

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

VANILVA PEREIRA DE OLIVEIRA

Estudo histopatológico em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a ensaio
toxicológico com ibuprofeno

Toledo
2017

VANILVA PEREIRA DE OLIVEIRA

Estudo histopatológico em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a ensaio
toxicológico com ibuprofeno

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Manejo e Conservação de Recursos Pesqueiros de Águas Interiores.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Baumgartner

Co-orientador: Prof^ª. Dra. Sabrina Grassioli

Toledo

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

VANILVA PEREIRA DE OLIVEIRA

Estudo histopatológico em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a ensaio toxicológico com ibuprofeno

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Toledo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, e analisado pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Gilmar Baumgartner
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dra. Geuza Cantanhêde da Silva
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em: 03/03/2017

Local de defesa: Auditório da Unioeste/*Campus* de Toledo.

DEDICATÓRIA

*Dedico a Deus, por me fortalecer na
caminhada e sustentar-me nas minhas
fraquezas...*

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Emerson pelo imenso apoio, amor e paciência, sempre do meu lado, ajudando-me na realização de meus planos e sonhos.

Ao meu amado filho Lorenzo, por todo amor e companheirismo e que mesmo tão pequeno compreendeu os momentos em que deixei de brincar com ele.

A minha irmã Vanílce pela compreensão, auxílio e socorro nos momentos que precisei.

A todos os meus irmãos e familiares por todo o carinho e afeto em todos os momentos de minha vida e principalmente por acreditarem em mim.

Aos meus pais por todas as palavras de conforto nos momentos de angústia e principalmente por acreditarem nos meus sonhos e ideais.

Agradeço ao meu orientador Dr. Gilmar Baumgartner, por toda dedicação e apoio e conhecimentos transmitidos.

A minha Co-orientadora Dra. Sabrina Grassiollí, por todo direcionamento, empenho e disposição.

Ao Prof. Dr. João Paulo Amorim, pelos conhecimentos transmitidos durante este trabalho e paciência comigo.

Ao InPaa, que disponibilizou o espaço para que fosse possível a realização desse experimento.

Ao Laboratório de Fisiologia Humana e Biologia celular (Campus Cascavel) e todos os técnicos pela paciência e auxílio nesse processo Celeste, Barbara e em especial a Vanessa por toda dedicação e auxílio.

Aos colegas Poliana e Rafael, pela contribuição inicial nos experimentos.

Aos colegas de mestrado Maysa, Bruna, Angélica, Gislaine e Afiana, por todo companheirismo e contribuição em todos os momentos de dúvidas.

Ao Grupo de Pesquisa em Recursos Pesqueiros e Limnologia (GERPEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Toledo.

Estudo histopatológico em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a ensaio toxicológico com ibuprofeno

RESUMO

O ensaio toxicológico foi realizado com o objetivo de determinar o potencial tóxico do fármaco ibuprofeno através de alterações comportamentais e alterações histopatológicas em brânquias e fígados de juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de Ibuprofeno (0,0; 0,5; 5,0 e 50,0 mg/L). As quais foram determinadas a partir de ensaios agudos com uma CL50 de 5,0mg/L. Para cada concentração foram feitas quatro réplicas, com quatro exemplares, cada. O experimento teve duração total de 120 horas. Na preparação do material foi utilizada a técnica histológica de rotina para inclusão em parafina, e para as análises as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. Foram evidenciadas alterações nos tecidos analisados, como: Fusão incompleta de lamelas e aneurisma, entre outras, para as brânquias e vacuolização citoplasmática e necrose focal, entre outras, para os fígados, as quais foram classificadas em estágios I, II e III, quanto a severidade das lesões, determinado o Índice de Alterações Histológicas e os Valores Médios das Alterações. O fármaco apresentou potencial tóxico para esta espécie, mesmo em concentrações baixas, sendo evidenciados danos que vão de moderados a severos nos fígados e brânquias dos peixes analisados.

Palavras-chave: Alterações histopatológicas; Fármaco; Potencial tóxico e *Rhamdia quelen*.

Histopathological study in juveniles of *Rhamdia quelen* submitted to toxicological test with ibuprofen

ABSTRACT

The toxicological test was performed to determine the toxic potential of the drug ibuprofen through histopathological eyepieces in gills and livers of *Rhamdia quelen* juveniles submitted to different concentrations of Ibuprofen (0,0; 0,5; 5,0 e 50,0 mg/L). These were determined from acute tests with an CL50 of 5,0mg/L. For each of them, four replicates, with four specimens each. The experiment lasted 120 hours. In preparing the material for the routine histological technique for inclusion in paraffin, and as analyzes as slides were stained with Hematoxylin and Eosin. Our analogues were tested, such as: Incomplete lamellae and aneurysm fusion, among others, for gills and vacuolization, cytoplasmic and focal necrosis, among others, for livers, which were classified in stages I, II and III for Severity of injuries, determined the Index of Historical Changes and Average Values of Changes. The drug presented toxic potential for this species, even at low concentrations, and damages ranging from moderate to severe in the livers and gills of the fish analyzed were observed.

Keywords: Histopathological changes; Drug; Toxic potential and *Rhamdia quelen*.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* Disponível em:<[http://www.springer.com/environment/environmental toxicology/journal/244](http://www.springer.com/environment/environmental%20toxicology/journal/244)>*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Local.....	13
2.2. Animais.....	13
2.3. Ensaio toxicológicos.....	14
2.4. Processamento histológico.....	14
2.5. Análises de Dados	14
2.6. Análise Estatística	15
3. RESULTADOS.....	15
3.1. Parâmetros Físicos e químicos da água.....	16
3.2. Alterações comportamentais e Lesões cutâneas	16
3.3. Brânquias	16
3.4. Fígado	21
4. DISCUSSÃO	25
4.1. Brânquias.....	25
4.2. Fígado	26
6. CONCLUSÃO	29
7. REFERÊNCIAS	30

Lista de Figuras

Figura 1. Ensaio toxicológico com juvenis de <i>Rhamdia quelen</i>	13
Figura 2. Alterações comportamentais e Lesões cutâneas.....	16
Figura 3. Fotomicrografia de Brânquias submetidas às diferentes concentrações de ibuprofeno.....	18
Figura 4. Fotomicrografia de Brânquias submetidas às diferentes concentrações de ibuprofeno.....	19
Figura 5. Índice de alterações histológicas (IAH) e Valores médios \pm desvio padrão de alterações (VMA).....	20
Figura 6. Fotomicrografia de Fígados submetidos às diferentes concentrações de ibuprofeno.....	22
Figura 7. Fotomicrografia de Fígados submetidos às diferentes concentrações de ibuprofeno.....	23
Figura 8. Índice de alterações histológicas (IAH) e Valores médios \pm desvio padrão de alterações (VMA)	24

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média e desvio padrão dos parâmetros físicos e químicos da água nos diferentes tratamentos durante o Experimento.....	16
Tabela 2. Histopatologia em Brânquias de <i>Rhamdia quelen</i> , submetidos às diferentes concentrações de Ibuprofeno.....	17
Tabela 3. Histopatologia em Fígado de <i>Rhamdia quelen</i> , submetidos às diferentes concentrações de Ibuprofeno.....	21

1. INTRODUÇÃO

A água é vista como um elemento essencial e insubstituível para o desenvolvimento dos organismos e na maioria das vezes tem sua qualidade comprometida de diversas maneiras, dentre estas se destacam, despejo de efluentes industriais, descarte de fármacos em lixo comum, drenagem de fertilizantes, agrotóxicos, derrames acidentais ou não de metais pesados, compostos orgânicos e inorgânicos, entre outros (RASHED, 2001; GALLI & ABE, 2010). Os potenciais riscos associados à liberação de poluentes no ambiente principalmente de fármacos vêm se tornando alvo de preocupação crescente. Tal preocupação deve-se à ampla detecção desses compostos em amostras no ambiente natural (DAUGHTON & JONES-LEPP, 2001). Estes fármacos foram desenvolvidos para controlar doenças, aumentar a produção de alimentos e a expectativa de vida das pessoas, contudo, a crescente presença de tais contaminantes na água tornou-se uma eminente ameaça à saúde humana e ambiental, principalmente ao gerar riscos à biodiversidade dos ecossistemas aquáticos (TUNDISI, 2005).

O ibuprofeno, um fármaco comumente utilizado, é indicado para febres, dores leves e moderadas, e deste modo tem efeito antitérmico, analgésico e anti-inflamatório. O Ácido isobutil-propano-fenólico ($C_{13}H_{18}O_2$) atua inibindo a ação da enzima ciclooxigenase, que catalisa a transformação de ácidos graxos em prostaglandinas. Este fármaco tem venda livre, pode ser adquirido sem receita médica, e consta na relação nacional de medicamentos do componente básico da assistência farmacêutica, que contempla os medicamentos e insumos disponibilizados no Sistema Único de Saúde - SUS (RENAME, 2010).

O ibuprofeno apresenta boa absorção oral, com aproximadamente 80% da dose absorvida no trato gastrointestinal. O início da ação em humanos ocorre em cerca de 15 a 30 minutos, com meia-vida de eliminação de 1,8 a 2,0 horas. A biotransformação é hepática e a excreção praticamente se completa em 24 horas após a última dose, sendo menos de 1% excretado na forma inalterada (IBUPROFENO, 2011).

Tendo em vista o elevado consumo deste medicamento e sua eliminação para o meio aquático, sua presença foi detectada em corpos hídricos onde as concentrações registradas em águas de superfície no Reino Unido foram de $5,0\mu\text{g/L}$ (ASHTON *et al.*, 2004). Já no Brasil foram detectadas concentrações que variam de $\mu\text{m/L}$ a nm/L de ibuprofeno, tanto em águas superficiais, quanto em estações de tratamento de esgoto (BILA & DEZOTTI, 2003).

De acordo com o contexto acima, se enquadra a toxicologia aquática ou ecotoxicologia, que é a ciência que estuda os efeitos dos compostos químicos sobre os organismos aquáticos (RAND *et al.*, 1995), e pode ser uma ferramenta importante para a avaliação dos impactos de poluentes sobre a biota aquática (LOMBARDI, 2004). Outra ferramenta importante e

comumente utilizada para avaliar o potencial tóxico de substâncias que estão presentes na água, são os exames histopatológicos, reconhecidos cada vez mais como um instrumento valioso para a avaliação de impacto de poluentes ambientais em peixes (TEH *et al.*, 1997). As brânquias são muito utilizadas por serem os primeiros órgãos em contato com os poluentes nas águas, representando um bom órgão para investigação da toxicidade aquática (BARRETO, 2007). Outro órgão comumente utilizado, de acordo com Hinton e Lauren (1990), é o fígado pela sua importância na biotransformação de xenobiontes (MADUENHO & MARTINEZ, 2008).

Os peixes têm sido amplamente utilizados como modelos experimentais, tanto em avaliações de saúde dos ecossistemas aquáticos como em estudos toxicológicos (FIGUEIREDO-FERNANDES *et al.*, 2007; FONTANETTI *et al.*, 2012). A espécie de peixe em foco, o *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) é uma espécie amplamente distribuída na América do Sul e Central, ao leste dos Andes e entre a Venezuela e o Norte da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). O cultivo desta espécie na região sul do Brasil tem aumentado em virtude do seu crescimento acelerado inclusive nos meses mais frios, o que caracteriza uma boa resistência ao manejo (CARNEIRO, 2002 & FRACALOSSO *et al.*, 2002). É um bagre bentônico, especulador do substrato, que se alimenta de insetos terrestres e aquáticos, crustáceos, restos vegetais, além de peixes como os lambaris e os guarús e possui hábitos noturnos (CASATTI *et al.*, 2001, BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO 2004, CASATTI & CASTRO 2006, OYAKAWA *et al.*, 2006).

Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo, determinar o potencial tóxico do ibuprofeno e avaliar as alterações histológicas em brânquias e fígados de juvenis da espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá) submetidos a ensaios toxicológicos com diferentes concentrações de Ibuprofeno.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local

Os ensaios toxicológicos foram realizados no InPAA - Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

2.2. Animais

Os juvenis de jundiá foram adquiridos em uma piscicultura comercial e transportados até o InPAA, em sacos plásticos com aeração, e após um período de uma hora, foram estocados em tanques para aclimatação por 20 dias, todos com aeradores, estes peixes foram alimentados uma vez por dia com ração comercial (40% proteína), o comprimento médio dos peixes foi de $12,50 \pm 1,42$ cm e peso médio de $17,80 \pm 5,32$ g. Durante este período foram monitorados os valores de temperatura, pH e oxigênio.

2.3. Ensaio toxicológico

Os ensaios toxicológicos foram realizados somente para a fase juvenil, sendo que foi utilizada concentração de ibuprofeno de 5,0mg/L, CL_{50} obtida como resultado em ensaios agudos realizados anteriormente a este experimento, e sendo adotada como concentração de referência, as outras duas concentrações foram de 0,5 e 50,0 mg/L (concentrações 10 vezes menor e maior que a de referência), e o grupo controle, conforme GHIELFI (2014). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro concentrações (0,0; 0,5; 5,0 e 50,0mg/L de Ibuprofeno) e quatro repetições, sendo que cada aquário continha 4 exemplares, e cada peixe foi considerado uma unidade experimental. Os aquários (Figura 1) tinham volume de 08 litros o que deu uma densidade de 0,5peixe/L.



Figura 1. Ensaio toxicológico com juvenis de *Rhamdia quelen*.

No início os exemplares foram medidos e pesados e tiveram sua alimentação suspensa durante todo experimento, o que favoreceu a absorção do fármaco pelos organismos. Durante esse período os aquários receberam aeração artificial.

Durante o Ensaio toxicológico, foram realizadas observações, quanto ao comportamento dos indivíduos e presença de lesões cutâneas. Os parâmetros físicos e químicos da água foram verificados no início, meio e final do experimento.

Ao final do experimento, os exemplares que restaram foram analisados e anestesiados com benzocaína (100mg/L), e depois realizada a biometria (medidos e pesados) com auxílio de ictiômetro e balança digital.

O experimento teve duração de 120 horas, sendo feita a correção das concentrações a cada 24h, quando ocorreu a substituição do volume total de cada aquário, com as mesmas concentrações iniciais (COSTA, 2016).

2.4. Processamento histológico

Os peixes foram submetidos a uma incisão ventral do poro urogenital até o opérculo, para facilitar a retirada das vísceras. Para as brânquias, foram separados o segundo arco branquial direito e para os fígados, foram retirados fragmentos dos órgãos, ambos os tecidos foram fixados em formol 4% por 24 horas e posteriormente estocados em álcool 70% por 30 dias (ROCHA *et. al.*, 2010). Após a fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, desde 70% até etanol absoluto, diafanizadas em xilol, infiltradas e incluídas em parafina (DA JANSEN, 2014). Em seguida, obtiveram-se cortes transversais de 6µm de espessura com o auxílio de um micrótomo Olympus cut 4055, sendo, os mesmos, corados com hematoxilina-eosina (HE). Para a leitura das lâminas foi utilizado um microscópio e as fotografias foram tiradas em fotomicroscópio Olympus DP71.

2.5. Análises de Dados

As alterações histológicas foram quantificadas nas brânquias e fígados, onde foram determinados 5 cortes para cada animal, sendo analisados 5 campos aleatórios para cada corte. A incidência e distribuição das lesões foram avaliadas de acordo com os seguintes critérios: 0=ausência de lesões (0 - 10%); 0+=raramente presente (11% a 25%); +=Presente (26% a 50%); ++=Frequente (51% a 75%) e +++=Lesões altamente frequentes (76% a 100%); conforme Paulino et al (2014)..

As alterações histopatológicas foram avaliadas semiquantitativamente de duas formas: a) Índice de Alteração Histopatológica (IAH), com base na severidade de cada lesão.

Para tanto, as alterações foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções do órgão: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis (adaptado de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994). Um valor de IAH foi calculado para cada animal através da fórmula: $IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$, onde I, II e III, correspondem aos estágios respectivamente. O valor médio de IAH foi dividido em 5 categorias: 0-10 = funcionamento normal do tecido; 11-20 = danificação leve a moderada do tecido; 21-50 = modificação moderada a severa do tecido; 51-100 = modificação severa do tecido; maior que 100 = danificação irreparável do tecido; e no b) pelo Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger *et al.* (1997). Para tanto, atribuiu-se um valor numérico para cada exemplar analisado, conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração histopatológica); grau 2 (Pequenos focos); grau 3 (Focos moderados); grau 4 (Lesões frequentes) e grau 5 (Lesões amplamente distribuídas).

2.6. Análise Estatística

Para analisar os resultados (médias \pm DP) de IAH e VMA obtidos para os animais de cada grupo analisado, foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) com teste “a posteriori” de *Tuckey* para comparação entre os grupos, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, com o auxílio do software SigmaPlot 11.0.

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros Físicos e químicos da água

A qualidade da água durante o período experimental, não apresentou nenhuma mudança significativa (tabela 1). Dos experimentos realizados a concentração de 0,5mg/L apresentou o menor valor de OD e a concentração de 50,0mg/L apresentou o maior valor de pH.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos parâmetros físicos e químicos da água nos diferentes tratamentos durante o Experimento.

Parâmetros - Físicos	Controle	IBF	IBF	IBF
Químicos	0,0mg/L	0,5mg/L	5,0mg/L	50,0mg/L
Temperatura (C°)	25,0	25,0	25,0	25,0
pH	6,99±0,14	7,04±0,20	7,08±0,09	7,13±0,08
OD (mg/L¹)	6,47±0,24	6,64±0,30	6,71±0,10	6,77±0,05
Saturação de O₂ (%)	72,20±2,35	72,07±1,81	71,97±0,54	71,23±0,42

3.2. Alterações comportamentais e Lesões cutâneas

Durante os ensaios toxicológicos, com juvenis de jundiá, foram observadas alterações comportamentais e visuais nos peixes expostos às diferentes concentrações de Ibuprofeno, tais como: natação errática, movimentação rápida do opérculo, saltos para a superfície, alguns peixes raspavam-se contra as paredes dos aquários, e outros apresentavam letargia ou se mantinham próximos aos aeradores, já como alterações visuais, houve lesões cutâneas, evidenciadas por pontos vermelhos em torno da cabeça e necrose tecidual (Figura 2). Os peixes do grupo controle apresentaram um comportamento normal do início ao fim do experimento. A taxa de mortalidade, para todos os tratamentos, com exceção do grupo controle, foi de 40%.

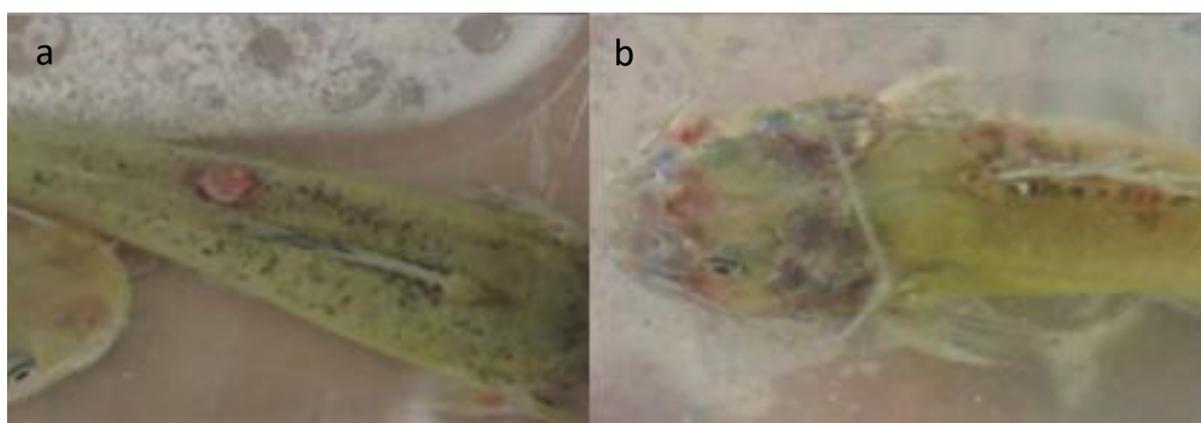


Figura 2 - Lesões cutâneas: (a) necrose tecidual e (b) pontos avermelhados na cabeça.

3.3. Brânquias:

As análises histopatológicas realizadas nas brânquias dos indivíduos submetidos a diferentes concentrações de ibuprofeno, indicaram a presença de diferentes tipos de alterações morfológicas. Contrastando com a imagem de um filamento branquial sem alterações

histológicas (Figura 3a), foram registradas fusão incompleta de lamelas (Figura 3b); fusão completa de lamelas (Figura 3c); aneurisma (Figura 3d); levantamento do epitélio da lamela (seta vermelha) e hiperplasia do epitélio lamelar (seta verde) (Figura 4a); espessamento descontrolado do tecido proliferativo (seta azul) e ruptura do epitélio da lamela (seta branca) (Figura 4b); desarranjo lamelar (Figura 4c) e presença de parasito (Figura 4d).

As alterações observadas foram classificadas quanto ao grau de severidade e comprometimento das funções branquiais, sendo a maioria de estágio I, seguida por alterações de II e de estágio III com a presença de aneurisma (Tabela 2).

Tabela 2 - Histopatologia em Brânquias de juvenis de *Rhamdia quelen*, submetidos às diferentes concentrações de Ibuprofeno. Classificação por estágio, quanto a severidade e ocorrência das lesões. 0=ausente (0-10%); 0+=raramente presente (11-25%); +=presente (26-50%); ++=frequente (50-75%) e +++=altamente frequente (76-100%).

Histopatologia	Estágios	Controle	0,5mg/L	5mg/L	50mg/L
Desarranjo lamelar	I	0	+++	+++	+++
Fusão incompleta de lamelas	I	0	++	+++	+++
Fusão completa de lamelas	I	0	+	++	+++
Levantamento do epitélio lamelar	I	0	++	+++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0	++	+	+++
Presença de parasito	I	0	0	0	0
Ruptura do epitélio da lamela	II	0	++	++	+++
Espessamento descontrolado do tecido proliferativo	II	0	+	++	+++
Aneurisma	III	0	++	+++	+++

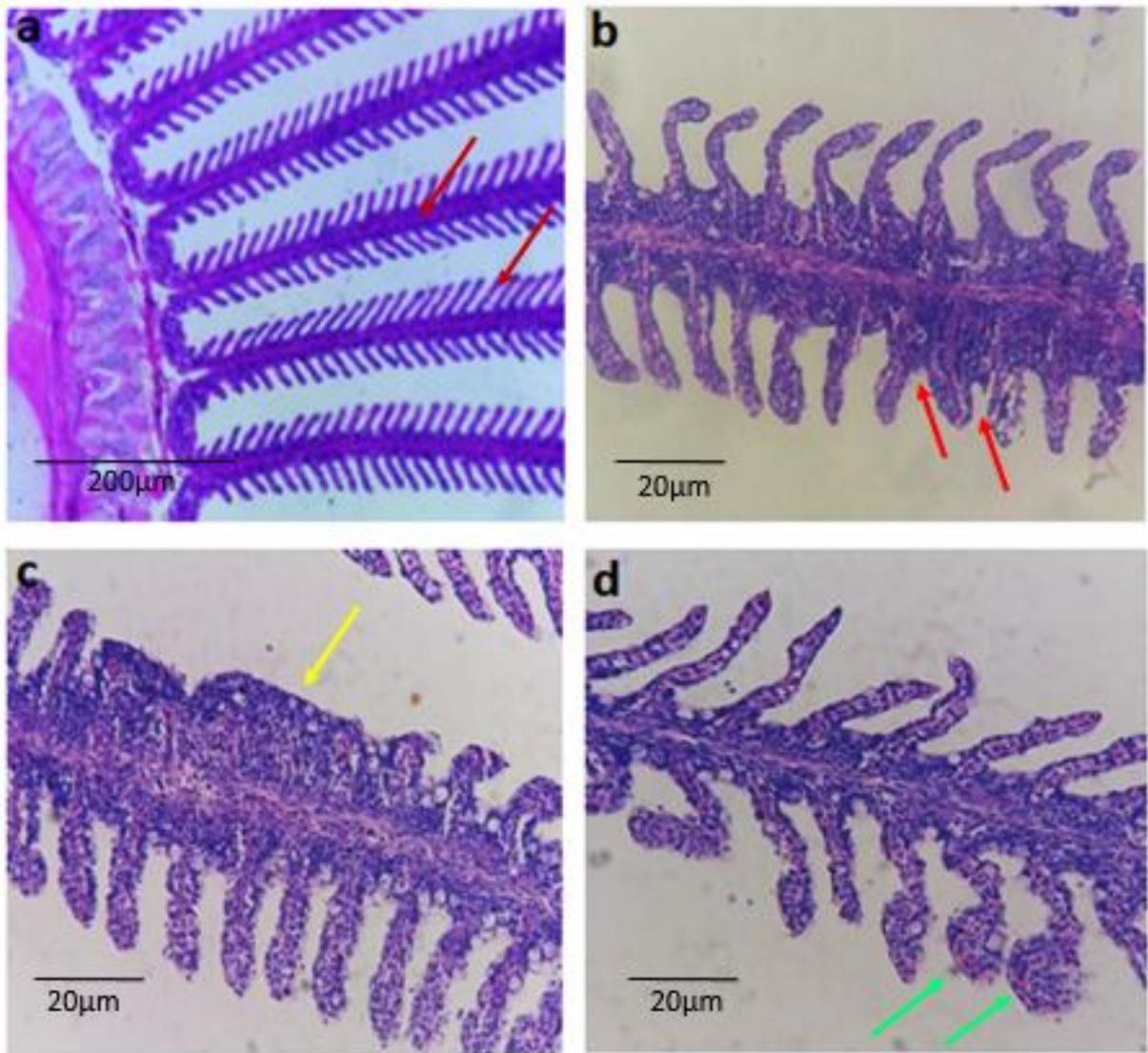


Figura 3. Fotomicrografias de brânquias de juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos às diferentes concentrações de ibuprofeno, filamento branquial sem alterações histológicas, destacando-se as lamelas primária e secundária (a); fusão incompleta de lamelas (b); fusão completa de lamelas (c); aneurisma (d). Coloração HE.

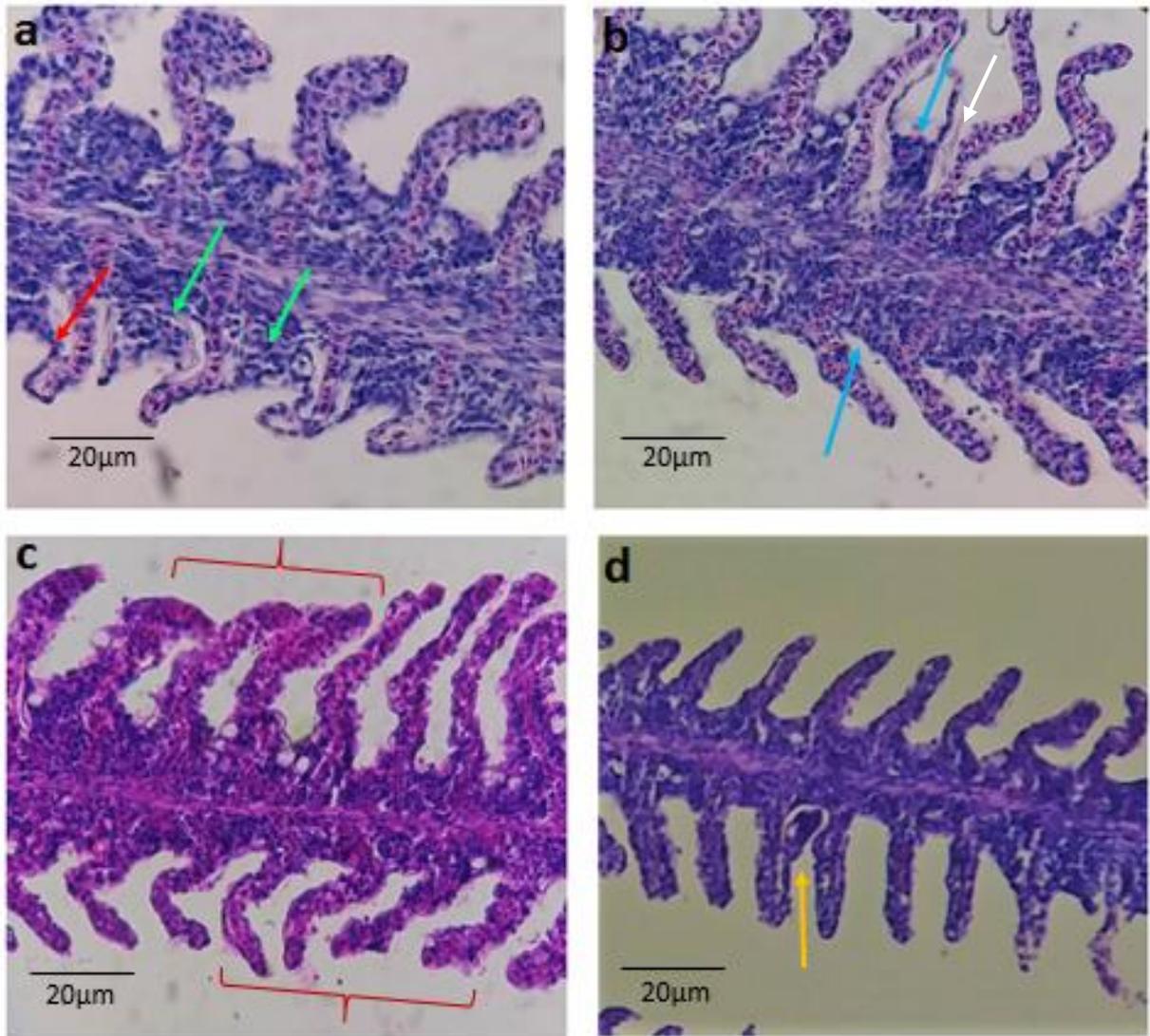


Figura 4. Fotomicrografias de brânquias de juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos às diferentes concentrações de ibuprofeno, levantamento do epitélio da lamela (seta vermelha) e hiperplasia do epitélio lamelar (seta verde) (a); espessamento descontrolado do tecido proliferativo (seta azul) e ruptura do epitélio da lamela (seta branca) (b); desarranjo lamelar (c); presença de Parasito (d). Coloração HE.

O Índice de alterações histológicas - IHA, permitiu a comparação da severidade das lesões branquiais nos peixes submetidos às diferentes concentrações de ibuprofeno, mostrando que houve diferença significativa entre o grupo controle (0,0mg/L) e os demais grupos; já os grupos (0,5; 5,0 e 50,0mg/L) apresentaram o mesmo índice de lesões, não diferindo entre si (Figura 5a).

Os valores de VMA - Valores Médios de Alterações calculados para os peixes nas concentrações 0,0; 0,5; 5,0 e 50,0mg/L, indicam a incidência de lesões nas brânquias dos indivíduos analisados, entretanto, as lesões observadas no grupo controle (0,0mg/L) foram somente, pequenos focos, podendo estar diretamente relacionadas a transição de ambientes, entre piscicultura e tanques para ambientação. Enquanto que houve diferença significativa na frequência das lesões entre os demais grupos (0,5; 5,0 e 50,0mg/L) e mais expressivas em relação ao grupo controle (Figura 5b).

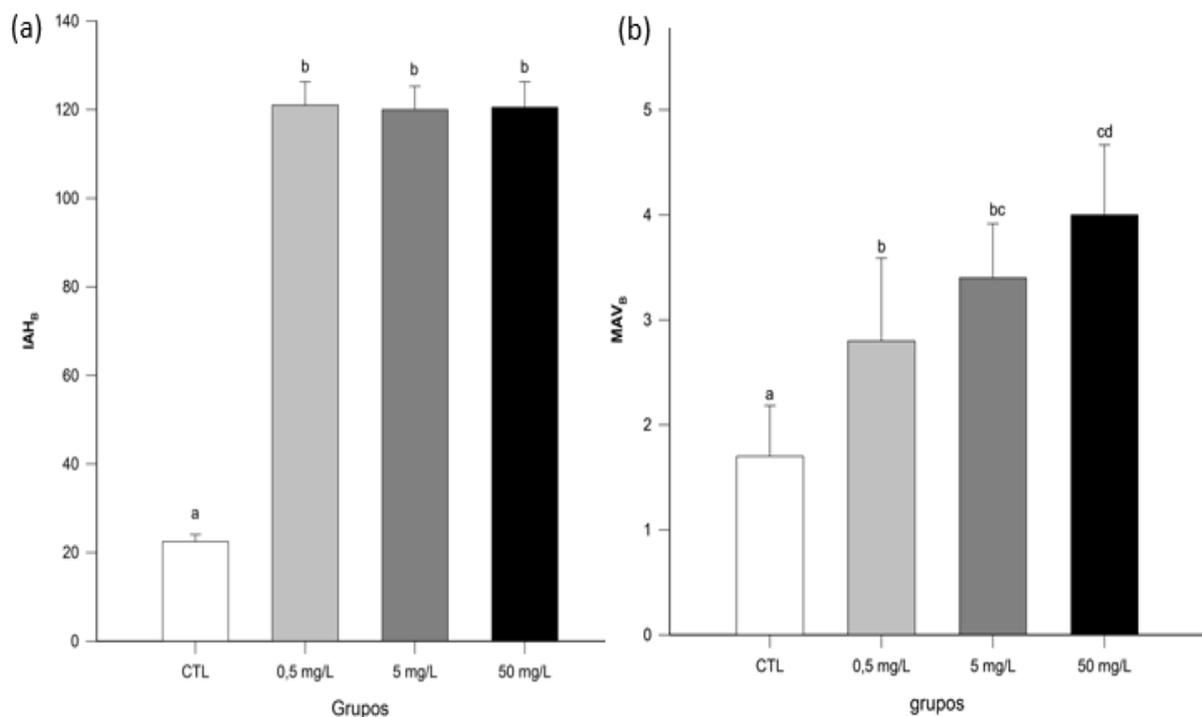


Figura 5. Índice de Alterações Histológicas (IAH) e Valores médios \pm desvio padrão de alterações (VMA). Grupo Controle (CTL); N=06 animais/grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

3.4. Fígado

As análises histopatológicas realizadas em fígados de juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de ibuprofeno, indicaram a presença de diferentes tipos de alterações morfológicas. Contrastando com a imagem de fígado sem alterações histológicas (Figura a), foram registrados: hipertrofia nuclear (Figura 5b); vacuolização nuclear (seta amarela), vacuolização citoplasmática (seta preta), hipertrofia nuclear (seta verde) (Figura 5c); congestão vascular (Figura 5d); necrose focal (Figura 6a); presença de melanomacrófagos (Figura 6b); hiperemia (Figura 6c); degeneração citoplasmática (seta preta) e núcleo na periferia da célula (seta branca) (Figura 6d).

As alterações observadas foram classificadas quanto ao grau de severidade e comprometimento da função hepática, sendo a maioria de estágio I e II, com exceção da necrose que é de estágio III (Tabela 3).

Tabela 3 - Histopatologia em fígados juvenis de *Rhamdia quelen*, submetidos à diferentes concentrações de Ibuprofeno. Classificação por estágio, quanto a severidade e ocorrência das lesões. 0=ausente (0-10%); 0+=raramente presente (11-25%); +=presente (26-50%); ++=frequente (50-75%) e +++=altamente frequente (76-100%).

Histopatologia	Estágios	Controle	0,5mg/L	5mg/L	50mg/L
Atrofia nuclear	I	0	++	++	+++
Hipertrofia nuclear	I	0	+	++	+++
Vacuolização citoplasmática	I	0	++	++	+++
Centros de Melanomacrófagos	I	0	0+	++	+++
Núcleo na periferia da célula	I	0	+	+	++
Degeneração citoplasmática	II	0	++	++	++
Vacuolização nuclear	II	0	+	+	+
Hiperemia	II	0	+	+	++
Congestão vascular	II	0	+	+	+
Necrose focal	III	0	++	++	+++

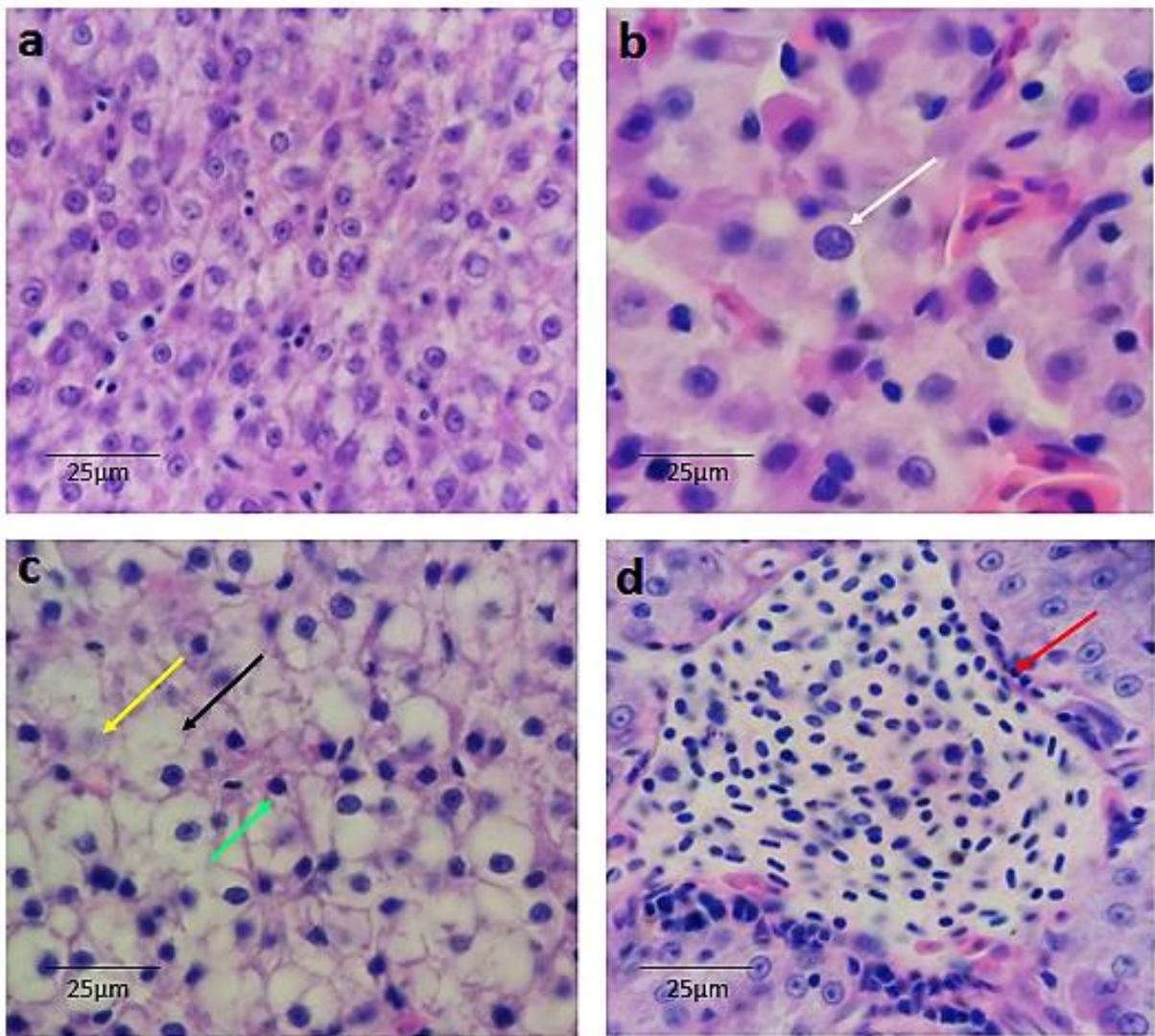


Figura 6. Fotomicrografias de fígados de juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos à diferentes concentrações de ibuprofeno: fígado sem alterações histológicas (a); hipertrofia nuclear (b); vacuolização nuclear (seta amarela), vacuolização citoplasmática (seta preta) e hipertrofia nuclear (seta verde) (c); congestão vascular (d). Coloração HE.

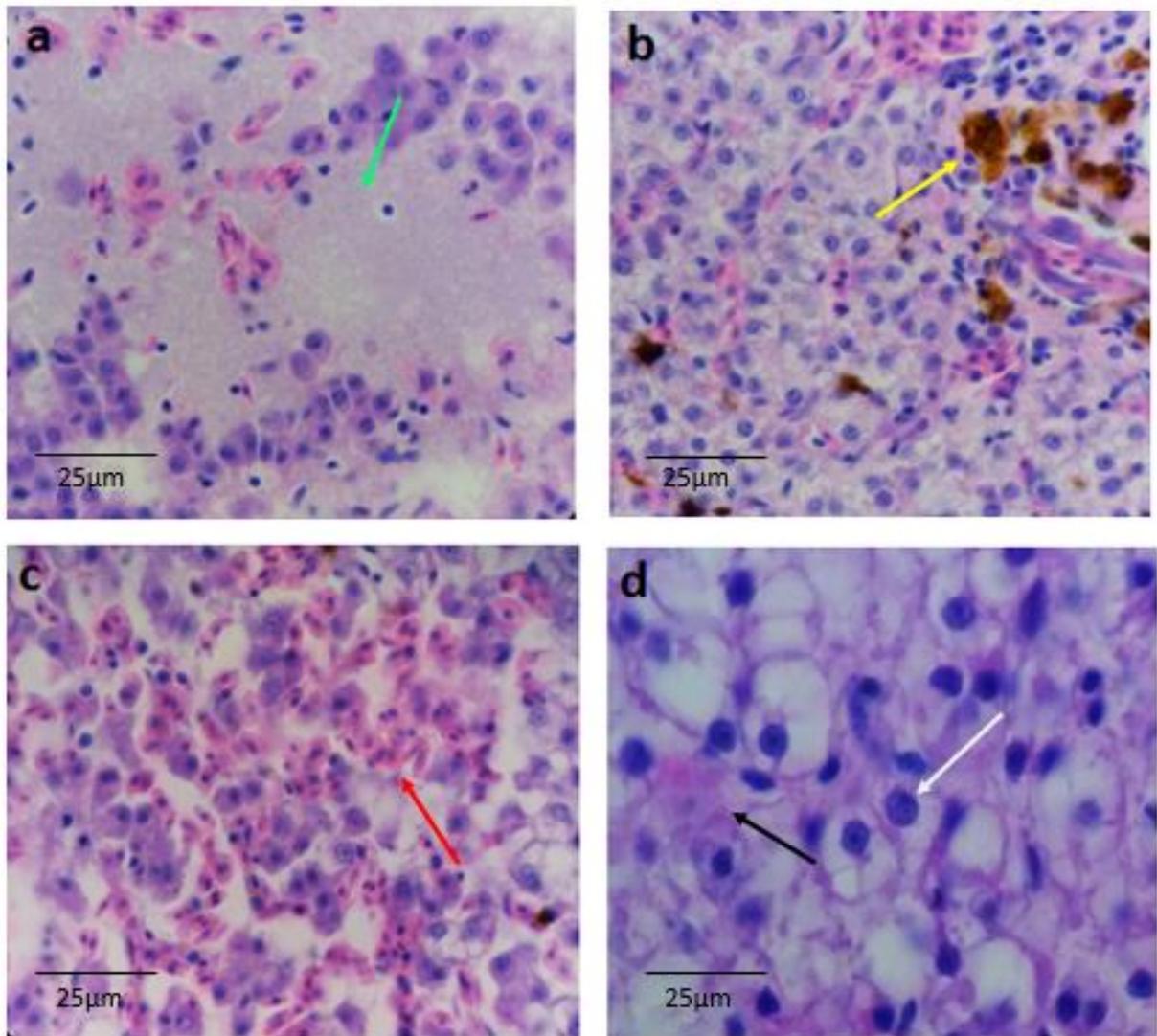


Figura 7. Fotomicrografias de fígados juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos à diferentes concentrações de ibuprofeno, necrose focal (a); presença de melanomacrófagos (b); hiperemia (c); degeneração citoplasmática (seta preta) e núcleo na periferia da célula (seta branca) (d). Coloração HE.

O Índice de Alterações Histológicas - IHA, permitiu a comparação da severidade das lesões hepáticas nos peixes submetidos às diferentes concentrações de ibuprofeno, para tanto, houve diferença significativa entre o grupo controle (0,0mg/L) e os demais grupos; já os grupos (0,5; 5,0 e 50,0mg/L) apresentaram o mesmo índice de lesões (Figura 8a), não diferindo entre si.

Os resultados de VMA - Valores Médios de Alterações nas diferentes concentrações (0,0; 0,5; 5,0 e 50,0mg/L), indicam a incidência de lesões nos fígados sendo que as lesões observadas no grupo controle (0,00mg/L) foram somente, pequenos focos, podendo estar diretamente relacionadas a transição de ambientes, entre piscicultura e tanques para ambientação. Sendo assim, diferiram significativamente na frequência das lesões em relação aos demais tratamentos (0,5; 5,0 e 50,0mg/L). No tratamento com maior concentração de ibuprofeno (50,0mg/L), as alterações foram bastante expressivas, e diferiram estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 8b).

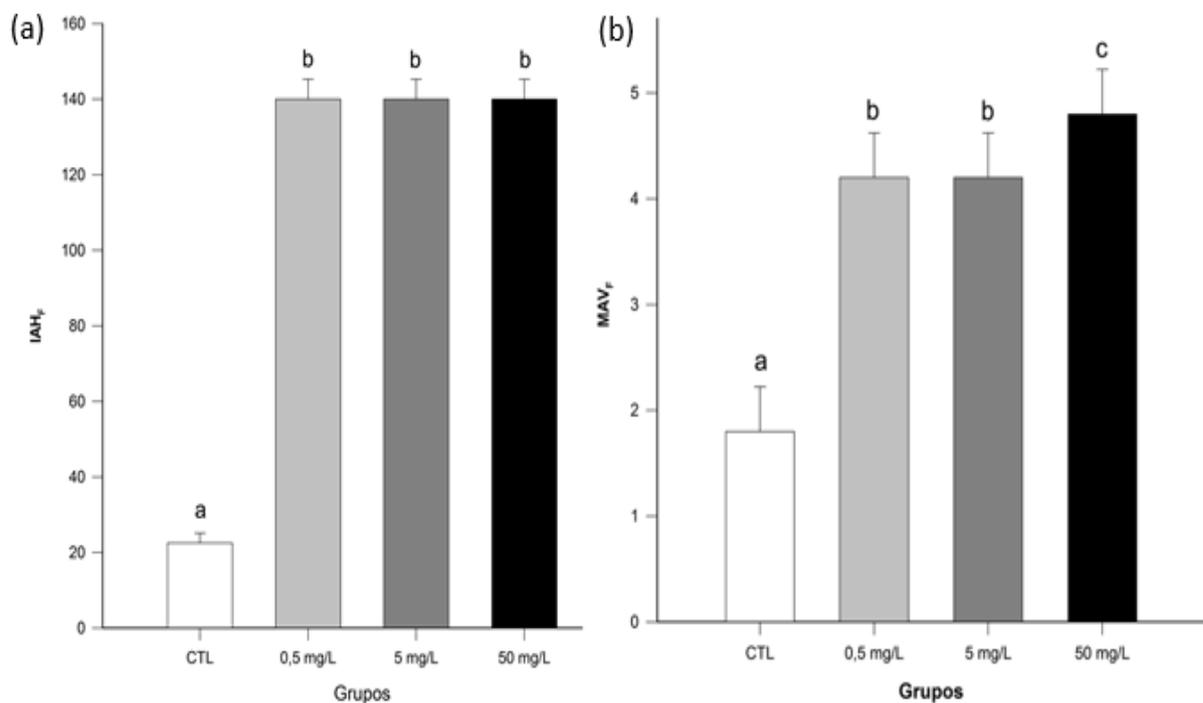


Figura 8. Índice de Alterações Histológicas (IAH) e Valores Médios \pm desvio padrão de Alterações (VMA)). Grupo Controle; N=06 animais/grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

4. DISCUSSÃO

4.1. Brânquias

A perda da modelagem, como um desarranjo lamelar e consequente apoptose filamentar foram constantes nas brânquias expostas ao organofosfato, em estudos realizados com *Oreochromis niloticus* (VIRGENS *et. al.*, 2015). Neste trabalho, em consequência da exposição ao fármaco, o desarranjo lamelar foi presente, e essa alteração dificulta o fluxo de água, comprometendo as trocas gasosas.

A fusão de lamelas é outra lesão importante e decorre da hiperplasia das células epiteliais das lamelas e filamentos branquiais, de modo que o grau da fusão depende da intensidade e localização da hiperplasia. Assim, a fusão será parcial se a hiperplasia se restringir à base do filamento ou somente à uma porção das lamelas. No entanto, se a hiperplasia estiver presente ao longo dos filamentos, a fusão das lamelas será completa (MELETTI *et al.*, 2003), o que resulta na restrição da passagem da água entre as lamelas, dificultando a função respiratória do órgão.

A hiperplasia do epitélio lamelar, acompanhada de fusão completa ou incompleta das lamelas ocorreu em resposta à ação persistente do fármaco, e foi registrada com muita frequência nos cortes histológicos, de forma focal disseminada. O levantamento do epitélio da lamela, ocorreu provavelmente em decorrência de alterações edematosas, o que foi observado frequentemente nas lamelas branquiais, estas lesões também foram observadas por GUERRA- SANTOS *et al.* (2012). A elevação epitelial é uma das primeiras alterações que ocorrem quando o animal está sob algum tipo de estresse (WINKALER *et. al.*, 2008).

Os resultados do IAH, permitiram observar que as lesões causaram danos severos às brânquias. Essas alterações, segundo Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994), não esgotam a capacidade de funcionamento dos órgãos, podendo regredir, caso seja eliminado o agente agressor, no caso o ibuprofeno, entretanto, caso haja persistência, essas lesões podem induzir a perda da função do órgão. Neste mesmo sentido, a hiperplasia do epitélio da lamela, embora não comprometa a função do órgão, pode com sua evolução, provocar alterações edematosas e assim levar a morte do peixe por asfixia. Esse tipo de alteração é extremamente prejudicial às brânquias e a atividade fisiológica dos peixes.

A ruptura do epitélio da lamela é uma das alterações de estágio II, essas mudanças são mais severas e comprometem a função da brânquia; em caso da melhoria da qualidade da água, essas lesões podem ser reparáveis, mas, se o nível de poluição aumentar, podem progredir para o terceiro estágio (POLEKSIC E MITROVIC - TUTUNDZIC, 1994). Para a

espécie *Rhamdia quelen*, essa alteração foi altamente frequente para o grupo de maior concentração testado com o fármaco.

Em dois dos peixes analisados houve presença de parasitas, entre as lamelas secundárias, sendo levado em consideração o fato de os exemplares serem adquiridos de piscicultura comercial, o que pode causar danos estruturais graves, como cistos entre as lamelas, inflamação e possivelmente um aumento no espessamento descontrolado do tecido proliferativo (SCHALCH *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2011). A maioria das infestações por ectoparasitos induz hiperplasia das células mucosas no tecido branquial (HINES & SPIRA, 1974).

O colapso do sistema de células pilares, resulta geralmente em aneurisma, em consequência da presença de um agente estressor na água, prejudicando a integridade vascular com a liberação de grande quantidade de sangue, empurrando o epitélio lamelar para fora (HINTON & LAURÉN, 1990), o que pode levar à ruptura do epitélio lamelar. Em resposta ao ibuprofeno, a perda da modelagem das lamelas secundárias, ocorreu em consequência da desestruturação do filamento lamelar.

De acordo com Da Jansen (2014), as lesões observadas no tecido branquial de *Centropomus undecimalis*, são alterações que podem prejudicar o fluxo sanguíneo, reduzindo as trocas gasosas, o que compromete a função primordial das brânquias, além de prejudicar a manutenção do equilíbrio ácido-base e osmótico do animal. Neste estudo lesões encontradas em *Rhamdia quelen* comprometem a função respiratória do órgão de maneira parcial ou completa.

4.2. Fígado

O papel que o fígado desempenha é de neutralização e eliminação de substâncias tóxicas do organismo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Portanto, a eliminação reduzida dessas substâncias pelo órgão, causa danos a nível de hepatócitos, o que pode resultar em atrofia e hipertrofia nuclear, vacuolização citoplasmática, deslocamento do núcleo para a periferia das células e conseqüentemente lesões mais severas, classificadas como estágio III.

Em estudos realizados por Ferreira (1992), com avaliação de toxicidade de efluentes líquidos do sistema integrado de tratamento do Polo Petroquímico do Sul, sobre a morfogênese de larvas de *Pimephales promelas*, também foi observada vacuolização dos hepatócitos, assim como os resultados obtidos neste estudo, já que na análise dos fígados de *Rhamdia quelen* foi encontrada vacuolização de alguns dos hepatócitos, demonstrando que a

presença de um agente estressor, pode provocar esse tipo de alteração também, neste caso o ibuprofeno.

Em trabalhos com teleósteos realizados por Maduenho & Martinez (2008), que submeteram os peixes a exposição por inseticida, foi observada a presença de agregados de melanomacrófagos, hipertrofia celular e nuclear e núcleos dos hepatócitos deslocados para a periferia. Todas correspondentes as alterações encontradas nos fígados de *Rhamdia quelen*, submetidos neste estudo ao fármaco ibuprofeno.

Centros de melanomacrófagos foram observados no fígado e no tecido hematopoiético do rim e baço dos peixes examinados por ROBERTS (2001). Deste modo, a ocorrência de centros de melanomacrófagos, para os peixes expostos as concentrações de 0,5; 5,0 e 50,0mg/L de Ibuprofeno, indica um aumento na produção de linfócitos, em decorrência de um processo infeccioso ocasionado pelo fármaco.

No entanto, alterações histológicas provocadas por contato com um agente estressor, podem constituir um evento negativo para os peixes (TAKASHIMA & HIBYIA, 1995), a grande intensidade de lesões nos exemplares que foram submetidos ao tratamento com Ibuprofeno, podem sugerir que, a exposição prolongada ao fármaco, levou a evolução de lesões para um estágio mais severo, como a degeneração citoplasmática dos hepatócitos.

Estas alterações podem resultar na degeneração inicial dos processos intracelulares dos hepatócitos, uma vez que o fígado realiza importantes funções no processo de desintoxicação do animal (DUTTA *et al.*, 1993; HASCHEK & ROUSSEAU, 1996). Nesse estudo, foram encontradas alterações em nível de citoplasma e núcleo nas células dos fígados dos peixes submetidos ao tratamento com o fármaco, o que compromete o desempenho deste órgão, uma vez que, alterações na granulação citoplasmática dos hepatócitos, provoca redução da eficiência do fígado, podendo causar o mau funcionamento de outros órgãos, e consequentemente levar à morte do peixe.

A hiperemia é caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo no órgão, e foi observada por Silva (2004) em estudos de alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática.

No trabalho realizado com análises histopatológicas de fígados de *Piaractus mesopotamicus*, várias das lesões observadas são conhecidas como hepatodistrofias, por exemplo, a hipertrofia de hepatócitos, congestão e necroses estão relacionadas aos processos de intoxicação sendo que a extensão e gravidade da lesão é proporcional ao tipo, duração e severidade da agressão e estado fisiológico da célula envolvida (ROBBINS & COTRAN, 2005).

O que condiz com as lesões encontradas neste estudo, onde juvenis de *Rhamdia quelen* foram submetidos a diferentes concentrações do anti-inflamatório ibuprofeno.

Tanto os peixes examinados em experimentos, quanto os encontrados em ambientes naturais, estão sujeitos ao ataque de agentes biológicos e químicos, podendo resultar em diferentes graus e tipos de lesões (CAMPOS *et al.*, 2008). Para os peixes examinados neste ensaio toxicológico, as lesões foram de moderadas à severas de acordo com o Índice de Alterações histológicas (IAH), e foram mais expressivas na concentração mais elevada (50,0mg/L de Ibuprofeno).

O fígado dos peixes é especialmente susceptível à ação de produtos químicos graças à lentidão do fluxo sanguíneo em relação ao débito cardíaco. Além disso, o fluxo biliar é cerca de 50 vezes mais lento em peixes que em mamíferos, tornando mais vagarosa a depuração de produtos tóxicos (GINGERICH, 1982). Portanto, os elementos tóxicos, incluindo os fármacos, que são levados até o fígado pela corrente sanguínea desempenham efeitos nos hepatócitos por maior tempo se comparado com a depuração dos mamíferos, se tornando mais suscetíveis até mesmo em exposição à concentrações mais baixas, o que condiz com as lesões encontradas em *Rhamdia quelen*, mesmo nas concentrações menores.

Segundo De La Torre *et al.* (2005), os órgãos de animais que são utilizados para estudos histológicos informam o potencial de impacto que a espécie sofre à exposição por poluentes em determinados ambientes. Dependendo do grau de variações de mudanças químicas e fisiológicas, pode resultar em alterações histopatológicas, levando a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (HINTON & LAURÉN, 1990; HINTON *et al.*, 1992). As lesões encontradas nos fígados de *Rhamdia quelen*, demonstram que o fármaco apresenta potencial tóxico, o que compromete o funcionamento adequado deste órgão, podendo levar o indivíduo à morte.

5. CONCLUSÃO

Os resultados da presente análise permitem afirmar que tanto em baixas, quanto em concentrações mais elevadas, e no tempo de exposição testado, o ibuprofeno causou danos reversíveis e irreversíveis aos peixes, porém, em doses maiores as lesões classificadas em estágio I, II e III, foram em sua maioria de ocorrência altamente frequentes, podendo resultar na morte desses peixes. Portanto, nossos resultados comprovam, através do ensaio toxicológico realizado, o potencial tóxico do fármaco ibuprofeno para a espécie *Rhamdia quelen*.

6. REFERÊNCIAS

- ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K.V. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, Amsterdam, v. 333, n.1-3, p. 167-184.
- BALDISSEROTTO, B. & RADÜNZ NETO, J. (2004). Criação de Jundiá. Santa Maria: Editora UFSM, 232p.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 523-530.
- CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES F. R. (2008). Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *prochilodus lineatus* e *pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por *myxosporídios*, capturados no rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 17, n. 4, p. 200-205.
- CAMPOS, C.M.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. (2011). Histopathology of gills of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) infested by monogenean and myxosporea, caught in Aquidauana River, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.20, p.67-70.
- CARNEIRO P. C. F. (2002). Resultados preliminares sobre Jundiá, *Rhamdia quelen*, como espécie importante para a piscicultura na Região Sul do Brasil. Goiânia, p.403.
- CASATTI, L. & CASTRO, R.M.C. (2006). Testing the ecomorphological hypothesis in a headwater riffles fish assemblage of the rio são francisco, southeastern brazil. *Neotrop. Ichthyol*, v. 4, n.2, p. 203-214.
- CASATTI, L., LANGEANI, F. & CASTRO, R.M.C., (2001). Peixes de riacho do parque estadual morro do diabo, bacia do alto rio Paraná, sp. *Biota neotrop.* v.1, p. 1-15.
- COSTA P. G. (2016). Efeito toxicológico da exposição aguda e crônica do anti-incrustante MXD-100 sobre o jundiá (*Rhamdia quelen*) - Universidade Estadual do Oeste Do Paraná, Dissertação de Mestrado, 28p.
- DA JANSEN, L. (2014). Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico. **Arq. Bras. Med**, v. 66, n. 2, p. 593-601.
- DAUGHTON, C. G., & JONES-LEPP, T. L. (2001). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: scientific and regulatory issues. Washington, DC: American Chemical Society. p. 116-140.
- DE LA TORRE, F. R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*, v. 59, n. 4, p. 577-583.

- DUTTA, H.M.; ADHIKARI, S.; SINGH, N K.; ROY, P. K.; MUNSHI, J. S. D. (1993). Histopathological changes induced by Malathion in the liver of freshwater *catfish heteropneustes fossilis* (Bloch). *B. Environ. Contam. Tox.*, New York, 1993, v. 51, p. 895-900.
- FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D, (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122-159.
- FERREIRA, M. F. N. (1992). Avaliação da Toxicidade dos efluentes líquidos do sistema integrado de tratamento do Polo Petroquímico do Sul sobre a morfogenese de larvas de *Pimephales promelas* Rafinesque, 1820. Dissertação de Mestrado, p. 107.
- FIGUEIREDO-FERNANDES, A.M. FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. A., MONTEIRO, R. A., REIS-HENRIQUES, M. A., & ROCHA, E. (2007). Spatial relationships of the intrahepatic vascular- biliary tracts and associated pancreatic acini of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae): A serial section study by light microscopy. *Annals of Anatomy*, v. 189, p. 17-30.
- FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T.S.; CHRISTOFOLETTI, C.A. (2012). The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. Jaguarão/RS: Fundação Universidade Federal do Pampa, UNIKASSEL, v. 3, p. 975- 1006.
- FRACALOSSO, D. M., ZANIBONI FILHO, E., MEURER, S. (2002). No rastro das espécies nativas. *Panorama da Aquicultura*, São Paulo, v. 12, n. 74, p. 43-49.
- GALLI, C. C. & ABE, D.S. (2010). Disponibilidade, Poluição e Eutrofização das Águas. In: BICUDO, C. E. M.; TUNDISI, J. G.; SCHEUEWSTUHL, M. C. B. (orgs.). *Águas do Brasil: análises estratégicas*, p.165-178.
- GHELFI, A. (2014). Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen*. - Universidade Federal do Paraná, Dissertação de Mestrado, 28p.
- GINGERICH, W.H. (1982). Hepatic toxicology of fishes. In: WEBER, L.F. (ed.) *Aquatic toxicology*, New York: Plenum Press. p. 55-105.
- GUERRA-SANTOS, B., ALBINATI, R. C., MOREIRA, E. L. T., LIMA, F. W., AZEVEDO, T. M. P., COSTA, D. S., ... & LIRA, A. D. (2012). Parâmetros hematológicos e alterações histopatológicas em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) com amyloodinose. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 11, p. 1184-1190.
- HASCHEK, W.M.; ROUSSEAU, C.G. (1996). *Handbook of toxicology pathology*. London: Academic Press.
- HINES R. & SPIRA D. (1974). Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L.) III. Pathology. *J. Fish Biol.* Cap. 6, p.189-196.

- HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. (1992). *Histopathologic Biomarkers*. Boca Raton: Lewis Publishers. 1992, Cap. 4, p. 155 -196.
- HINTON, D.E.; LAUREN, D.J., (1990). Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. v. 8, p. 51-66.
- IBUPROFENO. (2011). Gotas 50 e 100 mg/ML. Farm. Resp.: Miriam Onoda Fujisawa. Campinas – SP. Medley S.A. Indústria Farmacêutica. Bula de Remédio.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (2004). *Histologia Básica*. 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- LOMBARDI, J.V. (2004). Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds.). *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Ed. Varela, São Paulo.
- MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R. (2008). Acute Effects of Diflubenzuron on the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 148, p 265–272.
- MELETTI, P.C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C.B.R. (2003). Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (Ed.). *Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. São Paulo: SÃO CARLOS. p.149-180.
- OYAKAWA, O.T., AKAMA, A., MAUTARI, K.C. & NOLASCO, J.C. (2006). *Peixes de riachos da Mata Atlântica*. Ed. Neotrópica, São Paulo.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Oxford: FISHING NEWS BOOKS, p.339-352.
- PAULINO, M. G., *et al.* (2014). The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Science of the Total Environment*, v. 497, p. 293-306.
- RASHED M. N. (2001). Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser lake. *Environment International*. v. 27. p. 27-33.
- RENAME, (2010). *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais*. Ministério da saúde. 7ª edição. Brasília.
- ROBERTS, R. J. (2001). The anatomy and physiology of teleosts. *Fish pathology*, (Ed. 3), 12-54p.
- ROBBINS, S.; COTRAN, R.S. (2005). *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*, In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. (Eds) Elsevier: Rio de Janeiro. 1592p.

- ROCHA, R. M., COELHO, R. P., MONTES, C. S., SANTOS, S. S. D., & FERREIRA, M. A. P. (2010). Avaliação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) da Baía do Guajará, Belém, Pará. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n.1, p.101-109.
- SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E. (2006). Efeitos do parasitismo sobre a estrutura branquial de *Leporinus macrocephalus* GARAVELLO E BRITSK, 1988 (Anastomidae) e *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1987 (Osteichthyes: Characidae). *Rev. Bras. de Parasitol. Vet.*, v.15, p.110-115.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, v. 6, n. 1, p. 75-86.
- SILFVERGRIP, A.M.C. A. (1996). sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm, Sweden, (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History. 156p.
- SILVA, A. G. Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática (2004). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração Zoologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 80 f.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. (1995). An atlas of fish histology normal and pathological features. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag.
- TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. (1997). Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, v. 37, n. 1, p. 51-70.
- TUNDISI, J.G. (2005). Água no século XXI: enfrentando a escassez. 2 ed. São Paulo. Rima, p. 256.
- VIRGENS, A. C., CASTRO, R. L., & CRUZ, Z. M. A. (2015). Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfloramida. V.13, n 1, p. 26-31.
- WINKALER, E. U., DAS GRAÇAS SILVA, A., GALINDO, H. C., & DOS REIS MARTINEZ, C. B. (2008). Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 23, p. 507-514.