

AValiação Histopatológica do Baço, Coração e Encéfalo de Tilápia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) Exposta ao Cloreto de Mercúrio *

Danielle de Carla DIAS ^{1,6}; Fernando Corleto MAIORINO ²; Maria José Tavares RANZANI-PAIVA ³; Nilton Massuo ISHIKAWA ¹; Julio Vicente LOMBARDI ³; José Roberto FERREIRA ⁴; Fernanda Menezes FRANÇA ⁵; Cláudia Maris FERREIRA ³

RESUMO

O presente estudo verificou os efeitos tóxicos do cloreto de mercúrio em concentrações subletais sobre o quadro histológico da tilápia *Oreochromis niloticus*, analisando o baço, o coração e o encéfalo dos organismos. Para essas avaliações foram utilizados juvenis de tilápia com $27,13 \pm 4,67$ g e $12,44 \pm 0,84$ centímetros. Os animais ($n=102$) foram expostos a três concentrações de cloreto de mercúrio (HgCl_2): $C1=0,02 \text{ mgL}^{-1}$; $C2=0,002 \text{ mgL}^{-1}$; e $C3=0,0002 \text{ mgL}^{-1}$, tendo-se o grupo controle como referência para os efeitos observados. O tempo total de duração do experimento foi de 14 dias, tomando-se amostras para análise no 3º, 7º, 10º e 14º dia. No baço, observou-se hiperplasia e hipertrofia dos centros de melanomacrófagos, proporcionais às concentrações testadas. Entretanto, no encéfalo e no coração dos animais submetidos à experimentação, as alterações histológicas observadas não foram relevantes, quando comparadas às observadas no grupo controle.

Palavras-chave: toxicologia; melanomacrófagos; tilápia

HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF THE SPLEEN, HEART, AND BRAIN OF THE TILAPIA *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) EXPOSED TO MERCURY CHLORIDE

ABSTRACT

The objective of this investigation was to assess the effects of the mercury chloride toxicity on the histological evidence of tilapia *Oreochromis niloticus*. The spleen, heart, and brain were investigated. Immature tilapia was used (27.13 ± 4.67 g and 12.44 ± 0.84 cm). The fishes ($n=102$) were exposed to three concentrations of mercury chloride (HgCl_2): $C1=0.02 \text{ mgL}^{-1}$, $C2=0.002 \text{ mgL}^{-1}$, and $C3=0.0002 \text{ mgL}^{-1}$, plus the control group. Samples were collected after 3, 7, 10 and 14 days of exposure. The center of melanomacrophages of the spleen showed hyperplasia and hypertrofia, being proportional to the tested concentrations. However, in brain and heart the alterations were not relevant when compared to those observed in the control group.

Key words: toxicology; melanomacrophages; tilapia

Artigo Científico: Recebido em 3/5/2006 - Aprovado em 10/3/2007

¹ Pós-graduanda do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP - e-mail: daniellebio2004@yahoo.com.br

² Médico Veterinário - LABVET

³ Pesquisador Científico do Instituto de Pesca

⁴ Pólo de Desenvolvimento Centro Sul - APTA / CENA

⁵ Pós-graduanda do Instituto de Pesca

⁶ Endereço/Address: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP: 14884-900, Jaboticabal, SP

* Projeto Financiado pela FAPESP - Proc. No 00/14460-3

INTRODUÇÃO

A presença de mercúrio nos ecossistemas naturais está assumindo dimensões preocupantes, principalmente em decorrência da múltipla aplicação do elemento, a qual, na maioria das vezes, vem ocorrendo de forma abusiva e indiscriminada (CASTRO, 1991).

Devido à sua toxicidade, o mercúrio pode ter efeitos deletérios sobre o ambiente, perpetuando-se na biota por ter a propriedade de se bioacumular, atingindo concentrações muitas vezes elevadas (CETESB, 1986).

Os peixes vivem em contato direto com o meio aquoso e por isso são afetados pelas alterações causadas por diferentes agentes físicos, químicos e biológicos (WATRAS *et al.*, 1998). Neste sentido, a aqüicultura no Brasil, como atividade economicamente emergente, encontra-se inteiramente dependente dos ecossistemas nos quais está inserida (VALENTI *et al.*, 2000).

Uma das possibilidades de se avaliarem as interações e efeitos de poluentes sobre a fauna aquática pode ser a realização de bioensaios (FERREIRA, 2002). Estes estudos podem ser desenvolvidos através de testes experimentais de metodologias distintas, estabelecidas de acordo com os objetivos que se procura alcançar nestas avaliações (LOMBARDI, 1999). Estes testes se constituem em experimentos rotineiramente utilizados na avaliação de alguns efeitos deletérios de agentes químicos nos organismos.

A tilápia *Oreochromis niloticus* possui grande potencial industrial e, apesar de ser espécie exótica, tem demonstrado boa adaptação às condições climáticas brasileiras. Suas características zootécnicas e a alta qualidade de sua carne fazem da tilápia um produto de grande interesse para o processamento industrial e com boa aceitação pelo mercado consumidor (OSTRENSKY *et al.*, 2000).

Segundo a EPA (Environmental Protection Agency) (1974), estudos realizados sobre o efeito do envenenamento de diferentes organismos pelo mercúrio foram indicativos de um quadro agudo. Entretanto, as alterações provocadas por este metal pesado nos tecidos e nas células são mais difíceis de serem observadas. A histopatologia relacionada ao mercúrio começou a ser estudada somente após o incidente em Minamata, no Japão, na década de 1970. Pesquisas posteriores com outros animais, à exceção do homem, levaram ao conhecimento público informações sobre a distribuição e bioacumulação do

mercúrio em diferentes órgãos internos dos organismos, bem como sobre as mudanças fisiológicas que se sucedem, por exemplo, mudanças no processo de respiração celular. Desde que os distúrbios neurológicos e renais foram observados, o sistema nervoso e os rins tornaram-se o foco de muitas pesquisas sobre toxicidade do mercúrio.

As alterações patológicas e morfológicas provocadas no baço pela toxicidade do mercúrio foram associadas com a desorganização dos cordões esplênicos, tendo como resultado o deslocamento de células linfáticas na polpa esplênica (BANO e HASAN, 1990).

Neste trabalho, os órgãos escolhidos para análise foram o baço, o coração e o encéfalo, pela escassez de estudos, principalmente histopatológicos, sendo as pesquisas desenvolvidas para verificar os efeitos deletérios do mercúrio em juvenis da tilápia *Oreochromis niloticus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 102 juvenis da tilápia *Oreochromis niloticus*, com peso médio de $27,13 \pm 4,67$ g e comprimento total médio de $12,44 \pm 0,84$ cm, provenientes de piscicultura comercial. Testes de toxicidade crônica foram realizados no laboratório do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Bacias Hidrográficas do Instituto de Pesca, em instalações climatizadas com manutenção da temperatura ambiente em 28°C e com fotoperíodo de 12 horas (L:E).

A metodologia da condução de bioensaios foi padronizada de acordo com as recomendações expressas em APHA *et al.* (1998).

O metal pesquisado, o mercúrio, foi empregado na forma de sal inorgânico, $HgCl_2$, marca Synth®, com 99% de pureza.

Após a aclimação, que teve a duração de sete dias, os peixes foram mantidos em aquários de vidro revestidos internamente com plástico e preenchidos com 40 L de água de clorada, aos quais foram adicionadas as soluções de cloreto de mercúrio nas concentrações desejadas.

Os ensaios foram realizados em aquários dispostos em três réplicas simultâneas de cada uma das três diferentes concentrações subletais e um grupo controle de cada réplica, totalizando 12 unidades. Duas concentrações foram estimadas a partir das frações 1/10 e 1/100 da Concentração Letal Média (CL_{50}) = $0,196 \text{ mgL}^{-1}$, segundo resultados de ISHIKAWA (2003). A terceira concentração teve por base o valor

estabelecido na resolução do CONAMA (2005) como limite aceitável para a preservação de comunidades aquáticas. Desta forma, as concentrações utilizadas foram $0,02 \text{ mgL}^{-1}$ (1/10); $0,002 \text{ mgL}^{-1}$ (1/100); e $0,0002 \text{ mgL}^{-1}$ (CONAMA, 2005). O teste de toxicidade crônica foi realizado a partir do sistema semi-estático e conduzido durante 14 dias, com amostragens de dois indivíduos por réplica de cada tratamento (seis amostras por concentração), nos intervalos 0, 3, 7, 10 e 14 dias.

Os animais foram anestesiados com benzocaína e sacrificados por sedação profunda, sendo então colhidos fragmentos de baço, coração e encéfalo. Estes fragmentos foram fixados em formalina a 10% (pH 7,0) por 24 horas à temperatura ambiente, posteriormente transferidos para solução de álcool etílico 70% e, a seguir, incluídos em parafina para a confecção de cortes com $3 \mu\text{m}$ de espessura, os quais foram corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE). Especificamente para o baço foram feitas lâminas adicionais coradas pelo método de Perls.

A área e o número dos Centros de Melanomacrófagos (CM) foram investigados através da análise quantitativa para estudos morfométricos adaptada por Saldiva, P.H.N.* (Comunicação pessoal em 2003) a partir da técnica de contagem de pontos de WEIBEL (1963). Escolhidos aleatoriamente, foram analisados 10 campos por lâmina/animal. Em cada campo foi verificada a presença de centros de melanomacrófagos (número) e seu tamanho (pontos coincidentes com a intersecção no interior dos quadrados). Na estatística, empregou-se a Análise de Variância TWO WAY ANOVA (ZAR, 1996) para cada concentração e tempo de exposição, seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico "Sigma-Plot".

Ao final do experimento, a água utilizada, com exceção daquela dos controles, foi armazenada e encaminhada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), em Piracicaba/SP, para reciclagem e descarte adequados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

BAÇO

Em virtude da riqueza de células fagocitárias, o baço constitui importante órgão de defesa contra microrganismos que penetram nos vasos sanguíneos, sendo também o principal órgão destruidor de eritrócitos desgastados (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os Centros de Melanomacrófagos (CM) podem ser considerados como parte integrante do sistema hematopoiético de teleostes, atuando como centros de reposição de materiais que não podem ser metabolizados ou que são requeridos para reciclagem (ROBERTS, 1975). RANZANI e FARIAS (1987) sugerem que essas estruturas sejam chamadas de macrófagos pigmentados.

No grupo controle pôde-se observar CMs distribuídos por todo o órgão e apresentando baixa celularidade (Figura 1A).

Nos animais expostos por três dias à concentração de $0,02 \text{ mg Hg/L}$, observou-se a presença de CMs distribuídos em agrupamentos próximos à polpa vermelha com leve hipertrofia (Figura 1C).

Não se sabe ao certo qual a distribuição dos centros de melanomacrófagos quanto a número, tamanho e forma. ROBERTS (1981) considerou essas células pigmentadas como fagócitos originários de monócitos circulantes e que apresentam seus graus de pigmentação variando de acordo com a espécie estudada e a idade e estado de saúde do animal. Ainda, de acordo com ROBERTS (1981), o colorido dos pigmentos varia do negro ao amarelo, estando esta variação cromática na dependência do tipo de material fagocitado, o qual poderia ser de natureza melânica, lipofuscínica, ceróide ou hemossiderínica.

Nas lâminas coradas pelo método de Perls (Figuras 1B, 1D, 1F, 1H e 1J), a maioria dos CMs apresentou coloração azul, indicando hemossiderose devido a eritrofagocitose. Observou-se ainda que apenas poucas células não se coraram de azul, indicando que essas células não fagocitaram ferro (Figura 1H) ou, ainda, que estavam em fase de divisão e não teriam fagocitado nenhuma substância. Em contrapartida, alguns centros não se coraram, embora se apresentassem hiperplásicos e hipertróficos.

Segundo TAKASHIMA e HIBIYA (1995), os melanomacrófagos apresentam essa coloração devido à hemossiderina, que é um metabólito da hemoglobina. Estudos feitos por ROTHSTEIN (1959) e PASSOW e ROTHSTEIN (1960) relatam que o mercúrio causa lise celular, fazendo com que os metabólitos das células lisadas sejam, em muitos casos, fagocitados pelos melanomacrófagos.

HIRT e DOMITROVIC (2002), testando o bicloreto de mercúrio em *Cichlasoma dimerus*, observaram aumento dos CMs com pigmentação escura nas doses mais elevadas. Segundo DATTA MUNSHI *et al.* (1990) e MEINELT *et al.* (1997), este aumento de CMs

pode estar relacionado a resposta ao estresse produzido pela exposição contínua ao mercúrio. É provável que as granulações observadas nos CMs correspondam aos produtos de degradação do mercúrio, de forma que a degradação deste metal poderia ocorrer nas inclusões fagossômicas dos macrófagos localizados nos CMs do baço, o que pode ser visualizado graças à presença de densas granulações (NIGRO, 1994). Ainda, MEINELT *et al.* (1997) sugerem em seu trabalho que a espécie *Esox lucius* seja utilizada como organismo bioindicador de locais contaminados com mercúrio, devido à correlação positiva encontrada entre o número de CMs e a concentração deste metal nos sistemas analisados.

No presente estudo foi observada expressiva hiperplasia e hipertrofia dos CMs após sete dias de exposição (Figura 1E), ocupando regiões periarteriolares e estendendo-se até a polpa branca e por todo o fragmento. Com 10 dias de exposição (Figura 1G) constatou-se o mesmo padrão de resposta verificado no tempo experimental de sete dias, indicando manutenção da resposta hiperplásica esplênica.

Ao final do experimento, após 14 dias de exposição, além da expressiva hiperplasia e hipertrofia dos CMs (Figura 1I), observou-se também a presença de lesões formadas por infiltrados mononucleares com fibroplasia periférica, dispostos concentricamente e gerando aspecto granulomatoso.

Em relação à quantidade de CMs, a análise de variância para dois fatores indica que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias quando a variável tempo (3, 7, 10 e 14 dias) foi analisada isoladamente, mas que houve diferença altamente significativa ($P < 0,001$) quando a variável concentração foi analisada. O efeito de dependência para esta variável, verificado pelo teste de Student Newman-Keuls, demonstra que esta diferença foi significativa ($P < 0,05$) conforme a concentração e/ou tempo considerado ou a interação entre estas variáveis. Isso mostra que todas as concentrações diferiram daquela do grupo controle, havendo principalmente diferença para os tempos de sete e 10 dias.

Para o tamanho dos CMs, a análise de variância indica que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias quando a variável tempo (3, 7, 10 e 14 dias) foi analisada isoladamente. Entretanto, houve diferença significativa ($P=0,004$) quando a variável concentração (Controle, C1, C2 e C3) foi analisada isoladamente. O teste de comparações múltiplas para determinar a interação entre os fatores (con-

centração e tempo), realizado pelo teste de Student Newman-Keuls, permitiu verificar que em todas as concentrações os resultados diferem daqueles do grupo controle. Com a concentração C2, o resultado foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$) em 10 dias, e com a concentração C1, em 14 dias.

CORAÇÃO

No coração dos animais do grupo controle pôde-se observar a disposição das fibras musculares estriadas cardíacas (miocárdio), a organização da serosa (pericárdio) e o revestimento interno das câmaras (endocárdio), os quais apresentaram padrão de normalidade para esse órgão. Em nenhum dos tempos experimentais foram observadas alterações relevantes nos grupos intoxicados. É provável que o maior período de exposição ao mercúrio, 14 dias, tenha sido insuficiente para que ocorressem alterações visíveis no coração, ou que as dosagens (concentrações) de mercúrio utilizadas não foram suficientes para causar danos visíveis.

Poucos estudos foram feitos sobre a ação do mercúrio em tecido cardíaco. JOHNSON e KOU-MIDES (1967), estudando o coração de uma pessoa que morreu após intoxicação por mercúrio metálico, observaram muitos focos de inflamação e necrose nas fibras do miocárdio. Trabalhos experimentais em cobaias mostram que o mercúrio ativa o sistema simpático, com elevação sérica de adrenalina, substância que atua no sistema circulatório e que tem efeitos taquicardizante, hipercinético e hipertensivo (WARKANY e HUBBARD, 1948; CHEEK *et al.*, 1959; BRYSON, 1989). Ainda, segundo CLARKSON (1972) e MCFARKANDM e REIGEL (1978), no caso de intoxicação de humanos com mercúrio, os principais órgãos afetados foram cérebro, pulmão, rim, tubo digestivo e fígado, e por continuidade, medula óssea e sistema cardiovascular.

ENCÉFALO

Os cortes histológicos do encéfalo, feitos para a análise, mostram que a parte correspondente aos cortes foi a região mesencefálica, não sendo observadas alterações histológicas em nenhum dos animais submetidos aos diferentes tratamentos e tempos experimentais, quando comparados aos cortes do encéfalo do grupo controle. Assim como ocorreu nos testes com o coração, é provável que o tempo de exposição e as concentrações de mercúrio testadas não tenham sido suficientes para causar alterações no encéfalo.

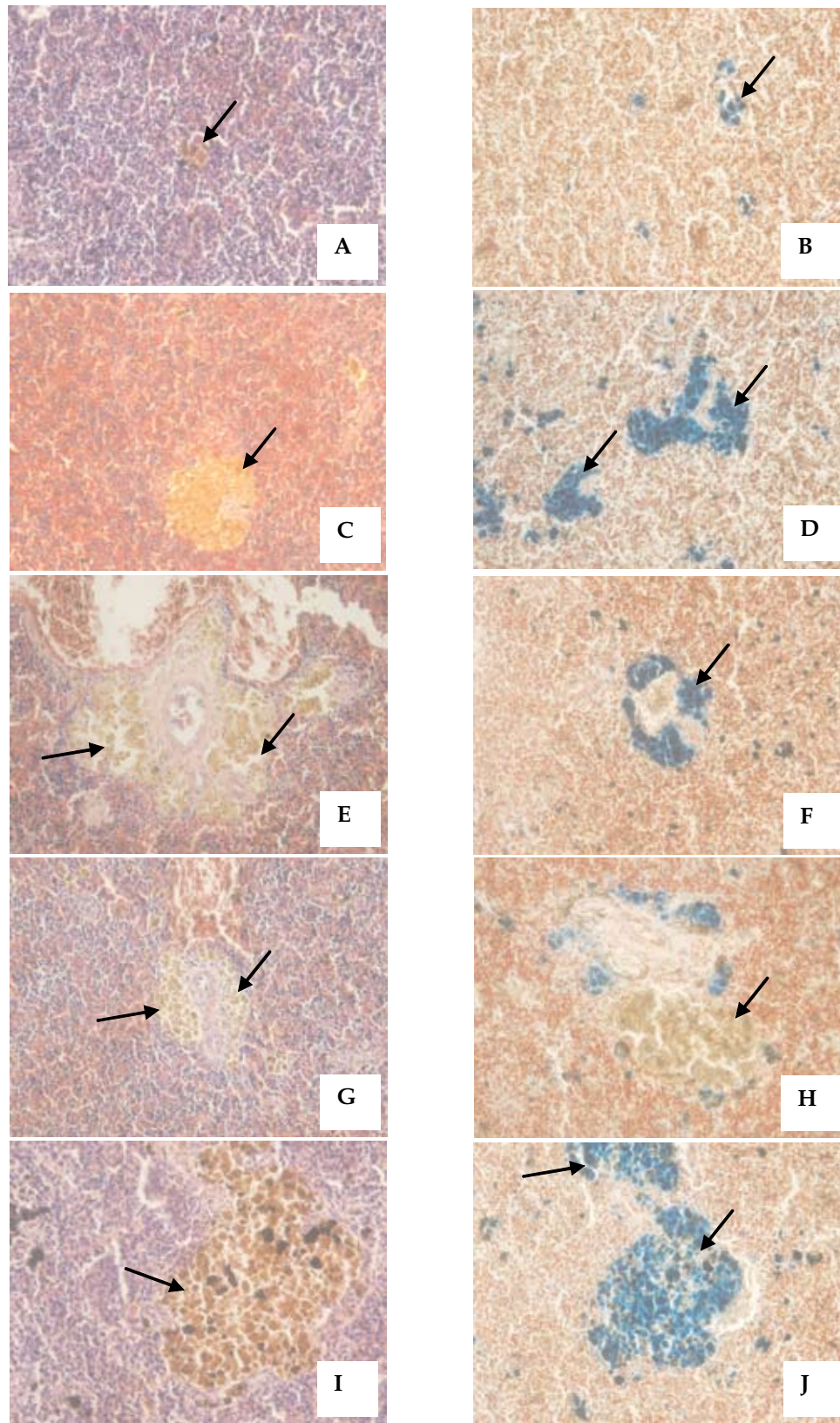


Figura 1. Fotomicrografia de baço de tilápia *Oreochromis niloticus*. Grupo Controle: (A) coloração H.E. e (B) coloração Perls. Intoxicados com 0,02 mg Hg/L por 3 dias: (C) coloração H.E. e (D) coloração de Perls. Intoxicados por 7 dias: (E) coloração H.E. e (F) coloração de Perls. Intoxicados por 10 dias: (G) coloração H.E. e (H) coloração de Perls. Intoxicados por 14 dias: (I) coloração H.E. e (J) coloração de Perls. Aumento 400X

TSAI *et al.* (1995) observaram, em tilápias *Oreochromis mossambicus* expostas ao cloreto de mercúrio, diminuição do sistema serotoninérgico e do hipotálamo de modo dose-dependente, indicando que o desenvolvimento dos sistemas serotoninérgico e hipotalâmico são também particularmente inibidos pelo mercúrio.

Segundo estudos de BERLIN e ULLBERG (1963) em humanos, no envenenamento por mercúrio inorgânico, a concentração do metal na massa cinzenta é maior que na massa branca. TOKUOMI (1969), em observações macroscópicas, verificou que houve edema de meninge nos casos de intoxicação aguda com mercúrio. Os casos crônicos mostraram atrofia do cérebro e também aumento no líquido circunvizinho. Aparentemente, esta atrofia ocorreu no lóbulo occipital e na região do calcarine. O cerebelo mostrava atrofia, e a massa cinzenta apresentava-se mais fina. HUGHES (1957) sugeriu que os compostos mercuriais realmente não inibem a função do neurônio, mas, sim, seu metabolismo.

FIMREITE e KARSTAD (1971) observaram características diferentes no encéfalo de falcões após a exposição aguda ao metilmercúrio. Esperando encontrar alterações na medula espinhal em vez de no cérebro, FIMREITE e KARSTAD (1971) observaram edema nos axônios, na bainha de mielina e nos nervos da medula espinhal. A raiz do nervo e o gânglio dorsal da raiz apresentavam-se infiltrados com neutrófilos.

TOKUOMI (1969) caracterizou as alterações histológicas causadas pelo mercúrio em três grupos. No primeiro grupo, relatou mudanças regressivas que incluíram alterações no córtex do cerebelo e na região do calcarine, as quais foram evidenciadas pela perda das células ou pela aparência esponjosa do córtex e da massa branca nos casos mais severos. No segundo grupo, evidenciou mudanças progressivas que incluíram a proliferação de células da glia, e no terceiro grupo, caracterizou distúrbios da circulação seguidos de hemorragia nas massas cinzenta e branca e edema perivascular.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

Não foram relevantes as alterações histológicas provocadas pelo mercúrio, na forma de $HgCl_2$, observadas nos fragmentos de coração e encéfalo analisados, nas concentrações e tempos amostrais testados.

No baço observou-se a ocorrência de hiperplasia e hipertrofia dos centros de melanomacrófagos de forma proporcional às concentrações testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA; AWWA; WPCF. 1998 *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17. ed. Washington, D.C.: APHA (American Public Health Association); AWWA (American Water Works Association); WPCF (Water Pollution Control Federation) (Ed.).
- BANO, Y. e HASAN, M. 1990 Histopathological lesions in the body organs of cat-fish (*Heteropneustes fossilis*) following mercury intoxication. *J. Environ. Sci. Health*, B25(1):67-85.
- BERLIN, M. e ULLBERG, S. 1963 Accumulation and retention of mercury in the mouse. *J. Environ. Sci. Health*, 6: 48-54.
- BRYSON, P.D. 1989 *Comprehensive Review in Toxicology*. 2. ed. Aspen: Rockville MD. 696p.
- CASTRO, A.C.L. 1991 *Quantificação de mercúrio total em tecido muscular do dourado (*Salminus maxillosus Valenciennes, 1849*) do Rio Mogi-Guaçu - SP*. São Carlos. 82p. (Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo).
- CETESB 1986 *Avaliação dos níveis de contaminação por mercúrio na água, sedimento e peixes na represa de Barra Bonita e seus rios formadores: Piracicaba e Tietê*. São Paulo: CETESB. 115p.
- CHEEK, D.B.; BONDY, R.K.; JOHNSON, L.R. 1959 The effect of mercurous chloride (calomel) and epinephrine (sympathetic stimulation) on rats: the importance of the findings to mechanisms in infantile acrodynia (pink disease). *Pediatrics*, Elk Grove Village, 23: 302-313.
- CLARKSON, T.W. 1972 The pharmacology of mercury compounds. *Annual Review Pharmacology*, Califórnia, 12: 375-406.
- CONAMA 2005 Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente/Conselho Nacional do Meio Ambiente. *D.O.U. Executivo*, Brasília, p.23.
- DATTA MUNSHI, J.S.; SINGH, N.K.; MISHRA, N.; OJHA, J. 1990 Cytology of macrophages in normal and mercury-treated air-breathing fish, *Channa punctata* (Bloch). *J. Fish Biol.*, London, 37: 651-653.
- EPA (Environmental Protection Agency) 1974 *A Review of the Physiological Impact of Mercurials*. Wa-

- shington D.C.: Office Research and Development. 62p. Ecological Research Series.
- FERREIRA, C.M. 2002 *Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de Rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802), como animais sentinelas*. São Paulo. 109p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
- FIMREITE, N. e KARSTAD, L. 1971 Effects of dietary methyl mercury on red-tailed hawks. *J. Wildlife Manage*, 35(2): 293-300.
- GEORGE, L.L.; ALVES, C.E.R.; CASTRO, R.R.L. 1998 *Histologia Comparada*. 2. ed. São Paulo: Roca. 298p.
- HIRT, L.M. e DOMITROVIC, H.A. 2002 Toxicidad y respuesta histopatológica en *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) expuestos a bicloruro de mercurio en ensayos agudos y subletales. *Rev. Ictiol.*, 10(1/2): 37-52.
- HUGHES, W.L. 1957 A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 65: 454-460.
- ISHIKAWA, N.M. 2003 *Toxicidade aguda e crônica do mercúrio em tilápia tailandesa, Oreochromis niloticus. Determinação da CL₅₀₋₉₆ e alterações hematológicas*. Jaboticabal. 49p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho").
- JOHNSON, E.R.M. e KOUMIDES, O. 1967 Unusual case of mercury poisoning. *British Medical Journal*, London, 1: 340-341.
- JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. 1999 *Histologia Básica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 540p.
- LOMBARDI, J.V. 1999 Toxicidade aguda de agrotóxicos para camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* de Man (Decapoda, Palaemonidae). Rio Claro. 110p. (Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho").
- MEINELT, T.; KRUGER, R.; PIETROCK, M.; OSTEN, R.; STEINBERG, A. 1997 Mercury pollution and macrophages centres in pike (*Esox lucius*) tissues. *Environmental Science and Pollution Research*, 4(1): 32-36.
- MCFARKANDM, R.B. e REIGEL, H. 1978 Chronic mercury poisoning from a single brief exposure. *Occupational Medicine*, Oxford, 20: 532-534.
- NIGRO, M. 1994 Mercury and selenium localization in macrophages of the striped dolphin *Stenella coeruleoalba*. *J. Mar. Biol.*, 74: 975-978.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; PEDINI, M. 2000 Situação atual da Aqüicultura brasileira e Mundial. In: VALENTI, C.V.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.B. (Ed.). *Aqüicultura no Brasil - Bases para um Desenvolvimento Sustentável*. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia. p.354-381.
- PASSOW, H. e ROTHSTEIN, A. 1960 The binding of mercury by yeast cell in: relation to changes in permeability. *J. General Physiology*, New York, 43: 621-633.
- RANZANI, M.J.T. e FARIAS, E.C. 1987 Localização histopatológica dos tecidos hemopoiéticos em três espécies de Characoidei. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, 24(2): 141-148.
- ROBERTS, R.S. 1975 The anatomy and physiology of teleost. In: RIBELIN, W.E. e MIGAKI, G. (Ed.). *Fish pathology*. Madison: University of Wisconsin. 238p.
- ROBERTS, R.J. 1981 *Patología de los peces*. Madri: Mundi Prensa Libros. 372p.
- ROTHSTEIN, A. 1959 Cell membrane as site of action of heavy metals *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.*, 18: 1026-1035.
- TAKASHIMA, F. e HIBIYA, T. 1995 *An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features*. 2. ed. Tokio: Kodansha Stuttgart. 213p.
- TOKUOMI, H. 1969 Medical aspects of Minamata Disease. *Rev. Intern. Oceanogr. Med.*, 13/14: 5-35.
- TSAI, C.; JANG, T.; WANG, L. 1995 Effects of mercury on serotonin concentration in the brain of tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Neuroscience Letters*, 184: 208-211.
- VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. 2000 *Aqüicultura no Brasil - Bases para um Desenvolvimento Sustentável*. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia. 399p.
- WARKANY, J. e HUBBARD, D.M. 1948 Mercury in the urine of children with acrodynia. *Lancet*, 1: 829-830.

- WATRAS, C.J.; BACK, R.C.; HALVORSEN, S.; HUDSON, R.J.M.; MORRISON, K.A.; WENTE, S.P. 1998 Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Science of the Total Environment*, 219: 183-208.
- WEIBEL, E.R. 1963 Principles and methods for morphometrical study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*, New York, 12: 131-155.
- ZAR, J.H. 1996 *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 662p.