterações diante da presença desse xenobiótico.

6. Conclusões

1. A CL_{50} para atrazina em pacu foi de $28,58 \text{ mgL}^{-1}$, sendo este herbicida considerado levemente tóxico para esta espécie, quando se avalia o parâmetro mortalidade;

2. As análises anatomopatológica e morfológica indicaram que danos significativos foram induzidos em pacu expostos à atrazina nas diferentes concentrações testadas. Tais resultados indicam que em ensaios ecotoxicológicos, é fundamental associar vários biomarcadores para avaliar os efeitos tóxicos de um xenobiótico;

3. Dilatação da região ventral e a dilatação do estômago foram comparativamente as alterações anatomopatológicas mais significativas induzidas por atrazina em pacu;

4. O emprego de análise semi-quantitativa para o registro das alterações morfológicas em brânquias se mostrou fundamental para avaliação do grau de severidade das alterações;

5. A análise comparativa indicou a hipertrofia de células do epitélio respiratório como a alteração histopatológica branquial mais significativa em alevinos de pacu tratados com atrazina;

6. A pele não se mostrou um bom biomarcador na avaliação dos efeitos tóxicos da atrazina em pacu nas condições avaliadas;

7. Em função do conjunto de alterações observadas, a brânquia foi o órgão mais comprometido pelas concentrações de atrazina avaliadas, sendo biomarcador mais indicado quando comparado ao tegumento para estudos de toxicidade da atrazina em pacu;

8. Os efeitos da toxicidade da atrazina em pacu reforçam a importância de estudos desta natureza para embasar medidas ambientais preventivas e reguladoras quanto ao uso desse herbicida.

7. Referências bibliográficas

Aguiar, L.H., Moraes, G., Avilez, I.M., Altran, A. E., Corrêa, C.F.. 2004. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. Environ. Res., 95: 224-230.

Alazemi, B.M., Lewis, J.W., Andrews, E.B.. 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus ptersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. Environ. Technol., 17: 225-238.

Armas, E.D., Monteiro, R.T.R., Amâncio, A.V., Correa, R.M.L., Guercio, M.A.. 2005. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. Química Nova, 28 (6): 975-982.

Armas, E.D., Monteiro, R.T.R., Antunes, P.M., Santos, M.A.P.F., Camargo, P.B., Abakerli, R.B.. 2007. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. Química Nova, 30 (5): 1119-1127.

Armitage, P.D.. 1995. Behaviour and ecology of adults. *In: The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-Biting Midges* (P. D. Armitage, P. S.Cranston & L. C. V. Pinder, ed.), pp. 194-224, London: Chapman & Hall. *Apud*: Buss, D.F., Baptista, D.F., Nessimian, J.L.. 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 19(2): 465-473.

Au, D.W.T.. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Marine Pollution Bulletin, 48: 817-834.

Barassa, B., Adriano, E.A., Cordeiro, N.S., Arana, S., Ceccarelli, P.S.. 2012. Morphology and host-parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guaçu River, Brazil. *Parasitol. Res.*, 110(2): 887-94.

Biagiatti-Risbourg, S., Bastide, J.. 1995. Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): an ultrastructural study. *Aquat. Toxicol.*, 31: 217-229.

Birnbaum, L.S., Fenton, S.E.. 2003. Cancer and Developmental Exposure to Endocrine Disruptors. *Environ. Health Perspect.*, 111 (4): 389-394.

Bishop, C.A., Struger, J., Shirose, L.J., Dunn, L., Campbell, G.D.. 2000. Contamination and wildlife communities in stormwater detention ponds in Guelph and the Greater Toronto Area, Ontario, 1997 and 1998. Part II - Contamination and biological effects of contamination. *Water Qual. Res. J. Can.*, 35: 437-474.

Botelho, R.G., Santos, J.B., Oliveira, T.A., Braga, R.R., Byrro, E.C.M.. 2009. Toxicidade aguda de herbicidas a tilápia (*Oreochromis niloticus*). *Planta Daninha*. 27 (3): 621-626.

Botello, A.V., Ruede-Quintana, L., Diaz-González, G., Toledo, A.. 2000. Persistent organochlorine pesticides (POPs) in coastal lagoons of the subtropical Mexican Pacific. *B. Environ. Contam.Tox.*, 64: 390-397.

Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., Meier, W.. 2000. Nonylphenol Affects the Granulation Pattern of Epidermal Mucous Cells in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, 34-40.

Buss, D.F., Baptista, D.F., Nessimian, J.L.. 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(2): 465-473.

Caldas, E.D., Coelho, R., Souza, L.C.K.R., Siba, S.C.. 1999. Organochlorine Pesticides in Water, Sediment, and Fish of Paranoá Lake of Brasília, Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62:199-206.

Carvalho, F.P., Villeneuve, J.P., Cattini, C., Tolosa, I., Montenegro-Guillen, S., Lacayo, M., Cruz, A.. 2002. Ecological risk assessment of pesticide residues in coastal lagoons of Nicarágua. *J. Environ. Monitor.*, 4: 778-787.

Castilho, J.A.A., Fenzl, N., Guillen, S.M., Nascimento, F.S.. 2000. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in the Atoya river basin, Chinandega, Nicarágua. *Environ. Pollut.*, 110(3): 523-533.

Castillo, L.E., Ruepert, C., Solis, E.. 2000. Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic Zone of Costa Rica. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1942-1950.

Chan, Y.C., Chang, S.C., Hsuan, S.L., Chien, M.S., Lee, W.C., Kang, J.J., Wang, S.C., Liao, J.W.. 2007. Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. *Toxicology in Vitro*, 21 (4): 595-603.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na Resolução nº 357 de 17/03/2005.

Cooper, R.L., Stoker, T.E., Tyrey, L., Goldman, J.M., McElroy, W.K.. 2000. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary ovarian function. *Toxicol. Sci.*, 53: 297-307.

Cruz, C.. 2005. Aspectos toxicológicos de paration metílico e de extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e eficácia no controle de monogenea Dactylogyridae. 2005. Tese (Doutorado em Aquicultura)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Daniels, W.M., House, W.A., Rae, J.E., Parker, A.. 2000. The distribution of micro-organic contaminants in river bed-sediment cores. *Sci. Total Environ.*, 253 (1-3): 81-92.

Das, P.C., McElroy, W.K., Cooper, R.L.. 2000. Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro. *Toxicol. Sci.*, 56: 324-331.

De Pauw, N., Vanhooren, G.. 1983. Method for biological quality assessment of watercourses in Belgium. *Hydrobiologia*, 100: 153-168.

Devos, S., De Bosscher, K., Staels, B., Bauer, E., Roels, F., Berghe, W., Haegeman, G., Hooghe, R., Hooghe-Peters, E.L.. 2003. Inhibition of cytokine production by the herbicide atrazine. Search for nuclear receptor targets. *Biochem. Pharmacol.*, 65: 303-308.

Dezfuli, B.S, Simoni, E., Giari, L., Manera, M.. 2006. Effects of experimental terbuthylazine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). *Chemosphere*, 64: 1684-1694.

Dores, E.F.G.D., De-Lamonica-Freira, E.M.. 2001. Aquatic environment contamination by pesticides. Case study: Water used for human consumption in Primavera do Leste, Mato Grosso - Preliminary analyses. *Quim. Nova*, 24 (1): 27-36.

Dubus, I.G., Hollis, J.M., Brown, C.D.. 2000. Pesticides in rainfall in Europe. *Pollut.*, 110 (2): 331-344.

Eldridge, J.C., Wetzel, L.T., Stevens, J.T., Simpkins, J.W.. 1999. The mammary tumor response in triazine-treated female rats: a threshold-mediated interaction with strain and species-specific reproductive senescence. *Steroids*, 64: 672-678.

Elia, A. C., Waller, W. T., Norton, S. J.. 2002. Biochemical Responses of Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to Atrazine Induced Oxidative Stress. B. Environ. Contam. Tox., 68: 809-816.

“Extension Toxicology Network” (EXTOXNET). 1996. Pesticide Information Profiles: atrazine. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/atrazine.htm>> Acesso em: 20 jan. 2012.

Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Ken- Morohashi, I., Hayes, T. B., Takayanagi, R., Nawata, H.. 2007. Atrazine-Induced Aromatase Expression Is SF-1 Dependent: Implications for Endocrine Disruption in Wildlife and Reproductive Cancers in Humans. Environ. Health Perspect., 115 (5): 720-727.

Fanta, E., Rios, F.S., Romão, S., Vianna, A.C.C., Freiburger, S.. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotox. Environ. Safe., 54: 119-130.

Ferguson, H.W.. **Systemic pathology of fish: a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleostes**. 3.edi. Iowa: University Press, 1995. 263 p.

Fernandes, M.N, Perna-Martins, S.A. 2001. Epithelial Gill cells in the armored catfish, *Hypostomus* CF. *plecostomus* (Loricariidae). Rev. Brasil. Biol. 61: 69-78.

Fujimoto, R.Y., Cruz, C., Moraes, F.R.. 2008. Análise de efluente e histologia da pele, fígado e rim de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente. B. Inst. Pesca, São Paulo, 34(1): 117-124.

García-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Fontainhas-Fernandes, A.. 2007. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 59 (2): 376-381.

Giari, L., Dezfuli, B.S., Lanzoni, M., Castaldelli, G.. 2012. The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 77 (1): 18-27.

Goolsby, D.A., Thurman, E.M., Pomes, M.L., Meyer, M.T., Battaglin, W.A.. 1997. Herbicides and their metabolites in rainfall: Origin, transport, and deposition patterns across the midwestern and northeastern United States, 1990-1991. *Environ. Sci. Technol.*, 31 (5): 1325-1333.

Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G.. 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.*, 26: 483-495.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol.* 7 (11): 714-719.

Hayes, T.B., Anderson, L.L., Beasley, V.R., Solla, S.R. de, Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, V.S., Luque, E.H., McCoy, K.A., Muñoz-de-Toro, M., Oka, T., Oliveira, C.A., Orton, F., Ruby, S., Suzawa, M., Tavera-Mendoza, L.E., Trudeau, V.L.. 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. Review Article. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127 (1-2): 64-73.

Jablonowski, N.D., Schäffer, A., Burauel, P.. 2011. *Commentary*: Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 18: 328-331.

Kaplan. E.L.; Meier, P. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Statist. Assoc.* 53: 457-481.

Kilemade, M., Lyons-Alcantara, M., Rose, T., Fitzgerald, R., Mothersill, C.. 2002. Rainbow trout primary epidermal cell proliferation as an indicator of aquatic toxicity: an in vitro/in vivo exposure comparison. *Aquat. Toxicol.*, 60: 43-59.

Koukouzika, N., Dimitriadis, V.K.. 2005. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: "Lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress". *Ecotoxicology*, 14 (4): 449-463.

Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Azilheiro, D., Martin, D., Lorenson, M., Materninghe, A., Silva, L.B.. 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciência Rural*, 38(4): 1050-1055.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Mitchell, R.N.. **Robbins, patologia básica**. 8.ed.. Trad. by: Adriana Pittella Sudré, *et al.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 1028p.

Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A.A., Wantzen, M., Silva, C.J., Zech, W.. 2002. Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. *J. Environ. Qual.*, 31: 1636-1648.

Larson, D.L., McDonald, S., Fivizzani, A.J., Newton, W.E., Hamilton, S.J.. 1998. Effects of the herbicide atrazine on *Ambystoma tigrinum* metamorphosis: duration, larval growth, and hormonal response. *Physiol. Zool.*, 71: 671-679.

Lima, F.B., Braccini, M.C., Díaz, A.O., Pinheiro Junior, C., Guimarães, A.C.G.. 2009. Morfologia das brânquias de *Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) (Characiformes, Curimatidae). *Revista Biotemas*, 22 (1): 87-92.

Livingstone, D.R.. 1993. Biotechnology and pollution monitoring - use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 57 (3): 195-211.

Lom, J., Dyková, I.. 2006. *Myxozoan genera*: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 53: 1-36.

Lopes, R.B., Paraíba, L.C., Ceccarelli, P.S., Tornisielo, V.L.. 2006. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Chemosphere*, 64: 56-62.

Machado, M.R.. 1999. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina, 1 (1): 63-76.

Machado, M.R., Fanta, E.. 2003. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43 (3): 361-372.

Magalhães, D.P., Ferrão Filho, A.S.. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, 12 (3): 355-381.

Mallat, J.. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicant and other irritants: A statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 630-648.

Manske, M.K., Beltz, L.A., Dhanwada, K.R.. 2004. Low-level atrazine exposure decreases cell proliferation in human fibroblasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 438-444.

Matsushita, M., DeSouza, N.E., 1994. Organochlorine Pesticides Residues In Some Commercial Fish Species From Floodplain of High Parana River, Porto-Rico Region, Paraná State, Brazil. *Arq. Biol. Technol.*, 37: 637-644.

Matthews, R.A., Buikema, A.L., Cairns Jr., J.. 1982. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships, and indices. *Water Research*, 16: 129-139.

Metcalf, J.L.. 1989. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrates communities: history and present status in Europe. *Environ. Poll.*, 60: 101-139.

Neskovic, N.K., Elezovic, I., Karan, V., Poleksic, V., Budimir, M.. 1993. Acute and sub-acute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotox. Environ. Saf.*, 25: 173-182.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Guidance Document For Aquatic Effects Assessment. 1995. General Distribution OCDE/GD (95) 18, Paris.

Okamura, H., Aoyama, I., Ono, Y., Nishida, T.. 2003. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Mar. Pollut. Bull.*, 47 (1-6): 59-67.

Oliveira-Brett, A.M., Silva, L.A.. 2002. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazine derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373: 717-723.

Oropesa-Jiménez, A.L., García-Camero, J.P., Gómez-Gordo, L., Roncero-Cordero, V., Soler-Rodríguez, F.. 2005. Gill modifications in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after subchronic exposure to simazine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 74: 785-792.

Oulmi, Y., Negele, R.D., Braunbeck, T.. 1995. Segment specificity of the cytological response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) renal tubules following prolonged exposure to sublethal concentrations of atrazine. *Ecotox. Environ. Saf.*, 32: 39-50.

Paiva, P.P.. 2010. Avaliação da intoxicação aguda induzida por atrazina em espécie da ictiofauna do Pantanal Mato-grossense, pacu (*Piaractus mesopotamicus*), com o emprego de biomarcadores morfológicos. 83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural. Área de Concentração: Histologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2010.

Pankhurst, N.W.. 1982. Changes in the skin-scale complex with sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). J. Fish Biol., 21: 549-561.

Paulino, M.G.. 2011. Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, Prochilodontidae). 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 2011.

Pawert, M., Müller, E., Triebkorn, R.. 1998. Ultrastructural changes in fish gills as biomarkers to assess small stream pollution. Tissue & Cell, 30 (6): 617-626.

Peakall, D.B.. 1994. The role of biomarkers in environmental assesement. (1). Introduction. Ecotoxicology, 3: 157-160.

Pereira, W.E., Hostettler, F.D.. 1993. Nonpoint source contamination of the Mississippi River and its tributaries by herbicides. Environ. Sci. Technol., 27: 1542-1552.

Phyu, Y.L., Warne, M.S.T., Lim, R.P.. 2006. Toxicity and bioavailability of atrazine and molinate to the freshwater fish (*Melanotenia fluviatilis*) under laboratory and simulated field conditions. Sci. Total Environ., 356: 86-99.

Piancini, L.D.S.. 2011. Utilização de biomarcadores genéticos na avaliação aguda do efeito mutagênico dos contaminantes atrazina e cloreto de cobre em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). 126p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Genética). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2011.

Pratt, J.M., Coler, R.A.. 1976. A procedure for the routine biological evaluation of urban runoff in small rivers. *Water Research*, 10: 1019-1025.

Primel, E.D., Zanella, R., Kurz, M.H.S., Gonçalves, F.F., Machado, S.O., Marchezan, E.. 2005. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. *Quim. Nova*, 28: 605-609.

Racke, K.D., Skidmore, M.W., Hamilton, D.J., Unsworth, J.B., Miyamoto, J., Cohen, S.Z.. 1997. Pesticide fate in tropical soils. *Pure Appl. Chem.*, 69: 1349-1371.

Rajan, M.T., Banerjee, T.K.. 1991. Histopathological changes induced by acute toxicity of mercury chloride on the epidermis of freshwater catfish – *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 22: 139-152. *Apud*: Dourado, D.M.. Estudo histológico, histoquímico, morfométrico e ultra-estrutural da pele de duas espécies de peixes teleósteos. 1999 (Tese de Doutorado).

Ramírez-Duarte, W.F., Rondón-Barragán, I.S., Eslava-Mocha, P.R.. 2008. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup[®] herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28(11): 547-554.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Rodrigues, E.L., Eiras, A.C., Veiga, M.L., Pacheco, F.J.. 1997. Alterações hematológicas em curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Trichlorfon). *Bol. Inst. Pesca*, 24: 187-196.

Reis, A.B., Sant'Ana, D.M.G., Azevedo, J.F., Merlini, L.S., Araújo, E.J.A.. 2009. Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. *Pesq. Vet. Bras.*, 29 (4): 303-311.

Resck, D.V.. 1998. Agricultural intensification systems and their impact on soil and water quality in the Cerrados of Brazil. 288-300.

Richmonds, C., Dutta, H.M.. 1989. Histopathological changes induced by malathion in the gills of Bluegill *Lepomis macrochirus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 123-130.

Rohr, J., McCoy, K.A.. 2010. A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environ. Health Perspect.*, 118 (1): 20-32.

Rudnicki, C.A.M.. 2004. Análise qualitativa e quantitativa das histopatologias causadas pelo organofosforado Azodrin® sobre o tecido branquial do peixe de água doce *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) após exposição subletal. 80p. Tese (Mestrado em Biologia celular e molecular). Faculdade de Biologia - Universidade Federal do Paraná, 2004.

Rudnicki, C.A.M., Melo, G.C., Donatti, L., Kawall, H.G., Fanta, E.. 2009. Gills of juvenile fish *Piaractus mesopotamicus* as histological biomarkers for experimental sub-lethal contamination with the organophosphorus Azodrin® 400. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52 (6): 1431-1441.

Sabóia-Morais, S.M.T.. 1997. Análise histoquímica, citoquímica e ultra-estrutural de células mucossecretoras do epitélio de revestimento branquial do peixe eurialino *Poecilia vivipara* (Pisces- Poeciliidae) submetido a variações de salinidade. 82p. Dissertação (Doutorado em Ciências – Biologia Celular e Estrutural). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 1997.

Saglio, P., Trijasse, S.. 1998. Behavioral Responses to Atrazine and Diuron in Goldfish. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 35: 484-491.

Salazar, M.Y.D., Tabche, L.M., Garcia, C.M.. 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez dam in Mexico. Ecotoxicol. Environ. Saf., 38 (1): 53-62.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W. Tribskorn, R.. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov., 6 (1): 75-86.

Severi, W., Rantin, F.T., Fernandes, M.N.. 2000. Structural and Morphological features of *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) Gills. Rev. Brasil. Biol., 60 (3): 493-501.

Shephard, K.L.. 1994. Functions for fish mucus. Rev. Fish Biol. Fish, 4: 401-429.

Silva, E., Batista, S., Viana, P., Antunes, P, Serodio, L., Cardoso, A.T., Cerejeira, M.J.. 2006. Pesticides and nitrates in groundwater from oriziculture areas of the 'Baixo Sado' region (Portugal). Int. J. Environ. Anal. Chem., 86: 955-972.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). 2011. Agroquímicos: vendas sobem no acumulado do ano. Disponível em: http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2209 Acesso em: 25/01/2012.

Solomon, K.R., Carr, J.A., Du Preez, L.H., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van Der Kraak, G.J.. 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: A critical review. Crit. Ver. Toxicol. 38: 721-772.

Souza, M.L.R., Ganeco, L.N., Nakaghi, L.S.O., Faria, R.H.S., Wagner, P.M., Povh, J.A., Ferreira, I.C.. 2003. Histologia da pele do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e testes de resistência do couro. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 25 (1): 37-44.

Spanò, L., Tyler, C.R., van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thomé, J.P., Kestemont, P.. 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.*, 66: 369-379.

Steinberg, C.E.W., Lorenz, R., Spieser, O.H.. 1995. Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Water Res.*, 29 (3): 981-985.

Stoker, T.E., Robinette, C.L., Cooper, R.L.. 1999. Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. *Toxicol. Sci.*, 52: 68-79.

Stuchal, L.D., Kleinow, K.M., Stegeman, J.J., James, M.O.. 2006. Demethylation of the pesticide methoxychlor in liver and intestine from untreated, methoxychlor-treated, and 3-methylcholanthrene-treated channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Evidence for roles of CYP1 and CYP3a family isozymes. *Drug Metab. Dispos.*, 34 (6): 932-938.

Tagliaferro, A.F.. 2009. Avaliação da toxicidade aguda do inseticida endossulfan em alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), com o emprego de biomarcadores histológicos. 147p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural. Área de Concentração: Histologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2009.

Thurman, E.M., Bastian, K.C., Mollhagen, T.. 2000. Occurrence of cotton herbicides and insecticides in playa lakes of High Plains of West Texas. *Sci. Total Environ.*, 248: 189-200.

Tillitt, D.E., Papoulias, D.M., Whyte, J.J., Richter, C.A.. 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Phimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 99 (2): 149-159.

US-EPA (United States Environmental Protection Agency). 2002. Short-term methods for estimating the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Environ. Protection Agency. Office of water, Washington, DC.

Veiga, M.L., Rodrigues, E.L., Pacheco, F.J., Ranzani-Paiva, M.J.T.. 2002. Histopathologic Changes in the Kidney Tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) Induced by Sublethal Concentration of Trichlorfon Exposure. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 45: 171-175.

Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Novotny, L., Blahova, J., Sudova, E., Maly, V.. 2008. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinari Medicina*, 53 (6): 324-332.

Ventura, B.C.. 2004. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro/SP, 2004.

Versonnen, B.J., Goemans, G., Belpaire, C., Janssen, C.R.. 2004a. Vitellogenin content in European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. *Environ. Pollut.*, 128 (3): 363-371.

Versonnen, B.J., Roose, P., Monteyne, E.M., Janssen, C.R.. 2004b. Estrogenic and toxic effects of methoxychlor on zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (9): 2194-2201.

Versommen, B.J., Janssen, C.R.. 2004. Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol., 19 (3): 198-206.

Vigliano, F.A., Aleman, N., Quiroga, M.I., Nieto, J.M. 2006. Ultrastructural characterization of gills in juveniles of the Argentinian Silverside *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). Anat. Histol. Embryol. 35: 76-83.

Villa, S., Negrelli, C., Finizio, A., Flora, O., Vighi, M.. 2006. Organochlorine compounds in ice melt water from Italian Alpine rivers. Ecotoxicol. Environ. Saf., 63: 84-90.

Wan, M.T., Buday, C., Schroeder, G., Kuo, J., Pasternak, J.. 2006. Toxicity to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus tshawytscha* and *Rana catesbeiana* of atrazine, metolachlor, simazine and their formulated products. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 76: 52-58.

Washington, H.G.. 1984. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. Water Research, 18: 653-694.

Wilkins, N.P., Jancsar, S.. 1979. Temporal variations in the skin of Atlantic salmon *Salmo salar* L. J. Fish Biol. 15, 299-307. *Apud*: Shúilleabháin, S.N., Mothersill, C., Sheehan, D., O'Brien, N.M., O' Halloran, J., van Pelt, F.N.A.M., Kilemade, M., Davoren, D.. 2006. Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride. Ecotoxicol. Environ. Saf., 65: 332-341.

Yang, L., Zha, J., Li, W., Li, Z., Wang, Z.. 2010. Atrazine affects kidney and adrenal hormones (Ahs) related genes expressions of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). Aquat. Toxicol. 97: 204-211.

Yildirim, M.Z., Benli, A.Ç.K., Selvi, M., Özkul, A., Erkoc, F., Koçak, O.. 2006. Acute Toxicity, Behavioral Changes, and Histopathological Effects of Deltamethrin on Tissues (Gills, Liver, Brain, Spleen, Kidney, Muscle, Skin) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Fingerlings. *Environ. Toxicol.*, 21: 614-620.

Zaccone, G., Lo Cascio, P., Fasulo, S., Licata, A.. 1985. The effect of an anionic detergent on complex carbohydrates and enzyme activities in the epidermis of the catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Histochemistry*, 17: 453-466. *Apud*: Shúilleabháin, S.N., Mothersill, C., Sheehan, D., O'Brien, N.M., O' Halloran, J., van Pelt, F.N.A.M., Kilemade, M., Davoren, D.. 2006. Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 65: 332-341.

ANEXO I

Todo o manejo dos peixes foi realizado de acordo com as normas da Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, tendo sido o presente projeto submetido e aprovado por essa Comissão: (Protocolo nº. 1196-1).

	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	 CEEA-IB-UNICAMP
---	--	--

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

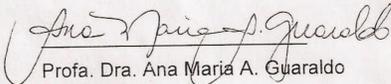
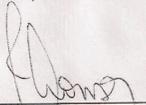
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1196-1, sobre "Avaliação da toxicidade dos pesticidas: endosulfan e atrazina em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), espécie da ictiofauna da região do Pantanal Mato-Grossense", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Sarah Arana, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 1196-1, entitled "Acute and chronic toxicity intoxication of endosulfan and atrazine in pacu (*Piaractus mesopotamicus*), fish from Pantanal Mato-Grossense/Brazil", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 27, 2007.

Campinas, 27 de fevereiro de 2007.

 Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 Fátima Alonso Secretária Executiva
---	---

<p>CEEA/IB – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil</p>	<p>Telefone: (19) 3521-6359 Telefax: (19) 3521-6356 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm</p>
--	--