



ARTIGO | ARTICLE

Toxicidade crônica do cloreto de mercúrio associado ao selênio, por meio do estudo hematológico em tilápia *Oreochromis niloticus*¹

Chronic mercury chloride toxicity combined with selenium, by means of the hematological study in tilapia Oreochromis niloticus

Jakeline Galvão de França²

Maria José Tavares Ranzani-Paiva³

Julio Vicente Lombardi³

Solange de Carvalho²

Robson Seriani⁴

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar se as duas formas de selênio (selenito de sódio e selenato de sódio) têm efeito antagônico à ação tóxica do cloreto de mercúrio, por meio do teste de toxicidade crônica (14 dias), utilizando-se tilápia (*Oreochromis niloticus*) como organismo teste. Os tratamentos foram realizados na seguinte ordem: I) grupo controle; II) somente mercúrio; III) somente selenito de sódio; IV) somente selenato de sódio; V) selenito de sódio + mercúrio; e VI) selenato de sódio + mercúrio. No décimo dia de coleta, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para concentração de hemoglobina corpuscular média no tratamento mercúrio + selenato de sódio. Nos peixes expostos aos tratamentos de mercúrio e mercúrio + selenato de sódio, os números de linfócitos sofreram redução ($p < 0,05$) no 3º dia de coleta. Já o número de células vermelhas imaturas aumentou no 7º dia ($p < 0,05$) no tratamento contendo somente mercúrio. Os resultados indicaram que a associação mercúrio + selenito de sódio não causou alterações nos parâmetros hematológicos, demonstrando efeito antagônico ao mercúrio, enquanto a associação mercúrio + selenato de sódio causou possível sinergismo.

Palavras-chave: Mercúrio. Selênio. Hematologia. *Oreochromis niloticus*.

¹ Artigo elaborado a partir da dissertação de J.G. FRANÇA, intitulada “Efeito do selênio sobre a toxicidade do cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) em tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757)”. Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista; 2005.

² Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, Programa de Pós-Graduação. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n., 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: J.G. FRANÇA. E-mail: <mase@pesca.sp.gov.br>.

³ Instituto de Pesca de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Estagiário, Instituto de Pesca de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

ABSTRACT

The objective of this paper was to assess if the two forms of selenium (sodium selenite and sodium selenate) have a antagonistic effect on the toxic action of mercury chloride, by means of chronic toxicity tests (14 days), using the tilapia, *Oreochromis niloticus*, as the test organism. The test consisted of three simultaneous replications of the treatments: I) control group; II) only mercury; III) only sodium selenite; IV) only sodium selenate; V) sodium selenite + mercury and VI) sodium selenate + mercury. On the tenth day of collection, a significant difference ($p < 0.05$) was found for the mean corpuscular hemoglobin concentration in the mercury + sodium selenate treatment. By the third day, the number of lymphocytes, in fish exposed to the mercury and mercury + sodium selenate treatments, had reduced ($p < 0.05$). The number of immature red cells increased by the seventh day ($p < 0.05$) in the treatment with mercury only. These results indicated that the combination of mercury + sodium selenite did not cause changes to the hematological parameters, demonstrating the antagonistic effects to mercury, while the combination of mercury + sodium selenate caused synergism.

Key words: Mercury. Selenium. Hematology. *Oreochromis niloticus*.

INTRODUÇÃO

A contaminação de águas por metais pesados vem recebendo grande atenção por parte dos ambientalistas, no que diz respeito à sua toxicidade em relação ao meio aquático e à vida humana (Torem & Casqueira, 2003). Devido ao crescimento populacional e à intensificação de atividades humanas que envolvem estes elementos, a concentração de metais pesados tem aumentado de forma generalizada nos corpos d'água, em níveis que ameaçam não somente a biota aquática, mas também os organismos terrestres, incluindo o homem (Peález-Rodríguez et al., 2002).

O mercúrio é um dos elementos tóxicos que está amplamente distribuído no ambiente, principalmente como consequência da atividade humana. De acordo com Dietz et al. (2000), os resultados mais relevantes do envenenamento por mercúrio em animais são os efeitos adversos sobre a reprodução, dano neurológico, bem como em órgãos e tecidos. O mercúrio também tem potente efeito citotóxico sobre os tipos específicos de células, incluindo aquelas do sistema imune, sendo capaz de induzir imunossupressão em muitas espécies de animais (Tchounwou et al., 2003).

Alguns metais são componentes naturais dos organismos, sendo a maioria encontrada em

concentrações traço. Estes elementos podem ser classificados como essenciais e não-essenciais, devido a alguns deles possuírem funções biológicas conhecidas (Ferreira et al., 2002).

O selênio é um micronutriente essencial em animais e que desempenha papel importante nos sistemas biológicos. De acordo com Hamilton (2004), pequenas quantidades de selênio são necessárias para o crescimento e desenvolvimento normal dos organismos; concentrações moderadas podem ser estocadas e utilizadas na manutenção das funções homeostáticas e, em quantidades elevadas, podem resultar em efeitos tóxicos. Além disso, o selênio é capaz de interagir com vários elementos, dentre eles o mercúrio, e estas interações podem ser antagônicas ou não.

Devido à forte suposição a respeito da ação antagônica do selênio sobre o efeito tóxico do mercúrio, vários estudos têm sido realizados (Storelli et al., 1998; Heinz & Hoffman, 1998; Southworth et al., 2000), porém, os mecanismos de interação entre mercúrio e selênio são extremamente complexos e ainda pobremente entendidos (Pedersen et al., 1998).

Para avaliar as alterações provocadas nos peixes pela contaminação ambiental, frequentemente são realizados estudos com sangue dos

animais expostos aos contaminantes, em doses sub-letais. O estudo do sangue facilita a detecção de alterações patológicas no organismo e ajuda a identificar a extensão e a natureza dos desvios das condições normais (Oliveira-Ribeiro et al., 2000).

Portanto, este estudo teve como objetivo analisar, por meio de teste de toxicidade crônica, as alterações hematológicas provocadas pela associação do mercúrio ao selenito de sódio ($\text{NaSe}^{4+}\text{O}_3$) e ao selenato de sódio ($\text{NaSe}^{6+}\text{O}_3$), e se estas têm efeito antagônico ou minimizam a toxicidade do cloreto de mercúrio (HgCl_2) para a tilápia (*Oreochromis niloticus*).

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia para condução dos ensaios foi padronizada de acordo com as recomendações expressas por *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA) American Public Health Association (1998).

O experimento foi realizado no laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Instituto de Pesca (SP) em ambiente climatizado (fotoperíodo 10L: 14E e temperatura média de 25°C).

Foram utilizadas tilápias (*Oreochromis niloticus*), adquiridas de uma piscicultura comercial, com peso médio de 32,04, desvio-padrão - DP=5,35g e comprimento médio de 10,27, DP=1,39cm. No início do experimento, e a cada 24 horas, foram aferidos: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica da água. As análises da alcalinidade, dureza e amônia não ionizada foram realizadas apenas no final de 14 dias.

Ao chegarem ao laboratório, os peixes foram colocados em tanques com água dechlorada, com capacidade de 250L, e aclimatados por sete dias antes do início do experimento. Ao final do período de aclimação, os peixes foram transferidos para aquários contendo 40L de solução-teste e providos de aeração artificial. Os aquários foram dispostos em três repetições, contendo cinco tratamentos diferentes (com concentração sub-letal de Hg e concentração de Se) e o grupo controle, totalizando 18 aquários.

As concentrações de selenito de sódio e selenato de sódio usadas foram definidas a partir dos resultados observados por Gonçalves (2004), sendo consideradas concentrações de efeito não observado (CENO). Já a concentração de mercúrio foi estabelecida a partir dos resultados de Ishikawa (2003), por meio do teste de toxicidade crônica em tilápia (*Oreochromis niloticus*). As concentrações testadas neste estudo foram: 0,08mgHg. L⁻¹; 0,4mgSe⁴⁺. L⁻¹ e 1,4mg Se⁶⁺. L⁻¹.

Os tratamentos foram realizados na seguinte ordem: I) controle; II) somente mercúrio (Hg); III) somente selenito (Se⁴⁺); IV) somente selenato (Se⁶⁺); V) selenito + mercúrio (Se⁴⁺+Hg); e VI) selenato + mercúrio (Se⁶⁺+Hg). No início do experimento, coletou-se sangue de seis indivíduos antes da distribuição dos peixes nos aquários, sendo este denominado como momento zero. O experimento foi conduzido durante 14 dias, na densidade de 16 peixes por aquário, com amostragem de dois indivíduos por tratamento, de cada repetição, totalizando seis indivíduos (réplicas) por tratamento, nos intervalos de 0, 3, 7, 10 e 14 dias. Nos períodos de coleta, os peixes eram alimentados diariamente *ad libitum* com ração extrusada, com 30% de proteína bruta, seguido de sifonagem do excedente e de excretas, e com substituição de um terço da água por uma solução previamente preparada e de mesma concentração.

Para as análises hematológicas, os peixes foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína, e o sangue foi coletado por punção caudal, com auxílio de seringas heparinizadas. Após a retirada do sangue, os peixes foram sacrificados e descartados.

Com as amostras de sangue foram determinados: número de eritrócitos (Er), contados em câmara de Neubauer, e utilizando-se o diluente de Hayen; hematócrito (Ht), pela técnica de microhematócrito; taxa de hemoglobina (Hb), pelo método de cianometahemoglobina; e foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média

(CHCM). A contagem diferencial e total dos leucócitos e a contagem total de trombócitos foram feitas em extensões sangüíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo Rosenfeld (1947).

Os dados obtidos, após a análise de normalidade e homogeneidade, foram submetidos ao teste estatístico "ANOVA", do tipo unifatorial, e ao teste Tukey. Para comparar a diferença entre as médias dos tratamentos, utilizou-se o pacote estatístico TOXSTAT 3.3 (Gulley et al., 1991). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios das variáveis físicas e químicas da água durante o período de bioensaio estão descritos nas Tabelas 1 e 2. De acordo com a análise estatística, não houve diferença entre os tratamentos para as variáveis descritas na Tabela 1 ($p > 0,05$). Portanto, a qualidade da água dos trata-

mentos não apresentou alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos, estando todas elas dentro dos níveis ideais recomendados por Boyd (1982) para a manutenção de peixes em sistemas de cultivo. Assim, as variações no quadro hematológico observadas neste trabalho são decorrentes apenas da presença do mercúrio e do selênio nos tratamentos.

Os valores médios de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, VCM e HCM não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos testados (Tabela 3). A média de CHCM dos peixes mantidos na concentração mercúrio + selenato de sódio apresentou redução significativa ($p < 0,05$) em relação aos peixes do grupo controle apenas no décimo dia de coleta (Tabela 3). Isto pode indicar que a concentração de hemoglobina dentro dos eritrócitos permaneceu a mesma, a despeito de essas células apresentarem alteração em seu tamanho, talvez em consequência da dificuldade respiratória causada por este tratamento. Além disso, nos últimos dias de

Tabela 1. Valores médios (M) e desvio-padrão (DP) das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao Hg e ao Se.

Tratamento (mg.L ⁻¹)	pH		Condutividade elétrica (µScm ⁻¹)		Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)		Oxigênio dissolvido (% saturação)		Temperatura (°C)	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Controle	7,63	0,38	148,97	42,46	6,52	0,91	85,00	10,30	24,02	1,32
Hg	7,80	0,25	136,56	37,30	6,36	1,03	83,00	11,85	23,72	1,31
Se ⁴⁺	7,77	0,23	143,55	43,55	6,15	0,82	80,00	9,33	23,78	1,34
Se ⁶⁺	7,83	0,00	150,00	45,60	6,40	0,90	83,00	10,00	23,60	0,90
Hg + Se ⁴⁺	7,85	0,20	141,40	36,50	6,50	1,00	85,00	8,05	23,90	0,90
Hg + Se ⁶⁺	7,76	0,00	130,30	36,59	6,40	0,80	83,00	9,10	23,80	0,90

Hg: mercúrio; Se⁴⁺: selenito de sódio; Se⁶⁺: selenato de sódio; $p > 0,05$ = não significativo.

Tabela 2. Valores das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao Hg e ao Se. Valores referentes ao último dia de coleta.

Tratamento (mg.L ⁻¹)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	Dureza total (mg CaCO ₃ /L)	Amônia não-ionizada (mg.L ⁻¹)
Controle	21,80	21,12	0,034
Hg	22,30	22,52	0,034
Se ⁴⁺	23,78	21,11	0,035
Se ⁶⁺	23,84	21,11	0,034
Hg + Se ⁴⁺	22,37	23,21	0,032
Hg + Se ⁶⁺	21,65	21,11	0,035

Hg: mercúrio; Se⁴⁺: selenito de sódio; Se⁶⁺: selenato de sódio; $p > 0,05$ = não significativo.

experimento, os peixes do tratamento Hg+Se⁶⁺ apresentaram aumento de CHCM, da taxa de hemoglobina e também do número de eritrócitos, como possível mecanismo para aumentar o carreamento de oxigênio (Affonso et al., 2002).

A presença de mercúrio na água pode causar redução no número de linfócitos, como registrado em outras espécies de peixes (Mikryakov & Lapirova, 1997; Kotsanis et al., 2000; Shah & Altindaú, 2005). Nos peixes dos tratamentos de Hg e Hg+Se⁶⁺, o número de linfócitos sofreu redução significativa ($p < 0,05$) logo no 3º dia de coleta (Tabela 3).

Entretanto, os peixes do tratamento de Hg+Se⁶⁺ apresentaram aumento considerável no número de neutrófilos (2.889,69, erro-padrão - EP=1.248,40Nt/ μ L) e monócitos (922,16, EP=504,58Mn/ μ L), também no 3º dia de coleta, embora não tenha ocorrido diferença significativa em relação ao grupo controle (1.556,72, EP=829,75Nt/ μ L; 556,11, EP=314,07Mn/ μ L). Dick & Dixon (1985), Ruparelia et al. (1990) e Mikryakov & Lapirova (1997) observaram linfopenia, seguida de neutrofilia, após exposição crônica a metais pesados, indicando estimulação do sistema imune em resposta à ação tóxica do tratamento, corroborando com os resultados do presente estudo.

Tabela 3. Valores médios (M) e erro-padrão (EP) das médias dos parâmetros sanguíneos no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao Hg e ao Se.

Tratamentos	Er (10 ⁶ / μ L)		Ht (%)		Hb (g/dL)		VCM (fL)		HCM (pg)		CHCM (%)	
	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP
<i>3º dia</i>												
Controle	1,61 ^a	0,02	26,30 ^a	1,13	8,30 ^a	0,47	161,50 ^a	8,87	52,30 ^a	2,14	32,70 ^a	1,62
Hg	1,49 ^a	0,01	24,20 ^a	1,09	7,80 ^a	0,29	161,80 ^a	5,76	52,50 ^a	1,94	32,50 ^a	0,76
Se ⁴⁺	1,69 ^a	0,02	25,50 ^a	1,86	8,30 ^a	0,67	151,70 ^a	5,07	48,70 ^a	2,36	33,70 ^a	4,17
Se ⁶⁺	1,73 ^a	0,04	25,70 ^a	0,95	7,50 ^a	0,34	147,50 ^a	4,73	44,70 ^a	1,70	30,00 ^a	0,11
Hg + Se ⁴⁺	1,75 ^a	0,01	28,80 ^a	1,79	7,70 ^a	0,65	163,30 ^a	10,20	45,00 ^a	2,60	28,80 ^a	2,20
Hg + Se ⁶⁺	1,36 ^a	0,02	26,00 ^a	2,43	7,20 ^a	0,85	160,30 ^a	5,40	52,20 ^a	2,71	29,30 ^a	1,21
<i>7º dia</i>												
Controle	1,87 ^a	0,02	26,50 ^a	1,72	8,00 ^a	0,39	142,20 ^a	9,33	43,50 ^a	2,29	30,70 ^a	1,31
Hg	1,71 ^a	0,04	25,80 ^a	2,42	8,50 ^a	2,91	152,80 ^a	7,33	50,00 ^a	1,06	33,20 ^a	1,41
Se ⁴⁺	1,80 ^a	0,01	30,70 ^a	1,42	10,30 ^a	0,58	169,50 ^a	8,69	57,00 ^a	3,38	33,70 ^a	0,97
Se ⁶⁺	1,83 ^a	0,01	31,30 ^a	2,06	9,80 ^a	0,65	169,00 ^a	6,12	54,00 ^a	1,77	31,80 ^a	0,75
Hg + Se ⁴⁺	1,78 ^a	0,01	28,80 ^a	1,47	8,30 ^a	0,36	161,00 ^a	9,05	48,20 ^a	1,52	30,30 ^a	1,50
Hg + Se ⁶⁺	1,82 ^a	0,02	28,00 ^a	1,45	8,80 ^a	0,56	155,30 ^a	10,13	49,00 ^a	3,52	31,50 ^a	0,63
<i>10º dia</i>												
Controle	2,02 ^a	0,02	30,70 ^a	1,10	9,80 ^a	0,28	151,50 ^a	4,80	48,50 ^a	0,66	33,00 ^a	0,82
Hg	2,08 ^a	0,03	29,20 ^a	0,06	9,30 ^a	1,43	140,50 ^a	2,70	45,00 ^a	1,02	32,20 ^a	0,54
Se ⁴⁺	1,94 ^a	0,01	28,00 ^a	1,53	9,20 ^a	0,38	143,70 ^a	7,55	47,30 ^a	2,61	31,00 ^a	0,78
Se ⁶⁺	1,65 ^a	0,01	25,80 ^a	0,30	7,70 ^a	0,41	159,30 ^a	12,17	47,20 ^a	2,75	29,70 ^{ab}	1,08
Hg + Se ⁴⁺	1,83 ^a	0,02	28,30 ^a	1,97	8,30 ^a	0,65	158,70 ^a	16,97	46,50 ^a	4,23	29,30 ^{ab}	1,23
Hg + Se ⁶⁺	1,85 ^a	0,04	29,70 ^a	2,41	7,80 ^a	0,70	170,20 ^a	21,65	45,70 ^a	5,12	27,20 ^b	0,96
<i>14º dia</i>												
Controle	1,90 ^a	0,01	30,00 ^a	1,55	7,80 ^a	1,30	156,00 ^a	5,90	42,00 ^a	1,44	27,00 ^a	0,80
Hg	1,88 ^a	0,03	29,80 ^a	1,45	8,00 ^a	1,57	161,00 ^a	10,10	42,70 ^a	2,22	26,70 ^a	0,57
Se ⁴⁺	1,98 ^a	0,01	29,20 ^a	1,38	8,00 ^a	0,34	147,70 ^a	6,06	41,30 ^a	1,24	28,20 ^a	1,09
Se ⁶⁺	1,98 ^a	0,02	27,50 ^a	0,84	7,70 ^a	0,39	140,00 ^a	6,47	40,20 ^a	2,87	28,30 ^a	0,92
Hg + Se ⁴⁺	1,84 ^a	0,02	26,80 ^a	0,89	7,80 ^a	0,35	146,50 ^a	6,41	43,30 ^a	1,18	29,50 ^a	0,81
Hg + Se ⁶⁺	1,91 ^a	0,03	28,80 ^a	1,43	8,70 ^a	1,81	151,80 ^a	6,31	44,80 ^a	1,51	29,50 ^a	0,56

^{a,b}: médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); Er: eritrócitos; Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Hg: mercúrio; Se⁴⁺: selênio de sódio; Se⁶⁺: selenato de sódio.

Porém, estas alterações na quantidade de leucócitos foram observadas apenas no início da exposição (3º dia de coleta), sendo que, após este período, estas células retornaram para valores próximos ao do controle (Tabela 4), como processo de retorno para as condições fisiológicas normais (Nussey et al., 1995).

Em todos os peixes dos tratamentos testados, os valores médios de neutrófilos e monócitos não apresentaram alterações significativas, porém, altos valores destas células foram observados nos peixes do tratamento Se⁴⁺ e Se⁶⁺, no 7º dia de coleta (Tabela 4).

As concentrações de selenito de sódio e selenato de sódio utilizadas no presente trabalho são consideradas concentrações de efeito não observado (CENO) em estudos realizados por Gonçalves (2004) em *Oreochromis niloticus*. Portanto, a tendência à neutrofilia e monocitose observada nestas soluções, provavelmente, pode ser atribuída à reação de estresse causada por estes tratamentos, e não à ação tóxica dos metais. De acordo com Coffigny et al. (2004), o breve aumento do número de leucócitos, em especial os neutrófilos, pode ser resultado de uma síndrome de estresse, e não dos efeitos leucotóxicos destes tratamentos nos peixes. Pode-se

Tabela 4. Valores médios (M) e erro-padrão (EP) das médias da contagem diferencial e total de células sanguíneas no teste de toxicidade crônica em *Oreochromis niloticus* expostas ao Hg e ao Se.

Tratamentos	Lc (μL)		Lf (μL)		Nt (μL)		Mn (μL)		Tr (μL)		Cel. imat. (μL)	
	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP	M	EP
<i>3º dia</i>												
Controle	32134,99 ^a	12253,31	30022,15 ^a	2014,12	1556,72 ^a	829,75	556,11 ^a	314,07	17308,59 ^a	558,08	1819,17 ^a	303,21
Hg	20315,27 ^b	7309,88	18708,54 ^b	6409,11	1061,20 ^a	755,78	545,52 ^a	154,04	19593,42 ^a	2403,94	1685,55 ^a	823,61
Se ⁴⁺	25806,81 ^a	7148,68	23479,92 ^a	6809,99	1658,58 ^a	600,07	668,29 ^a	420,63	14377,98 ^a	772,63	1148,34 ^a	663,78
Se ⁶⁺	33636,49 ^a	3875,49	31834,89 ^a	3856,79	1469,04 ^a	506,01	332,50 ^a	189,71	11660,56 ^a	514,73	1357,58 ^a	904,94
Hg + Se ⁴⁺	29273,85 ^a	4116,39	27637,89 ^a	3769,16	1279,57 ^a	528,36	528,15 ^a	176,83	19108,22 ^a	1070,64	1058,50 ^a	865,29
Hg + Se ⁶⁺	21010,64 ^b	8628,61	17798,79 ^b	8396,93	2289,69 ^a	1248,40	922,16 ^a	504,58	14968,00 ^a	500,44		
<i>7º dia</i>												
Controle	28251,49 ^a	5639,99	26849,193 ^a	5419,79	835,84 ^a	136,29	566,46 ^a	85,25	13544,42 ^a	4816,79	490,89 ^a	90,75
Hg	24547,70 ^a	3570,20	23095,79 ^a	3543,09	930,91 ^a	131,82	520,99 ^a	33,03	15834,28 ^a	4396,04	8146,48 ^b	890,48
Se ⁴⁺	24878,05 ^a	3072,02	22645,85 ^a	3963,80	1237,97 ^a	568,77	994,22 ^a	375,86	18211,60 ^a	4002,06	676,33 ^a	377,13
Se ⁶⁺	27675,89 ^a	7128,04	25523,24 ^a	7547,29	1201,97 ^a	435,00	950,68 ^a	234,54	16388,73 ^a	4517,89	618,44 ^a	359,52
Hg + Se ⁴⁺	25867,80 ^a	5347,60	24379,94 ^a	6028,15	845,51 ^a	377,47	642,33 ^a	366,82	13180,70 ^a	3182,87	861,11 ^a	350,89
Hg + Se ⁶⁺	28893,88 ^a	1694,15	27774,92 ^a	1796,01	518,83 ^a	16,20	600,12 ^a	121,18	16778,31 ^a	5904,77	1024,63 ^a	225,84
<i>10º dia</i>												
Controle	34643,01 ^a	4620,59	33206,14 ^a	4031,44	865,42 ^a	360,18	571,45 ^a	231,00	27891,51 ^a	2928,65	1010,04 ^a	480,97
Hg	36788,55 ^a	12901,45	34465,83 ^a	11793,88	1078,92 ^a	562,3	882,06 ^a	393,56	23840,79 ^a	1306,43	1449,55 ^a	218,49
Se ⁴⁺	35713,47 ^a	5908,40	34202,46 ^a	5812,01	986,40 ^a	322,89	524,60 ^a	249,62	28229,32 ^a	1465,39	1315,97 ^a	342,70
Se ⁶⁺	32813,95 ^a	4996,30	31344,05 ^a	4729,28	654,12 ^a	411,36	615,76 ^a	125,65	31570,39 ^a	5408,79	1313,80 ^a	151,18
Hg + Se ⁴⁺	36529,29 ^a	3538,17	35442,60 ^a	3358,46	626,28 ^a	220,41	460,40 ^a	148,90	27192,68 ^a	2951,57	1832,46 ^a	174,03
Hg + Se ⁶⁺	36488,69 ^a	2319,10	34735,91 ^a	2091,95	1079,08 ^a	201,95	915,45 ^a	85,42	50984,44 ^a	10517,08		
<i>14º dia</i>												
Controle	30797,07 ^a	3885,93	29634,18 ^a	3635,80	837,69 ^a	350,74	325,20 ^a	78,45	27776,38 ^a	1473,61	1780,81 ^a	66,01
Hg	26924,31 ^a	2989,39	25560,48 ^a	2596,93	935,22 ^a	271,65	428,60 ^a	350,91	23196,60 ^a	3313,78	1155,99 ^a	859,49
Se ⁴⁺	29907,31 ^a	1550,76	28542,81 ^a	1024,41	808,04 ^a	323,09	556,45 ^a	229,91	25230,80 ^a	1029,02	1267,05 ^a	204,15
Se ⁶⁺	30919,57 ^a	4681,06	29813,56 ^a	4792,04	695,05 ^a	43,38	410,94 ^a	221,48	23564,45 ^a	2721,78	-	
Hg + Se ⁴⁺	30749,31 ^a	997,40	29586,27 ^a	945,20	795,76 ^a	164,39	367,28 ^a	180,73	24287,50 ^a	2143,06	2095,38 ^a	1095,13
Hg + Se ⁶⁺	33470,20 ^a	1691,24	32440,12 ^a	1725,22	635,56 ^a	125,36	394,51 ^a	137,89	21923,61 ^a	8885,68		

^a^b: médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); Lf: linfócitos; Nt: neutrófilos; Mn: monócitos; Lc: leucócitos; Tr: trombócitos; Cel. Imat.: células vermelhas imaturas; Hg: mercúrio; Se⁴⁺: selenito de sódio; Se⁶⁺: selenato de sódio.

afirmar que o mesmo tenha acontecido no presente estudo, já que os altos números destas células foram observados apenas no 7º dia de coleta, e logo retornaram aos valores próximos do tratamento controle (Tabela 4).

Eosinófilos e basófilos são encontrados com menor frequência no sangue de peixes. Neste estudo, foram observados eosinófilos em duas amostras do tratamento controle, e basófilos apenas em duas amostras dos peixes do tratamento contendo somente selenito de sódio. Segundo Ranzani-Paiva (1995), o relato esporádico de um tipo ou outro de leucócito pode ser atribuído à pequena porcentagem dessas células, podendo muitas vezes passar despercebido.

Os trombócitos apresentaram poucas variações no sangue periférico dos peixes em todos os tratamentos testados, mas, pela Tabela 4, verificou-se no 10º dia de coleta grande número desta célula no tratamento de Hg+Se⁶⁺ (50.984,44, EP=10.517,08Tr/ μ L), com queda no final do experimento (21.923,61, EP=8.885,68Tr/ μ L), sem que tenha ocorrido mudança significativa.

A exposição sub-letal a metais pesados pode causar aumento no número de trombócitos em peixes, e este fato pode estar relacionado ao dano causado pelo metal nos órgãos e tecidos (Shah & Altindaú, 2005), tais como brânquias, fígado e rim (Pandey et al., 1996). Embora não tenha apresentado diferença significativa, o alto número de trombócitos observado nos peixes expostos à concentração de Hg+Se⁶⁺ pode caracterizar toxicidade causada por este tratamento, sugerindo sinergismo provocado pela interação destes dois elementos. Mazon et al. (2002) não observaram mudança significativa na porcentagem de trombócitos após exposição ao cobre em *Prochilodus scrofa*, porém, foram identificados focos de hemorragia, devido à ruptura de vasos na lamela branquial dos peixes expostos a 29 μ gCu. L⁻¹.

Os peixes do tratamento contendo somente mercúrio apresentaram grande número de células vermelhas imaturas (8.146,48, EP=890,48Cel/ μ L), no 7º dia de coleta (Tabela 4), apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo controle

(490,89, EP=90,75Cel/ μ L). Isto pode indicar aumento na intensidade de hemopoiese, provavelmente estimulado pela hemólise das células causada pelo metal, como refletido na redução do número de eritrócitos observada no início do ensaio. Da mesma maneira, Storozhuk & Guleva (1983) também notaram aumento de células imaturas em *Oncorhynchus kisutch* após exposição ao mercúrio.

Diante dos resultados observados, pode-se dizer que o selenito de sódio apresentou efeito antagônico ao mercúrio, uma vez que, ao longo do período de exposição, não houve alterações significativas em todos os parâmetros sanguíneos analisados. No entanto, o tratamento de Hg+Se⁶⁺, ao contrário do esperado, foi prejudicial, causando possível sinergismo. Segundo Cuvin & Furness (1991), a interação de mercúrio e selênio normalmente se dá por antagonismo, porém, sinergismo também tem sido registrado. É difícil explicar, ao certo, porque o tratamento de Hg+Se⁶⁺ apresentou sinergismo, enquanto o tratamento de Hg+Se⁴⁺ não causou, em momento algum, variações consideráveis nos parâmetros analisados.

Em estudos preliminares realizados por Cuvin & Furness (1988), mostrou-se que o selênio, tanto na forma de selenito de sódio quanto de selenato de sódio, apresentou resultados idênticos. Porém, estes mesmos autores observaram que a sobrevivência de *Phoxinus phoxinus* foi reduzida quando o selênio esteve presente a concentrações duas vezes maiores que o mercúrio, indicando que o selênio também tem efeito tóxico. No presente estudo, a concentração de selenato de sódio utilizada foi maior (1,4mgSe⁶⁺/L) que a de selenito de sódio (0,4mgSe⁴⁺/L) e, provavelmente, isto pode ter sido um dos fatores que causou o sinergismo, já que, para o selênio, a diferença entre toxicidade e essencialidade pode ocorrer em um intervalo estreito de concentração (Lemly, 1993).

Portanto, na associação Hg+Se⁶⁺ foi possível visualizar o efeito sinérgico entre os dois elementos. Mais estudos devem ser realizados no sentido de se testar maiores concentrações do selênio em forma de selenito de sódio, ou utilizando-se outros biomarcadores mais sensíveis.

Além disso, muitas são as limitações e deficiências da pesquisa com relação ao entendimento do antagonismo e sinergismo de metais. Apesar dos numerosos estudos, ainda pouco se conhece sobre a interação destes em organismos aquáticos.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Processo 00/14460-3).

REFERÊNCIAS

- Affonso, E.G.; Polez, V.L.P.; Corrêa, C.F.; Mazon, A.F.; Araújo, M.R.R.; Moraes, G. & Rantin, F.T. (2002). Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hipoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 133(3):375-82.
- American Public Health Association. (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Washington, D.C.
- Boyd, C.E. (1982). *Water quality management for pond fish culture*. Amsterdam: Elsevier.
- Coffigny, R.S.; Trujillo, A.P. & Valle, F.A. (2004). Effects of different stressors in the haematological variables in the cultured *Oreochromis aureus* S. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 139(4):245-50.
- Cuvin, M.L.A. & Furness, R.W. (1988). Uptake and elimination of inorganic mercury and selenium by minnows *Phoxinus phoxinus*. *Aquatic Toxicology*, 13(3):205-15.
- Cuvin, M.L.A. & Furness, R.W. (1991). Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21(3):348-64.
- Dick, P.T. & Dixon, D.G. (1985). Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *Journal of Fish Biology*, 26(4):475-81.
- Dietz, R.; Riget, F. & Born, E. W. (2000). An assessment of selenium to mercury in Greenland marine animals. *Science of the Total Environment*, 245(1-3):15-24.
- Ferreira, A.G.; Machado, A.L.S. & Zalmon, I.R. (2002). Metais pesados em moluscos bivalves no Litoral Norte do Estado do Rio de Janeiro. In: Espíndola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Boher, M.B.C. & Oliveira-Neto, A.L. (Ed.). *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. São Carlos: RiMa. p.167-82.
- Gonçalves, A. (2004). *Concentração Letal CL50-96h e efeitos sub-letais do selenito de sódio (Na₂SeO₃) em tilápia do nilo, Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1757): alterações hematológicas e histopatológicas*. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista.
- Gulley, D.D; Boelter, A.M. & Bergman, H.L. (1991). *Toxstat 3.3.: Fish Physiology and Toxicology Laboratory*. Laramie, W.Y.: University of Wyoming, Department of Zoology and Physiology.
- Hamilton, S.J. (2004). Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment*, 326(1-3):1-31.
- Heinz, G.H. & Hoffman, D.J. (1998). Methylmercury chloride and selenomethionine interactions on health and reproduction in mallards. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(2):139-45.
- Ishikawa, N.M. (2003). *Toxicidade aguda e crônica do mercúrio em tilápia "Tailandesa", Oreochromis niloticus. Determinação da CL50-96h e alterações hematológicas*. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista.
- Kotsanis, N.; Georgudaki, J.L. & Zoumbos, K.K. (2000). Changes in selected hematological parameters at early stages of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, subjected to metal toxicants: arsenic, cadmium and mercury. *Journal Applied Ichthyology*, 16(6):276-8.
- Lemly, A.D. (1993). Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish. *Aquatic Toxicology*, 27(1-2):133-58.
- Mazon, A.F.; Monteiro, E.A.S.; Pinheiro, G.H.D. & Fernandes, M.N. (2002). Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4A):621-31.
- Mikryakov, V.R. & Lapirova, T.B. (1997). Influence of salts of some heavy metals on the differential blood count in juvenile *Acipenser baeri*. *Journal of Ichthyology*, 37(6):458-62.
- Nussey, G.; Van-Vuren, J.H.J. & Du-Preez, H.H. (1995). Effect of copper on the differential white blood cell counts of the Mozambique tilápia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 111(3):381-8.
- Oliveira-Ribeiro, C.A.; Pelletier, E.; Pfeiffer, W.C. & Rouleau. (2000). Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and Nordic freshwater fish. *Environmental Research*, 83(A):286-92.
- Pandey, A.K.; George, K.C. & Mohamed, M.P. (1996). Histopathological changes induced in gill of in estuarine mullet, *Liza parsia*, by sublethal exposure to mercuric chloride. *Indian Journal of Fisheries*, 43(3):285-91.

- Peález-Rodríguez, M.; Peret, A.M.; Matsumura-Tundisi, T. & Rocha, O. (2002). Análise da qualidade da água e aplicação do índice de proteção da vida aquática (IVA) em duas sub-bacias da bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu. In: Espindola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Boher, M.B.C. & Oliveira-Neto, A.L. (Ed.). *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. São Carlos: RiMa. p.95-114.
- Pedersen, T.V.; Block, M. & Pärt, P. (1998). Effect of the selenium on the uptake of methyl mercury across perfused gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 40(4):361-73.
- Ranzani-Paiva, M.J.T. (1995). Células sanguíneas e contagem diferencial dos leucócitos de tainha, *Mugil paltanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP (Lat 25° 00 'S - Long 47° 55'W). *Boletim do Instituto de Pesca*, 22(1):23-40.
- Rosenfeld, G. (1947). Corante pancrômico para a hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, 20(1):329-34.
- Ruparelia, S.G.; Verma, Y.; Saiyed, S.R. & Rawal, U.M. (1990). Effect of cadmium on blood of tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters) during prolonged exposure. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 45(2):305-12.
- Shah, S.L. & Altindaú, A. (2005). Alterations in the immunological parameters of Tench (*Tinca tinca* L. 1758) after acute and chronic exposure to lethal and sublethal treatments with mercury, cadmium and lead. *Turkish Journal Veterinary Animal Sciences*, 29(5):1163-8.
- Southworth, G.R.; Peterson, M.J. & Ryon, M.G. (2000). Long-term increased bioaccumulation of mercury in largemouth bass follows reduction of waterborne selenium. *Chemosphere*, 41(7):1101-5.
- Storelli, M.M.; Ceci, E. & Marcotrigiano, G.O. (1998). Comparison of total mercury, methylmercury, and selenium in muscle tissues and in the liver of *Stenella coeruleoalba* (Meyen) and *Caretta caretta* (Linnaeus). *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 61(4):541-7.
- Storozhuk, N.G. & Guleva, I.B. (1983). Qualitative composition and morphology of blood cells of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Salmonidae), as influenced by mercury. *Journal of Ichthyology*, 23(5): 128-37.
- Tchounwou, P.B.; Ayensu, W.K.; Ninashvili, N. & Sutton, D. (2003). Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environmental Toxicology*, 18(3):149-69.
- Torem, M.L. & Casqueira, R.G. (2003). *Flotação aplicada à remoção de metais pesados*. Rio de Janeiro: CETEM/MMCT.

Recebido em: 3/4/2007

Versão final reapresentada em: 27/6/2007

Aprovado em: 20/8/2007

