

HEMATOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE TILÁPIA-DO-NILO EXPOSTA A CONCENTRAÇÕES SUB-LETAIS DE SELENITO DE SÓDIO (Na₂SeO₃ Se⁴⁺)*

Maria José Tavares RANZANI-PAIVA¹; Julio Vicente LOMBARDI¹; Fernando Corleto MAIORINO²; Adriano GONÇALVES³; Danielle de Carla DIAS¹

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da toxicidade crônica do selenito de sódio (Na₂SeO₃ Se⁴⁺) em jovens de tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus*. Para tanto, um teste de toxicidade foi realizado com três concentrações sub-letais deste sal (0,4 mgSe L⁻¹, 0,04 mgSe L⁻¹ e 0,01 mgSe L⁻¹) e 0 mgSe L⁻¹ (controle). O experimento foi conduzido por 14 dias, com amostragem de seis indivíduos por tratamento nos intervalos 0, 3, 7, 10 e 14 dias para a avaliação dos efeitos crônicos sub-letais por meio de análises hematológicas de rotina e análises histopatológicas. Diferença significativa ($P < 0,05$) ocorreu na concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e aumento do número total de leucócitos, causados principalmente pelo aumento do número de linfócitos, monócitos e neutrófilos. Nas brânquias dos peixes expostos ao selenito de sódio foi encontrada hiperplasia grave no décimo quarto dia. No rim cefálico ocorreu nefrose caracterizada pela degeneração vacuolar tubular e glomerulonefrite, atrofia glomerular e glomerulosclerose, glomerulonefrite proliferativa, nefrosclerose, calcificação tubular, edema e hemorragia. Conclui-se o selenito de sódio nas concentrações utilizadas provocaram alterações hematológicas e histológicas em tilápia-do-nylo, embora tenham sido usadas concentrações sub-letais neste ensaio.

Palavras chave: Sangue; rim cefálico; brânquias; piscicultura; toxicidade aquática

HEMATOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS IN NILE TILAPIA, EXPOSED TO SUBLETHAL CONCENTRATIONS OF SODIUM SELENITE (Na₂SeO₃ Se⁴⁺)

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the effects of chronic toxicity of sodium selenite (Na₂SeO₃ SE⁴⁺) on juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Therefore, a toxicity test was carried out with three sub-lethal concentrations of that salt (0.4 mgSe L⁻¹, 0.04 mgSe L⁻¹ and 0.01 mgSe L⁻¹), plus a control group. The experiment was carried out for 14 days, sampling six individuals per treatment in intervals of 0, 3, 7, 10 and 14 days. Effects of chronic sublethal concentrations of selenite were evaluated by routine haematological and histopathological analysis. There were significant differences ($P < 0.05$) in the rate of hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and an increase of the total number of leukocytes, mainly due to the increased number of lymphocytes, monocytes, and neutrophils. Severe gill hyperplasia was found on the fourteenth day. Nephrosis were found in the cephalic kidney, characterized by glomerulonephritis and tubular vacuolar degeneration, which was a result of the necrosis or secondary infection, glomerular atrophy and glomerulosclerosis, proliferative glomerulonephritis, nephrosis, nephrosclerosis, tubular calcification, edema and hemorrhage. It was found that selenite, at the tested concentrations despite being sublethal, caused histological and hematological changes in Nile tilapia.

Keywords: Blood; head kidney; gill; aquaculture; aquatic toxicity

Artigo Científico: Recebido em 21/02/2013 – Aprovado em 25/11/2013

¹ Instituto de Pesca de São Paulo. Av. Francisco Matarazzo, 455 – CEP: 05001-900 – São Paulo – SP – Brasil. e-mails: mase@pesca.sp.gov.br (autora correspondente); jvlombardi@uol.com.br

² Lab&Vet Diagnóstico e Consultoria Ltda

³ Programa de Pós Graduação do CAUNESP, Jaboticabal, SP, Bolsista FAPESP (Processo nº 2001/11386-0)

* Aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Pesca (CEEAI Protocolo nº 01/2013)

INTRODUÇÃO

O selênio é um micronutriente essencial para a sobrevivência dos animais e tem papel importante como parte de sítios ativos em selenoproteínas. Quando em concentrações ideais, é benéfico para o organismo, participando das reações metabólicas, tais como a síntese da glutathiona peroxidase (STADTMAN, 1980). Atua como antioxidante intracelular, na prevenção de danos provocados por radicais livres nas membranas celulares (STADTMAN, 1980), além de auxiliar na resistência a doenças (HUA *et al.*, 2001; LIM *et al.*, 2001). O selênio pode antagonizar a toxicidade de vários metais pesados por interações complexas nos organismos (FRANÇA *et al.*, 2007), como a função protetora do selênio com o mercúrio, observado em algas, camarões, caranguejos, ostras, peixes (EISLER, 1985) e mamíferos (ENDO *et al.* 2002).

Entretanto, quando em excesso na água, é tóxico, restringindo alguns processos oxidativos fisiológicos, inibindo a atividade de algumas enzimas ou causando efeitos teratogênicos e, deste modo, representa ameaça à sobrevivência dos peixes (KENNEDY *et al.*, 2000; LEMLY, 2002; HAMILTON e PALACE, 2001).

A análise hematológica é de fundamental importância na avaliação das condições biológicas, fisiológicas, bioquímicas e patológicas nos animais (HRUBEC e SMITH, 1998; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Os efeitos sub-letais em peixes expostos a altas concentrações de selênio incluem alterações hematológicas e teciduais (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2000; MUSCATELLO *et al.*, 2006; LIAO *et al.*, 2007; FRANÇA *et al.*, 2007; MILLER *et al.*, 2007; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2011). Entretanto, até o momento não foram encontrados estudos com tilápia.

Em *Lepomis cyanellus* expostos ao selênio ocorreu inchaço das lamelas braquiais, necroses hepáticas e degeneração dos folículos ovarianos (SORENSEN *et al.*, 1984). PETERS *et al.* (1999) e DEAKER e MAHER (1997) notaram redução no hematócrito e na concentração de hemoglobina, edema, degeneração do folículo ovariano e do fígado, aberrações cromossômicas e lesões no miocárdio e pericárdio em peixes expostos ao selênio. SORENSEN *et al.* (1984) relataram necrose

renal, glomerulonefrite em *Lepomis* sp. coletado em lago contaminado por selênio. LOHNER *et al.* (2001) sugeriram que o selênio é causador de irregularidades hematológicas, como a redução do hematócrito, e anormalidades histopatológicas, como edema, necrose, anormalidades no fígado, ovários e brânquias.

Tendo em vista o que foi mencionado anteriormente sobre a ação antagonista do selênio nos processos toxicológicos causados por metais pesados e que, apesar disso, o próprio selênio, em determinadas concentrações, pode oferecer riscos de intoxicação aos peixes, o presente trabalho visou a avaliar os efeitos fisiológicos negativos, que porventura pudessem ser causados por concentrações subletais de selênio na tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). O objetivo geral foi o de fornecer parâmetros passíveis de utilização nas interpretações de avaliação da qualidade da água, em situações onde se pratica a pesca e/ou aquicultura desta espécie de peixe, bem como disponibilizar ferramentas indicadoras para que o produtor possa utilizar na gestão da qualidade da água do ambiente onde se produz este pescado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em ambiente climatizado (temperatura constante de $26,0 \pm 0,8^\circ\text{C}$). Jovens de tilápia-do-nylo *O. niloticus* (Linnaeus, 1757), provenientes de piscicultura comercial, com peso médio de $30,7 \pm 4,7$ g e comprimento médio de $12,1 \pm 0,9$ cm, foram inicialmente aclimatados pelo período de 96 horas em aquários de 60 L, estocados de acordo com as densidades preconizadas para testes de toxicidade ($0,8$ g peixe L^{-1}). Durante este período, os animais foram avaliados quanto ao seu estado de hígidez, sendo considerados aspectos externos como coloração de brânquias, muco na superfície corporal, presença de parasitos na pele, entre outros. Em seguida, foram mantidos por mais 48 horas, sob as mesmas condições de laboratório, em aquários de vidro, dotados de aeração artificial, revestidos internamente com sacos plásticos e preenchidos com 40 L de água de abastecimento urbano decolorada. A alimentação foi fornecida em forma de ração extrusada, com 38% proteína bruta.

Como substância teste foi utilizado o selenito de sódio (Na_2SeO_3 Se^{4+}), em forma de sal, diluído na proporção de 1,666 g em 500 mL de água MILLI-Q. Este procedimento resultou em solução concentrada, de 1.000,00 mg L^{-1} de Se^{4+} , denominada de solução estoque. Esta solução foi pipetada e diluída diretamente nos aquários para proporcionar as concentrações testadas.

Os aquários foram dispostos em três réplicas, contendo três concentrações sub-letais: 0,40 mg L^{-1} de Se^{4+} e 0,04 L^{-1} Se^{4+} L^{-1} ($\text{CL}_{50-96\text{h}}/10$ e $\text{CL}_{50-96\text{h}}/100$ (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2011) e 0,01 mg L^{-1} Se^{4+} (CONAMA, 2005) e 0 mg L^{-1} de Se^{4+} (controle). As concentrações aplicadas foram determinadas em ensaios preliminares, conduzidos sob as mesmas condições descritas para o presente estudo. Foram colocados 16 peixes por aquário, na densidade de 8,27 peixes L^{-1} .

No início do experimento, colheu-se sangue de seis indivíduos antes da distribuição dos peixes nos aquários, caracterizado como tempo zero. O experimento foi conduzido durante 14 dias, com amostragem de dois indivíduos por tratamento de cada réplica, totalizando seis indivíduos por tratamento, nos intervalos 0, 3, 7, 10 e 14 dias. Nesta fase, os peixes foram alimentados com ração extrusada logo após as colheitas de sangue, seguido de sifonagem do excedente e de excretas e substituição de 1/3 da água, por uma solução previamente preparada e de mesma concentração. Após 14 dias de experimento os peixes não mostraram crescimento que fosse significativo.

Para as análises hematológicas, os peixes foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína (10%) e o sangue foi colhido por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas descartáveis, heparinizadas. Foram determinados o número de eritrócitos (RBC), contados em câmara de Neubauer utilizando-se o diluente de Hayem; o hematócrito (Ht) pelo método do microhematócrito; a concentração de hemoglobina (Hb) pelo método de cianometahemoglobina. Em seguida, foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Foram confeccionadas extensões sanguíneas coradas com

uma combinação de May Grünwald-Giemsa, segundo método de ROSENFELD (1947), e utilizadas para contagem diferencial e total de leucócitos (Lc) e de trombócitos (Tr), esses dois últimos pelo método indireto (HRUBEC e SMITH, 1998).

Para as análises histopatológicas, os peixes anestesiados profundamente com benzocaína foram mortos por comoção cerebral. Colheu-se fragmentos de brânquias e rim cefálico de todos os animais, sendo fixados em formol 10% por 24 horas em temperatura ambiente, e em seguida, transferidos para solução de álcool 70%. Posteriormente, os fragmentos foram incluídos em parafina e foram realizados cortes histológicos de 6 μm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina (HE).

Os dados obtidos nas análises hematológicas foram submetidos à ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando-se a diferença entre as médias dos tratamentos, por tempo de exposição e entre as concentrações.

As características físicas e químicas da água, tais como temperatura ($^{\circ}\text{C}$), condutividade elétrica (μScm^{-1}), pH e oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) foram monitoradas após duas horas do início do teste e após cada coleta de peixes para análise. Ao final do experimento, analisou-se a dureza total pelo método de titulometria e teor de amônia total ($\text{mg NH}_4 \text{L}^{-1}$), por colorimetria.

RESULTADOS

As análises clínicas indicaram que os peixes não possuíam lesões, alterações de estruturas externas ou distúrbios de comportamento e natação.

Não foram observadas alterações nos valores das variáveis físicas e químicas da água utilizada para os testes (Tabela 1).

Os valores médios de Ht e Hb (Tabela 2) reduziram-se em todos os tratamentos. Os valores médios de Ht dos peixes do controle mantiveram-se, na maior parte do tempo, acima dos valores dos demais tratamentos. Para os peixes mantidos na concentração de 0,4 mg Se^{4+} L^{-1} , o valor médio de Ht, embora não significativo, foi o mais baixo de todos no final do experimento.

Tabela 1. Médias \pm desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica de selenito de sódio para *Oreochromis niloticus*.

| Concentrações (mgSe ⁴⁺ L ⁻¹) | Temperatura (°C) | OD (mg L ⁻¹) | pH | Condutividade (μ S cm ⁻¹) | Amônia total (mg NH ₄ L ⁻¹) | Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹) |
|--|---------------------|-----------------------------|---------------|---|---|---|
| Controle | 25,6 \pm 1,3 | 6,0 \pm 0,7 | 7,6 \pm 0,4 | 135,6 \pm 44,6 | 13,3 \pm 1,6 | 20,3 \pm 0,9 |
| 0,01 | 25,5 \pm 1,1 | 6,3 \pm 0,7 | 7,7 \pm 0,3 | 127,1 \pm 42,0 | 12,4 \pm 0,8 | 20,3 \pm 0,2 |
| 0,04 | 26,3 \pm 0,4 | 5,9 \pm 0,8 | 7,8 \pm 0,4 | 155,6 \pm 58,2 | 15,9 \pm 0,9 | 20,9 \pm 0,9 |
| 0,4 | 26,2 \pm 0,4 | 6,3 \pm 0,6 | 7,7 \pm 0,3 | 116,5 \pm 37,2 | 10,2 \pm 1,2 | 22,2 \pm 0,9 |

OD = oxigênio dissolvido

Tabela 2. Médias (\bar{x}) \pm erro padrão (EP) das variáveis hematológicas da série vermelha de *Oreochromis niloticus* exposta à concentrações de selenito de sódio nos intervalos de tratamento.

| Variáveis | Concentrações (mgSe ⁴⁺ L ⁻¹) | Dias | | | | | Tratamentos |
|---|--|------------------|------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------|
| | | 0 x \pm EP | 3 x \pm EP | 7 x \pm EP | 10 x \pm EP | 14 x \pm EP | |
| Ht (%) | 0 | 26,4 \pm 1,9 | 25,3 \pm 2,7 | 25,9 \pm 1,3 | 23,8 \pm 1,1 | 22,3 \pm 0,8 | A |
| | 0,01 | - | 27,1 \pm 1,4 | 21,9 \pm 1,7 | 21,3 \pm 0,9 | 23,7 \pm 1,3 | AB |
| | 0,04 | - | 23,4 \pm 1,6 | 19,4 \pm 2,3 | 19,3 \pm 1,9 | 24,0 \pm 0,7 | B |
| | 0,40 | - | 23,8 \pm 1,7 | 19,4 \pm 2,1 | 22,4 \pm 2,3 | 21,8 \pm 2,1 | B |
| TEMPO | | α | $\alpha\beta$ | β | β | β | |
| Hb (g dL ⁻¹) | 0 | 7,3 \pm 0,6 | 6,3 \pm 0,8 ^a | 6,6 \pm 0,5 | 6,1 \pm 0,3 | 6,9 \pm 0,4 | A |
| | 0,01 | - | 6,5 \pm 0,4 ^{ab} | 5,7 \pm 0,4 | 4,9 \pm 0,2 | 5,9 \pm 0,7 | AB |
| | 0,04 | - | 5,2 \pm 0,5 ^{ab} | 4,9 \pm 0,6 | 5,9 \pm 0,6 | 6,7 \pm 0,3 | B |
| | 0,40 | - | 4,7 \pm 0,4 ^b | 4,7 \pm 0,6 | 5,8 \pm 0,9 | 5,4 \pm 0,8 | B |
| TEMPO | | NS | NS | NS | NS | NS | |
| RBC (x 10 ⁴ μ L ⁻³) | 0 | 214,5 \pm 10,4 | 206,7 \pm 16,6 | 236,5 \pm 10,6 | 223,1 \pm 12,3 | 219,0 \pm 10,6 | NS |
| | 0,01 | - | 220,1 \pm 8,2 | 218,2 \pm 13,0 | 201,9 \pm 14,3 | 225,9 \pm 15,6 | NS |
| | 0,04 | - | 192,9 \pm 15,0 | 203,8 \pm 21,6 | 204,9 \pm 12,2 | 190,1 \pm 17,8 | NS |
| | 0,40 | - | 247,5 \pm 16,6 | 186,3 \pm 11,7 | 181,6 \pm 30,7 | 221,2 \pm 10,4 | NS |
| TEMPO | | NS | NS | NS | NS | NS | |
| VCM (fL) | 0 | 128,3 \pm 5,1 | 125,3 \pm 3,5 ^a | 110,5 \pm 7,2 | 107,4 \pm 3,8 ^{ab} | 102,5 \pm 3,0 ^{ab} | NS |
| | 0,01 | - | 123,5 \pm 6,4 ^a | 100,0 \pm 2,9 | 107,2 \pm 5,2 ^{ab} | 105,4 \pm 3,3 ^{ab} | NS |
| | 0,04 | - | 122,5 \pm 5,5 ^a | 95,7 \pm 6,1 | 93,0 \pm 5,3 ^b | 131,8 \pm 12,2 ^a | NS |
| | 0,40 | - | 96,8 \pm 4,4 ^b | 103,2 \pm 5,8 | 133,2 \pm 14,1 ^a | 98,9 \pm 8,9 ^b | NS |
| TEMPO | | α | $\alpha\beta$ | β | β | β | |
| HCM (g dL ⁻¹) | 0 | 34,2 \pm 2,9 | 33,1 \pm 2,0 ^a | 28,0 \pm 2,2 | 27,3 \pm 0,9 | 31,7 \pm 2,2 | A |
| | 0,01 | - | 29,6 \pm 1,9 ^a | 26,1 \pm 1,4 | 24,8 \pm 1,6 | 26,3 \pm 2,8 | AB |
| | 0,04 | - | 18,9 \pm 1,4 ^a | 24,7 \pm 2,0 | 34,3 \pm 4,5 | 24,8 \pm 3,8 | AB |
| | 0,40 | - | 27,3 \pm 2,0 ^b | 24,5 \pm 2,5 | 28,4 \pm 1,6 | 37,0 \pm 4,6 | B |
| TEMPO | | α | β | $\alpha\beta$ | $\alpha\beta$ | α | |
| CHCM (g dL ⁻¹) | 0 | 26,8 \pm 2,3 | 26,3 \pm 1,1 ^a | 25,4 \pm 1,5 | 25,5 \pm 0,9 ^b | 30,8 \pm 1,3 | A |
| | 0,01 | - | 23,9 \pm 0,7 ^{ab} | 26,1 \pm 1,1 | 23,2 \pm 1,1 ^b | 24,8 \pm 2,2 | AB |
| | 0,04 | - | 22,2 \pm 1,0 ^{bc} | 25,5 \pm 1,8 | 30,7 \pm 1,5 ^a | 27,8 \pm 1,1 | A |
| | 0,40 | - | 19,5 \pm 1,2 ^c | 23,9 \pm 1,1 | 25,5 \pm 1,5 ^b | 24,2 \pm 2,1 | B |
| TEMPO | | α | β | $\alpha\beta$ | $\alpha\beta$ | α | |

Ht = hematócrito, Hb = concentração de hemoglobina, RBC = número de eritrócitos, VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média

^{AB} Letras diferentes diferem estatisticamente por Tukey ($P < 0,05$) entre as concentrações de selenito de sódio com dados agrupados

^{ab} Letras diferentes na coluna diferem estatisticamente por Tukey ($P < 0,05$) entre as concentrações de selenito de sódio dentro de cada tempo de exposição

^{ab} Letras diferentes na linha diferem estatisticamente por Tukey ($P < 0,05$) entre os tempos de exposição

^{NS} ou ausência de letras - Não significativo ($P > 0,05$)

Nos peixes mantidos nas concentrações de 0,04 e 0,4 mgSe⁴⁺ L⁻¹, observou-se os menores valores de Hb em relação aos peixes mantidos nas demais concentrações. Após 14 dias de exposição, houve diminuição na Hb de peixes expostos a 0,4 mgSe⁴⁺ L⁻¹ e aumento nas demais concentrações. Nos animais do controle e naqueles mantidos em 0,01 mgSe⁴⁺ L⁻¹ a Hb manteve-se constante em relação aos demais tratamentos. Para os valores de Ht e Hb, verificou-se diferença estatística ($P < 0,05$) entre as diversas concentrações e entre os dias de colheita.

Os valores médios do RBC e VCM (Tabela 2) mostraram alterações em todas as concentrações, porém as diferenças não foram significativas. Essas oscilações nos valores médios de VCM foram reflexo das ocorridas nos valores de RBC e de Ht. Verificou-se que ocorreu tanto diminuição no número de células no sangue, quanto no volume das mesmas.

Os valores médios de HCM (Tabela 2) foram similares para o controle e nas concentrações 0,01; 0,4 e 0,04 mgSe⁴⁺ L⁻¹, apresentaram o mesmo perfil. Na concentração de 0,4 mgSe⁴⁺ L⁻¹ observou-se variações significativas entre o controle e as concentrações de 0,01, 0,04 mg Se⁴⁺ L⁻¹ em relação aos valores dos peixes mantidos na concentração 0,40 mgSe⁴⁺ L⁻¹.

As médias de CHCM (Tabela 2) do controle e dos animais mantidos na concentração de 0,01 mgSe⁴⁺ L⁻¹ apresentaram variação significativa em relação aos peixes mantidos nas demais concentrações, onde esses valores oscilaram, com tendência a aumento após o 3º dia de experimento (Tabela 2). Para esses valores, verificou-se diferença estatística ($P < 0,05$) entre as concentrações e entre os dias de colheita.

Ocorreu aumento significativo do número total de leucócitos (Tabela 3) devido, principalmente, ao aumento significativo do número de linfócitos (linfocitose). O número de linfócitos apresentou aumento progressivo em seu número até o final das colheitas. Os monócitos

apresentaram aumento acentuado em seu número no terceiro e no décimo dias de colheita, com certa estabilidade até o fim do experimento. O número de neutrófilos estabilizou-se no terceiro e sétimo dias de colheita e apresentou tendência a diminuir no final do experimento.

Os basófilos foram encontrados em pequenas quantidades e em poucos peixes no decorrer do experimento (Tabela 3). Eosinófilos foram encontrados apenas nos tratamentos controle, em apenas três indivíduos, um de cada repetição. O número de células imaturas (CI) aumentou no início do experimento reduzindo-se bruscamente na última colheita (Tabela 3).

O número de trombócitos aumentou em relação ao tempo em todas as concentrações testadas, com queda no final do experimento, ou seja, em 14 dias de exposição (Tabela 4). Entretanto, pela análise estatística, verificou-se que não ocorreu diferença ($P < 0,05$) para os valores médios do número de trombócitos que comprovasse o efeito das concentrações testadas.

Quanto às análises histopatológicas das brânquias e rim cefálico, não foram observadas alterações nos peixes amostrados no momento zero e no grupo controle. Nos animais expostos à concentração 0,01 mgSe⁴⁺ L⁻¹, também não foram constatadas alterações morfológicas nos mesmos órgãos. Nos peixes mantidos na concentração de 0,4 mgSe⁴⁺ L⁻¹ notou-se hiperplasia branquial a partir do décimo dia de colheita, com maior intensidade no décimo quarto dia. Nas avaliações de rim cefálico, nos peixes mantidos sob concentração de 0,04 e 0,40 mgSe⁴⁺ L⁻¹, constatou-se nefrose e glomerulonefrite, à partir do sétimo dia de colheita. Nas amostras sob concentração de 0,40 mgSe⁴⁺ L⁻¹, observou-se atrofia glomerular e nefrosclerose no décimo dia de colheita. Ainda, para a mesma concentração, verificou-se edema, hemorragia, calcificação tubular, atrofia glomerular, nefrose, nefrosclerose e glomerulonefrite proliferativa, nas amostras colhidas no décimo quarto dia do experimento (Tabela 5).

Tabela 3. Médias (x) ± erro padrão (EP) dos números absolutos de leucócitos de *Oreochromis niloticus* exposta a concentrações de selenito de sódio (mg L⁻¹), nos momentos de colheita.

| Variáveis | Concentrações (mgSe ⁴⁺ L ⁻¹) | Dias | | | | | Tratamentos |
|---------------------------|---|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
| | | 0 x ± EP | 3 x ± EP | 7 x ± EP | 10 x ± EP | 14 x ± EP | |
| LT (μL) | 0 | 621,5 ± 159,8 | 1501,5 ± 157,4 | 1424,9 ± 786,3 | 2604,0 ± 645,8 | 2218,9 ± 662,1 | NS |
| | 0,01 | - | 3201,7 ± 232,0 | 1199,7 ± 209,8 | 2090,2 ± 645,8 | 2218,9 ± 662,1 | |
| | 0,04 | - | 2745,0 ± 493,0 | 1536,7 ± 344,5 | 2243,1 ± 628,2 | 2172,8 ± 435,1 | |
| | 0,40 | - | 2878,9 ± 267,9 | 1693,4 ± 634,4 | 1775,9 ± 415,2 | 2039,6 ± 366,3 | |
| TEMPO | β | | α | αβ | α | α | |
| Lf (μL) | 0 | 157,7 ± 33,5 | 684,7 ± 154,6 | 697,6 ± 180,9 | 2126,2 ± 507,2 | 1820,6 ± 235,2 | NS |
| | 0,01 | - | 2555,6 ± 837,6 | 728,5 ± 82,4 | 1340,0 ± 239,5 | 1145,6 ± 430,7 | |
| | 0,04 | - | 1811,7 ± 430,8 | 768,6 ± 211,9 | 1874,6 ± 632,2 | 1689,6 ± 273,8 | |
| | 0,40 | - | 2103,5 ± 624,3 | 1077,0 ± 446,0 | 1169,1 ± 358,6 | 1628,4 ± 387,6 | |
| TEMPO | β | | α | αβ | α | α | |
| Mn (μL) | 0 | 14,3 ± 3,5 | 167,7 ± 44,7 | 66,7 ± 18,3 | 183,32 ± 42,7 | 160,6 ± 49,5 | NS |
| | 0,01 | - | 212,9 ± 55,0 | 91,4 ± 38,9 | 205,8 ± 88,8 | 119,5 ± 49,2 | |
| | 0,04 | - | 249,7 ± 103,2 | 121,6 ± 24,8 | 88,49 ± 21,1 | 156,8 ± 58,3 | |
| | 0,40 | - | 157,9 ± 30,6 | 78,8 ± 19,5 | 148,01 ± 45,3 | 100,6 ± 12,7 | |
| TEMPO | | | NS | NS | NS | NS | |
| Nt (μL) | 0 | 362,5 ± 103,7 | 643,8 ± 197,7 | 635,4 ± 213,7 | 259,2 ± 71,3 | 285,0 ± 67,3 | NS |
| | 0,01 | - | 394,3 ± 303,9 | 358,0 ± 101,1 | 519,2 ± 214,3 | 272,3 ± 162,6 | |
| | 0,04 | - | 642,8 ± 199,2 | 636,2 ± 143,7 | 252,9 ± 86,1 | 313,9 ± 116,6 | |
| | 0,40 | - | 596,3 ± 171,7 | 514,0 ± 84,3 | 437,9 ± 144,8 | 303,9 ± 60,9 | |
| TEMPO | | | NS | NS | NS | NS | |
| Bs (μL) | 0 | 0,8 ± 0,4 | 1,3 ± 1,3 | 0,5 ± 0,5 | 12,5 ± 6,0 | 4,6 ± 2,1 | NS |
| | 0,01 | - | 5,05 ± 5,0 | 15,3 ± 8,2 | 8,7 ± 5,3 | 0,0 ± 0,0 | |
| | 0,04 | - | 17,72 ± 10,3 | 2,8 ± 1,8 | 5,9 ± 3,9 | 6,5 ± 3,2 | |
| | 0,40 | - | 1,91 ± 1,9 | 4,0 ± 2,7 | 1,5 ± 1,5 | 4,3 ± 2,8 | |
| TEMPO | | | NS | NS | NS | NS | |
| Es (mm ⁻³) | 0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | NS |
| | 0,01 | - | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| | 0,04 | - | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| | 0,40 | - | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| CI (μL) | 0 | 1,0 ± 0,5 | 3,3 ± 1,5 | 23,1 ± 18,3 | 22,8 ± 9,9 | 0,0 ± 0,0 | NS |
| | 0,01 | - | 33,9 ± 13,0 | 6,6 ± 3,5 | 16,5 ± 5,5 | 3,8 ± 3,8 | |
| | 0,04 | - | 23,1 ± 13,0 | 7,4 ± 5,6 | 21,2 ± 9,8 | 6,1 ± 6,1 | |
| | 0,40 | - | 19,3 ± 15,0 | 19,7 ± 9,8 | 19,5 ± 10,7 | 2,5 ± 2,5 | |

Lt = leucócitos totais, Lf = linfócitos, Mn = monócitos, NT = neutrófilos, Bs = basófilos, Es = Eosinófilos, CI = células imaturas

^{a,b} Letras diferentes na linha diferem estatisticamente por Tukey (P<0,05) entre os tempos de exposição

NS - Não significativo

Tabela 4. Médias (x) ± erro padrão (EP) do número de trombócitos de *Oreochromis niloticus* exposta a concentrações de selenito de sódio nos momentos de colheita.

| Dias | Concentrações (mgSe ⁴⁺ L ⁻¹) | | | |
|------|---|------------------|------------------|-----------------|
| | controle x ± EP | 0,01 x ± EP | 0,14 x ± EP | 1,40 x ± EP |
| 0 | 498,00 ± 391,1 | - | - | - |
| 3 | 1037,23 ± 470,7 | 1559,61 ± 988,1 | 760,00 ± 572,3 | 1155,97 ± 535,8 |
| 7 | 1376,45 ± 1021,1 | 1091,06 ± 1273,8 | 1124,28 ± 507,7 | 1023,61 ± 202,0 |
| 10 | 2028,29 ± 1476,5 | 1987,27 ± 770,8 | 2580,67 ± 1384,9 | 1097,07 ± 699,4 |
| 14 | 1152,29 ± 743,8 | 829,64 ± 706,3 | 1229,85 ± 1100,9 | 1534,77 ± 778,9 |

Tabela 5. Alterações histopatológicas encontradas nas brânquias, e rim cefálico de tilápia, *Oreochromis niloticus* exposta a diferentes concentrações de selenito de sódio nos momentos de colheita.

| Dias | Órgão | Avaliação histopatológica segundo as concentrações de selênio (mgSe ⁴⁺ L ⁻¹) | | | |
|------|--------------|---|----------------|-----------------------------|--|
| | | Controle | 0,01 | 0,04 | 0,40 |
| 0 | Brânquia | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações |
| | Rim Cefálico | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações |
| 3 | Brânquia | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações |
| | Rim Cefálico | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações |
| 7 | Brânquia | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações |
| | Rim Cefálico | Sem alterações | Sem alterações | Nefrose Glomerulonefrite | Nefrose Glomerulonefrite |
| 10 | Brânquia | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações | Hiperplasia branquial Nefrose |
| | Rim Cefálico | Sem alterações | Sem alterações | Nefrose Glomerulonefrite | Glomerulonefrite Atrofia glomerular Nefrosclerose |
| 14 | Brânquia | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações | Hiperplasia branquial intensa Edema Hemorragia Nefrose |
| | Rim Cefálico | Sem alterações | Sem alterações | Nefrose Glomerulonefrite | Calcificação tubular Atrofia glomerular Nefrosclerose Glomerulonefrite proliferativa |

DISCUSSÃO

As condições da água do experimento permaneceram dentro dos limites aceitáveis para a criação de peixes (SIPAÚBA-TAVARES, 1995). Os valores de amônia em sua forma tóxica manteve-se em 0,22 mg L⁻¹, abaixo dos níveis de toxicidade para peixes (NOGA, 1995).

A ausência de resultados negativos obtidos no presente estudo na concentração de 0,01 mg Se⁴⁺ L⁻¹, comprovada pelas análises estatísticas, demonstrou que esta concentração está corretamente empregada pelo CONAMA (2005) ao preconizá-la como parâmetro limítrofe para a classificação da qualidade das águas destinadas à prática da aquicultura.

A redução dos níveis de hemoglobina, sem alteração no RBC indicou que o selênio interferiu na formação da hemoglobina e não na eritropoiese (HILTON *et al.*, 1980; SORENSEN e THOMAS 1988). SORENSEN e BAUER (1983), também

encontraram sintomas de anemia, com redução dos valores de VCM e CHCM, associados aos baixos valores de hematócrito para *Lepomis* sp. exposto ao selênio. Em *Lepomis cyanellus* coletados em rios contaminados por selênio também foi relatada anemia (SORENSEN *et al.*; 1984; LOHNER *et al.*; 2001).

Em *O. niloticus*, houve redução do CHCM nos peixes expostos ao selênio, o que pode causar diminuição da capacidade respiratória do animal, uma vez que o selênio liga-se à hemoglobina, impedindo o transporte de oxigênio (LEMLY, 2002). O número de células imaturas encontrado no presente estudo refletiu a diminuição da formação de eritrócitos e demora da substituição de células vermelhas do sangue circulante, o que também pode contribuir para a redução da capacidade respiratória e aumento do estresse metabólico.

A contagem leucócitos, tal como é realizada em outros animais, é de grande valor para o

diagnóstico das discrasias do sangue em peixes (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Essas contagens, segundo McKIM *et al.* (1970), podem revelar alterações morfológicas e numéricas das células sanguíneas, associadas a várias etiologias, inclusive às modificações do meio aquático causadas por produtos tóxicos.

A exposição ao selenito de sódio provocou leucocitose, principalmente por linfocitose, monocitose e neutrofilia, aumento do número de trombócitos e lesões em brânquias e rins. Essas mesmas alterações foram observadas por SORENSEN *et al.* (1984) e por LOHNER *et al.* (2001) em *Lepomis cyanellus* coletados em rios contaminados por selênio.

O aumento do número de leucócitos (leucocitose) em peixes como ocorrido neste estudo pode estar relacionado à exposição a metais pesados como relatado em várias populações de peixes expostos aos mesmos por GILL e PANT (1987) ou à presença de infecção (GOEDE e BARTEN, 1990). Porém, diferentemente, SORENSEN e BAUER (1983) e SORENSEN *et al.* (1984) relataram leucopenia em peixes submetidos a concentrações de selênio, que, segundo estes autores, acumula-se no fígado, impedindo a leucopoese.

A leucocitose aqui observada foi devida, principalmente, à linfocitose, monocitose e neutrofilia. Esses distúrbios são pontuais, pois foram relatadas, em outras espécies de peixes, diferentes alterações na contagem de leucócitos, como no trabalho de LEMLY (1993), que relata linfocitose e neutropenia em *L. cyanellus* e, para a mesma espécie, SORENSEN *et al.* (1984) notaram significativa linfocitose. WEEKS *et al.* (1990) e FAISAL e HUGGETT (1993) encontraram apenas neutrofilia em peixes estuarinos e *Leiostomus xanthurus*, respectivamente. Segundo SORENSEN (1991), a neutrofilia pode indicar a aumento da capacidade fagocitária ou da resistência dos animais às doenças. LEMLY (2002) observou linfocitose em peixes coletados em lagos contaminados por selênio, como resposta generalizada do sistema imune, acionado pelo estresse fisiológico e pela debilitação do estado de saúde.

Os basófilos são células encontradas raramente no sangue periférico de peixes.

LOHNER *et al.* (2001) observaram essas células em peixes coletados em rio contaminado por selênio e GILL e PANT (1987) também encontraram basófilos em sangue periférico de peixes expostos a metais pesados.

SORENSEN e BAUER (1983) notaram diminuição no número de células imaturas brancas em *L. cyanellus* exposto ao selênio como consequência do aumento da taxa de eritropoiese. FINLEY (1985) relatou que, em *Lepomis* sp. exposto ao selênio na concentração de 5 µg L⁻¹ durante 180 dias, foi evidenciada diminuição no número de células imaturas. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo com aumento dessas células nos primeiros dias de experimento e posterior diminuição. LOHNER *et al.* (2001), entretanto, não observaram células imaturas em peixes expostos a altas concentrações de selênio.

LEMLY (2002) e SORENSEN *et al.* (1984) também encontraram aumento do número de trombócitos em peixes coletados em ambientes contaminados por selênio; contudo, esses autores referem-se a esta célula como parte dos glóbulos brancos, incluindo-os na contagem diferencial de leucócitos. Alguns autores sugeriram que os trombócitos atuam nos mecanismos de defesa de peixes, uma vez que foram encontrados em locais de injúria, ao redor de bactérias em meios de cultura ou mesmo aderidos a elas (KOZINSKA *et al.*, 1999). Os trombócitos dos peixes desempenham papel importante, não só na coagulação como também, segundo alguns autores, no processo inflamatório (MATUSHIMA e MARIANO, 1996), além de atuar como fagócito (TAVARES-DIAS *et al.*, 2007).

Quanto às alterações histopatológicas de brânquias e rins encontradas no presente trabalho, verificou-se que são semelhantes àquelas descritas por outros autores. LEMLY (2002) e LIAO *et al.* (2007) encontraram telangiectasia e esfoliação do epitélio branquial em *Oryzias latipes* exposto a selenito de sódio. SORENSEN e BAUER (1983) e LEMLY (2002) encontraram glomerulonefrite, descamação, vacuolização e mesmo destruição do epitélio renal, tendo como consequência o mau funcionamento do sistema tubular glomerular. Outras alterações foram encontradas por LEMLY (2002) em outros órgãos analisados, evidenciando

que o selênio pode, de maneira rápida e insidiosa, causar impacto sobre a população de peixes.

CONCLUSÕES

Do ponto de vista da metodologia clássica empregada nos estudos ecotoxicológicos, pode-se dizer que todas as concentrações testadas neste estudo podem ser classificadas como CENO, ou seja, Concentrações de Efeito Não Observado, uma vez que a maior parte dos resultados, obtidos a partir das manifestações monitoradas no presente estudo, não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros hematológicos numéricos. Todavia, estas mesmas concentrações, embora não tenham causado efeitos estatisticamente detectáveis nos parâmetros hematológicos testados, devem ser vistas com cautela, pois manifestaram alguns efeitos deletérios de ordem histopatológica, cuja capacidade de recuperação não foi abordada neste estudo, o que não permite dizer se estes efeitos são reversíveis ou não.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado (Processo nº 2001/11386-0) e ao Dr. Leonardo Tachibana pela análise estatística dos dados.

REFERÊNCIAS

- CONAMA. 2005 RESOLUÇÃO N° 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005: 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 17 jan. 2013.
- DEAKER, M. e MAHER, W. 1997 Low volume microwave digestion for the determination of selenium in marine biological tissues by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 350: 287-294.
- EISLER, R. 1985 Selenium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service. Biological Report*, 85(1.5): 41p.
- ENDO, T.; HARAGUCHI, K.; SAKATA, M. 2002 Mercury and selenium concentrations in the internal organs of toothed whales and dolphins marketed for human consumption in Japan. *Science of the Total Environment*, 300: 15-22.
- FAISAL, M. e HUGGETT, R.J. 1993 Effluents of polycyclic aromatic hydrocarbons on the lymphocyte mitogenic responses in spot *Leiostomus xanthurus*. *Marine Environmental Research*, 35: 121-124.
- FINLEY, K.A. 1985 Observations of bluegills fed selenium contaminated *Hexagenia nymphs* collected from Belews Lake. North Carolina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 35: 816-825.
- FRANÇA, J.G.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.; CARVALHO, S.; SERIANI, R. 2007 Toxicidade crônica do cloreto de mercúrio (HgCl₂) associado ao selênio, através do estudo hematológico em tilápia *Oreochromis niloticus*. *Bioikos*, 21(1): 11-19.
- GILL, T.S. e PANT, J.C. 1987 Hematological and pathological effects of chromium toxicosis in the freshwater fish, *Barbus conchoniuis*. *Water, Air and Soil Pollution*, 35: 816-825.
- GOEDE, R.W. e BARTEN, B.A. 1990 Organismic indices and an autopsy based assessment as indicators of health and condition of fish. In: AMERICAN FISHERIES SOCIETY SYMPOSIUM, 8: 93-108.
- HAMILTON, S.J. e PALACE, V.P. 2001 Assessment of selenium effects in lotic ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50: 161-166.
- HILTON, J.W.; HODSON, P.V.; SLINGER, S.J. 1980 The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Nutrition*, 110: 2527-2535.
- HRUBEC, T.C. e SMITH, S.A. 1998 Hematology of fish. In: WEISS, D.J. e WARDROP, K.J. (eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 5ª ed., p.1120-1125.
- HUA, X.; ZHOU, H.; QIU, X.; LIU, X.; CAO, D.; ZHANG, D. 2001 Effects of dietary *Bacillus* sp. and selenoyeast on the growth and disease resistance of allogynogenetic crucian carp. *Journal of Fisheries of China*, 25(5): 448-453.
- KENNEDY, C.J.; MCDONALD, L.E.; LOVERIDGE, R.; STROSHER, M.M. 2000 The effect of bioaccumulated selenium on mortalities and

- deformities in the eggs, larvae, and fry of a wild population of cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(1): 46-52.
- KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. 1999 Influence of thrombocytes activity on the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio*) to *Aeromonas hydrophila* injection at different temperatures. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 43: 53-62.
- LEMLY, A.D. 1993 Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish. *Aquatic Toxicology*, 27: 133-158.
- LEMLY, A.D. 2002 Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example. *Aquatic Toxicology*, 57: 39-49.
- LIAO, C.-Y.; ZHOU, Q.-F.; FU, J.-J.; SHI, J.-B.; YUAN, C.-G. 2007 Interaction of methylmercury and selenium on the bioaccumulation and histopathology in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology*, 22(1): 69-77.
- LIM, C.; KLESIOUS, P.H.; WEBSTER, C.D. 2001 The role of dietary phosphorus, zinc, and selenium in fish health. In: LIM, C. e WEBSTER, C.D. (eds.) *Nutrition and Fish Health*. NY, USA Food Products Press. p.201-212.
- LOHNER, T.W.; REASH, R.J.; WILLET, V.E.; ROSE, L.A. 2001 Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium laden coal ash effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50: 203-216.
- MATUSHIMA, E.R. e MARIANO, M. 1996 Kinetics of the inflammatory reaction induced by carregenin in the swim bladder of *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia). *Brazilian Journal of veterinary Research and Animal Science*, 33: 5-10.
- MCKIM, J.M.; CHRISTESEN, G.M.; HUNT, F.P. 1970 Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short-term and long-term exposure to copper. *Journal of Fish Research Board of Canada*, 27(1): 1883-1889.
- MILLER, L.L.; WANG, F.; PALACE, V.P.; HONTELA, A. 2007 Effects of acute and subchronic exposures to waterborne selenite on the physiological stress response and oxidative stress indicators in juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 83(4): 263-271.
- MUSCATELLO, J.R.; BENNETT, P.M.; HIMBEAULT, P.M. 2006 Larval deformities associated with selenium accumulation in northern pike (*Esox lucius*) exposed to metal mining effluent. *Environmental Science Technology*, 40(20): 6506-6512.
- NOGA, E.J. 1995 *Fish Disease: Diagnosis and treatment*. Mosby-Year Book. St. Louis, Missouri, USA. 367p.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W.C.; ROULEAU, C. 2000 Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and Nordic freshwater fish. *Environmental Research, Section A*, 83: 286-292.
- PETERS, G.M.; MAHER, W.A.; KRKOWA, F.; ROACH, A.C.; JESWANI, H.K.; BARFORD, J.P.; GOMES, V.G.; REIBLE, D.D. 1999 Selenium in sediments, pore waters and benthic infauna of Lake Macquarie, New south Wales, Australia. *Marine Environmental Research*, 47: 491-508.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e SILVA-SOUZA, A.T. 2004 Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. *Saúde de Organismos Aquáticos*. Ed. Livraria Varela. São Paulo. p.89-120.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.; GONÇALVES, A. 2011 Acute toxicity of sodium selenite and sodium selenate in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 37(2): 191-197.
- ROSENFELD, G. 1947 Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancreáticos e estudo de diversos fatores. *Memórias do Instituto Butantã*, São Paulo, 20: 315-328.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. 1995 *Limnologia aplicada à aquicultura*. Boletim Técnico no. 1. São Paulo: UNESP. 66p.
- SORENSEN, E.M.B. 1991 *Metal poisoning in fish*. Florida: CRC Press. 597p.
- SORENSEN, E.M.B. e BAUER, T.L. 1983 Hematological dyscrasia in teleosts chronically exposed to selenium laden effluent. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 12: 135-141.
- SORENSEN, E.M.B. and THOMAS, P. 1988 Selenium accumulation, reproductive status, and

- histopathological changes in environmentally exposed redear fish. *Archives of Toxicology*, 61(4): 324-329.
- SORENSEN, E.M.B.; CUMBIE, P.M.; BAUER, T.L.; BELL, J.S.; HARLAN, C.W. 1984 Histopathological, hematological, condition-factor, and organ weight changes associated with selenium accumulation in fish from Belews Lake, North Carolina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 13: 153-162.
- STADTMAN, T.C. 1980 Selenium dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 93p.
- TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. 2007 Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *Journal of Applied Ichthyology*, 23(6): 709-712.
- WEEKS, B.A.; HUGGET, R.J.; WARINNER, J.E.; MATHEWS, E.S. 1990 Macrophage responses of estuarine fish as bioindicators of toxic contamination. In: MCCARTHY, J. e SHUGART, L. (Eds.) *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers: Universidade da Califórnia. p.193-201.