

Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana

Francisco Morais dos Santos Filho¹, Karina Fernandes Oliveira Rezende^{2*}, Andrews Krupinski Emerenciano², Luciana Melhoranção Moreira¹, Vilma Barretto Vila¹, Ricardo Moraes Borges², Leandro Nogueira Pressinotti^{1,2}

RESUMO - O uso da ferramenta histológica permite aferir os efeitos de poluentes orgânicos e inorgânicos, além de outros estressores sobre peixes. Nesse sentido, foram observadas as estruturas histológicas em brânquias e fígado de peixes do Rio Paraguai. Para tanto foram coletados um total de 34 peixes sendo sete *Pygocentrus nattereri* e nove *Serrasalmus marginatus* a jusante, e 18 *Serrasalmus marginatus* a montante da mancha urbana da cidade de Cáceres. A histologia do fígado e brânquias foi satisfatória nas amostras fixadas em McDowell e inclusas em hystoresina. Dentre as alterações encontradas nas brânquias destacam-se a presença de rodlet cells; o espessamento do epitélio da lamela primária; a fusão parcial das lamelas secundárias e a presença de estruturas amorfas encapsuladas por tecido conjuntivo. No fígado observam-se o esvaziamento do citoplasma dos hepatócitos, a presença de vacúolos redondos bem delimitados, as dilatações sinusoidais, a infiltração leucocitária, a perda do contorno celular ou dos nuclear e também a presença de material amorfo encapsulado por tecido fibroso. Após a análise de revisão da literatura, vale destacar que, as principais alterações visualizadas em brânquias em condições de contaminação são: o aumento, fusão lamelar, aneurisma, hiperplasia e perda morfológica dos detalhes teciduais; no fígado são: aumento da vacuolização, perda dos detalhes morfológicos teciduais, infiltração leucocitária, frequência dos centro melanomacrófagos e hiperplasia.

Palavras-chave: brânquias, estressores, fígado, histologia, poluentes

Evaluation of histological biomarkers in fish collected upstream and downstream of urbana stain

ABSTRACT - This paper evaluates the use of a histological tool to assess the effects of organic and inorganic pollutants and other stressors on fish, by discussing the histological findings in liver and gills of fish from the Paraguay River. We collected a total of 34 fish and 7 *Pygocentrus nattereri* and 9 *Serrasalmus marginatus* downstream, and 18 *Serrasalmus marginatus* upstream from the urban area of the city of Cáceres. Histology of liver and gills was satisfactory in samples fixed in McDowell and included in hystoresin. Among the changes found in the gills are the presence of rodlet cells; thickening of the epithelium of primary lamellae; partial melting of secondary lamellae; and the presence of amorphous structures encapsulated by connective tissue. In the liver, the following findings were observed: emptying the cytoplasm

Keywords: liver, gills, histology, pollutants, stressors

¹Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Mato Grosso- UNEMAT, Cáceres, MT, Brasil; microtomo@unemat.br; lucianamelhoranca@gmail.com.

²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo - USP, Av. Professor Lineu Prestes, 1730, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil; andrewskre@usp.br; borgesrm@gmail.com; *karinaforezende@yahoo.com.br. *Autora para correspondência.

INTRODUÇÃO

Os peixes são organismos com capacidade de bioacumulação, biotransformação, compensação morfofisiológica, de regular a forma neuroimunoendócrina e serve como modelo preditivo de mutação e teratogênese (Klaassen 2001, De Azevedo; Chasin 2004). As principais vias de contaminação nos peixes são: alimentação, brânquias, ingestão de água e através da pele, sendo que alimentação e via branquial são as principais (Heath 1997). Alguns cuidados com a utilização de peixes como bioindicadores incluem a observação idade/estágio de desenvolvimento ou a dieta, temperatura da água, concentração de oxigênio e pH, contexto espaço-temporal, localização geográfica e estação do ano, pois podem influenciar na homeostase do peixe (Domingues et al. 2010).

O fígado é o órgão de biotransformação, com grande concentração de glutathione-S-transferase, representando um bom órgão para investigação da toxicidade ambiental (Amorim 2003). Este órgão é composto por lobos hepáticos estruturados por cordões de hepatócitos que delimitam sinusóides. Nos sinusóides pode ser identificadas células de Kupffer e células do sangue (eritrócitos e leucócitos). Na base dos cordões hepáticos existem canalículos responsáveis pelo trânsito da bile (metabólitos secretados pelos hepatócitos). Os canalículos biliares desembocam em canais, e esses em ductos, cada vez de maiores diâmetros. O fígado da maioria dos peixes teleósteos é composto por dois lobos, o lobo direito que está ao lado da vesícula biliar, e o lobo esquerdo próximo ao baço (Takashima; Hibiya 1995). As principais células do fígado, os hepatócitos, são células poliédricas com um ou dois núcleos grandes, esféricos e centralmente localizados, com nucléolo evidente, citoplasma com granulações e aspecto vacuolizado. O citoplasma das células hepáticas apresenta aspecto variável, dependendo do estado nutricional do indivíduo. Quando este se encontra bem alimentado, os hepatócitos armazenam quantidades significativas de glicogênio e processam grandes quantidades de lipídios (Takashima; Hibiya 1995). Segundo Maduenho et al. (2007) peixes da espécie *P. lineatus* expostos ao inseticida Dimilin apresentaram uma série de alterações histológicas no fígado como: o aumento do volume nuclear e celular, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, vacuolização nuclear e estagnação biliar. Simonato et al. (2006), em estudo realizado, sugere que peixes expostos a poluentes como petróleo, por exemplo, podem apresentar modificações em seus fígados como hipertrofia do núcleo, núcleo em posição lateral, vacuolização do citoplasma, degeneração do citoplasma, entre outras. O estudo das alterações teciduais em fígado de *Oreochromis niloticus* e tambacu (*P. mesopotamicus* X *C. macropomum*) evidenciou congestão, necrose de hepatócitos, necrose do tecido pancreático, esteatose, infiltrado inflamatório mononuclear no hepatopâncreas, hepatócitos contendo bilirrubina, hialinização, hemorragia e pigmentos (Santos 2009).

As brânquias são os primeiros órgãos em contato com os poluentes nas águas, representando um bom órgão para investigação da toxicidade aquática (Barreto 2007). A maioria dos peixes respira através de brânquias que estão localizadas na cavidade opercular e são divididas em arcos. Dos arcos divergem filamentos branquiais nos quais se inserem duas fileiras

de lamelas secundárias, como ocorre na maioria dos teleósteos (Fergusson 1989). As lamelas são ricamente vascularizadas, revestidas por um epitélio pavimentoso simples sustentado por células pilares, as quais formam lacunas por onde se inserem os capilares sanguíneos (Hibiya 1982). Outros tipos celulares podem ser encontrados na base dos filamentos branquiais: células de cloreto, células mucosas, melanócitos, macrófagos e linfócitos (Hibiya 1982). Quando se deparam com mudanças em sua necessidade por obtenção de oxigênio, os peixes possuem dois ajustes amplamente conhecidos: mudar o fluxo de água nas brânquias, ou mudar o fluxo de sangue no interior das brânquias. Nillsson (2007) relata que, recentemente foi constatado que alguns teleósteos possuem uma terceira opção: remodelar a morfologia das brânquias. Neste contexto, a análise das mudanças morfológicas constitui-se numa ferramenta eficiente para diagnosticar e identificar as conseqüências fisiológicas de contaminações quase letais (Romão et al. 2006). Segundo Evans (2008), desde o início dos estudos fisiológicos, numerosos grupos têm demonstrado que as células de cloro em grande variedade de teleósteos podem manifestar Na-K-ATPase ativas e, devido ao grande número de mitocôndrias presentes nestas células, elas também são conhecidas como células ricas em mitocôndrias ou MRC. Segundo Maduenho et al. (2007), peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos ao inseticida Dimilin apresentaram uma série de alterações histológicas nas brânquias como elevação epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais, fusão lamelar e aneurisma.

Winkaler et al. (2001) em estudos com *Astyanax altiparanae* e *A. fasciatus* de córregos urbanos e Fontainhas-Fernandes et al. (2008), em estudo com *Oreochromis niloticus* expostos em águas residuais de uma estação de tratamento de esgoto, observaram alterações em brânquias como elevação epitelial, necrose, hipertrofia, hiperplasia, fusão de lamelas, ruptura do tecido branquial, hipersecreção e proliferação de células mucosas. Thophon et al. (2003) referem-se a presença de edema acompanhado pelo descolamento do epitélio lamelar como sendo o primeiro sinal grave de alteração branquial em *Lates calcarife* expostos ao Cádmiu.

Para o presente estudo foram utilizadas duas espécies de piranhas. A piranha caju (*Pygocentrus nattereri*, Kner 1860) é um serrasalmídeo típico de ambientes lênticos. Sua distribuição geográfica ainda é mal conhecida e há necessidade de uma melhor definição dos limites de sua ocorrência, porém é uma espécie comum na Amazônia Central e no pantanal Mato-grossense, apresentando diferentes áreas de endemismo (Silva 2004). A *P. nattereri* é piscívora e tem amplo espectro alimentar. A sua dieta é composta principalmente por peixes, mas também artrópodes, moluscos, outros invertebrados e material vegetal (Pauly 1994). Além disso, *P. nattereri*, também preda peixes doentes e feridos e se alimenta de cadáveres de peixes, desempenhando assim, um importante papel ecológico (Pauly 1994). A espécie *Serrasalmus marginatus* tem como principal recurso alimentar peixes, seguido de restos de vegetais. Com base nesses dados, a mesma se classifica como piscívora (Luiz et al. 1998). Sua distribuição geográfica compreende toda a bacia Paraguai-Paraná (bacia do Prata).

Este estudo tem como objetivo discutir o uso da ferramenta histológica para aferir os efeitos da exposição crônica aos poluentes orgânicos e inorgânicos, além de outros estressores,

sobre peixes do rio Paraguai. Discutindo sobre os achados histológicos em brânquias e fígado de *Pygocentrus natterire* e *Serrasalmus marginatus* do Rio Paraguai. Como também, pretende consolidar uma base de literatura sólida para a realização de novos monitoramentos e saídas de campo no Rio Paraguai na região de Cáceres.

MATERIAL E MÉTODOS

Como modelo de estudo para verificar os possíveis impactos do efluente urbano foram utilizados achados histológicos em brânquias e fígado de *Pygocentrus natterire* e *Serrasalmus marginatus* do Rio Paraguai. Sendo que foram executadas quatro coletas, duas a montante e duas a jusante da mancha urbana do município de Cáceres-MT (Figura 1).

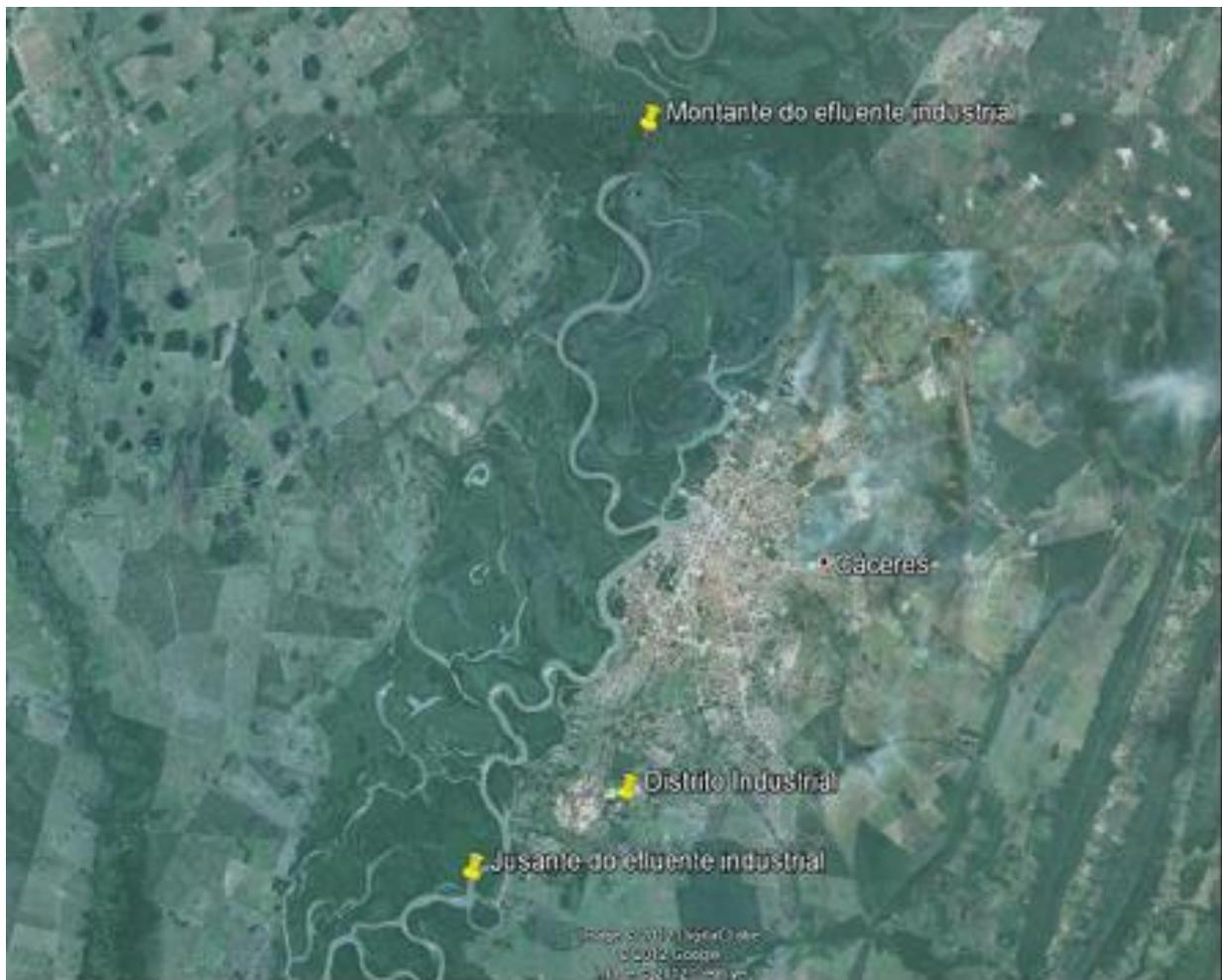


Figura 1. Locais de coleta de peixes, a montante do efluente urbano e a jusante do efluente urbano – Rio Paraguai, Cáceres, MT

Fonte: Google Earth, 2012

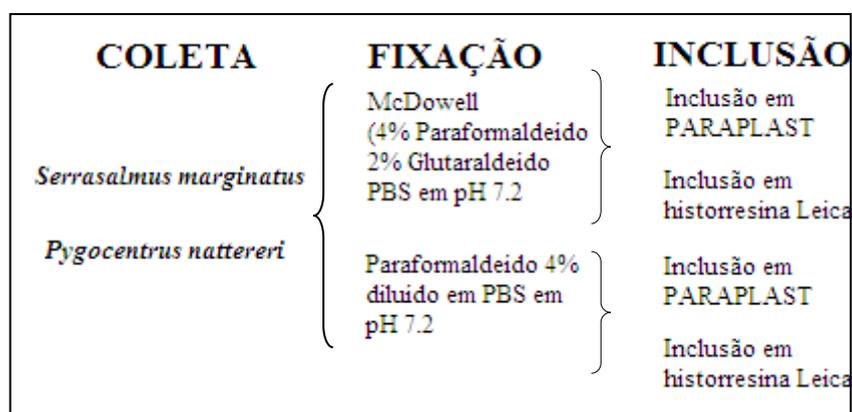
Os dados abióticos dos locais de coletas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Média e desvio padrão (Desv. Pad.) dos dados limnológicos dos locais de coleta de peixes, a montante do efluente urbano e a jusante do efluente urbano - Rio Paraguai, Cáceres-MT

	Montante do Efluente		Jusante do Efluente	
	Média	DP (\pm)*	Média	DP (\pm)*
Temperatura do ar ($^{\circ}$ C)	36,50	0,00	34,30	0,00
Temperatura da água ($^{\circ}$ C)	28,80	0,14	28,33	0,98
Oxigênio saturado	70,45	0,00	83,47	17,96
Oxigênio dissolvido (mg.L-1)	7,50	0,00	8,17	1,33
pH	6,57	0,06	6,10	0,17
Condutividade (μ S.cm-1)	51,00	0,00	34,00	0,00
Turbidez (NTU)	10,30	0,00	5,27	4,04

*Desvio padrão da média

Foram coletados um total de 34 peixes sendo sete *Pygocentrus nattereri* e nove *Serrasalmus marginatus* a jusante, além de 18 *Serrasalmus marginatus* a montante da mancha urbana. A coleta foi realizada por pesca artesanal por meio de varas de bambu, linha e anzol, como iscas foram utilizadas carne bovina crua. Os dados limnológicos foram coletados no mesmo momento da pesca utilizando equipamento eletrônico específico. Durante as coletas foram fixadas amostras de fígado e brânquias em McDowell e Paraformaldeído 4% em PBS para posterior processamento histológico em historresina e paraplast conforme ilustra a Figura 2.

**Figura 2.** Fluxograma ilustrando procedimento de coleta e processamento de amostras

As brânquias e fígado foram inclusos em historresina e paraplast respectivamente, o material foi cortado em micrótomo rotativo com navalhas de aço, na espessura de 5 μ m. Os mesmos foram dispostos em lâminas de vidro para microscopia óptica, as quais foram deixadas 24 horas em estufa a 40 $^{\circ}$ C para secagem e melhor adesão do material. Os cortes foram submetidos à coloração diferencial entre núcleo e citoplasma de Hematoxilina e Eosina, quando em paraplast, e Toluidina e Fucsina quando em historresina. Como também à coloração do colágeno fibroso por picrossirius e coloração diferencial de leucócitos pela técnica de Rosenfeld. A fim de comparar os resultados com a literatura, foram levantadas as alterações branquiais e hepáticas em situação de contaminação de 14 artigos indexados (Tabela 2).

Tabela 2. Alterações branquiais e hepáticas em situações de contaminação de diferentes autores, levadas em conta na avaliação

Órgão	Poluente	Espécie	Resultado	Autor
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Necrose	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Vacuolização	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Resposta inflamatória	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	CMM	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Neoplasia	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Diferenciação celular	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Parasito	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Necrose	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Resposta inflamatória	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	CMM	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Neoplasia	Brito 2010
Fígado	POPs e Endosulfan	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Parasito	Brito 2010
Brânquias	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Aneurisma	Brito 2010
Brânquias	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Fusão lamelar	Brito 2010
Brânquias	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Neoplasia	Brito 2010
Brânquias	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Hiperplasia	Brito 2010
Brânquias	POPs e Endosulfan	<i>Pimelodus maculatus</i>	Parasito	Brito 2010
Brânquias	POPs e Endosulfan	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Aneurisma	Brito 2010
Brânquias	POPs e Endosulfan	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Fusão lamelar	Brito 2010
Brânquias	POPs e Endosulfan	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	Neoplasia	Brito 2010
Brânquias	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Hiperplasia	Santos 2009
Brânquias	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Fusão lamelar	Santos 2009
Brânquias	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Aneurisma	Santos 2009
Brânquias	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Ruptura da membrana	Santos 2009
Fígado	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Congestão vascular	Santos 2009
Fígado	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Deslocamento do núcleo hepatócito	Santos 2009
Fígado	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Necrose	Santos 2009
Fígado	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Infiltração leucocitária	Santos 2009
Fígado	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Vacuolização	Santos 2009
Fígado	Zn	<i>Astyanax aff. Bimaculatus</i>	Desarranjo da estrutura cordonal	Santos 2009
Brânquias	Herbídica diquat	<i>Oreochromis niloticus</i>	Fusão lamelar	Henares et al. 2008
Brânquias	Herbídica diquat	<i>Oreochromis niloticus</i>	Congestão nas lamelas	Henares et al. 2008
Fígado	Herbídica diquat	<i>Oreochromis niloticus</i>	Hipertrofia dos hepatócitos	Henares et al. 2008
Fígado	Herbídica diquat	<i>Oreochromis niloticus</i>	Fusão celular	Henares et al. 2008
Fígado	Herbídica diquat	<i>Oreochromis niloticus</i>	Vacuolização	Henares et al. 2008
Brânquias	Efluente Urbano	<i>Prochilodus lineatus</i>	Hiperplasia	Camargo e Martinez 2007
Brânquias	Efluente Urbano	<i>Prochilodus lineatus</i>	Hipertrofia	Camargo e Martinez 2007
Brânquias	Efluente Urbano	<i>Prochilodus lineatus</i>	Fusão lamelar	Camargo e Martinez 2007
Brânquias	Efluente Urbano	<i>Prochilodus lineatus</i>	Aneurisma	Camargo e Martinez 2007
Fígado	Efluente Urbano	<i>Prochilodus lineatus</i>	Hipertrofia dos hepatócitos	Camargo e Martinez 2007
Fígado	Efluente Urbano	<i>Prochilodus lineatus</i>	CMM	Camargo e Martinez 2007
Fígado	Efluente Urbano	<i>Prochilodus lineatus</i>	Necrose	Camargo e Martinez 2007
Brânquias	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Fusão lamelar	Mishra e Mohanty 2008
Brânquias	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Hiperplasia	Mishra e Mohanty 2008
Brânquias	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Deslocamento do epitélio	Mishra e Mohanty 2008
Brânquias	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Necrose	Mishra e Mohanty 2008
Brânquias	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Aneurisma	Mishra e Mohanty 2008
Brânquias	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Descamação	Mishra e Mohanty 2008
Brânquias	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Edema	Mishra e Mohanty 2008
Fígado	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Vacuolização	Mishra e Mohanty 2008
Fígado	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Hipertrofia dos hepatócitos	Mishra e Mohanty 2008
Fígado	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Dilatação dos sinusóides	Mishra e Mohanty 2008
Fígado	Cr	<i>Channa punctatus</i>	Condensação nuclear	Mishra e Mohanty 2008
Fígado	Cr	<i>Carassius auratus</i>	Desarranjo da estrutura cordonal	Mishra e Mohanty 2008
Fígado	Cr	<i>Carassius auratus</i>	Vacuolização	Mishra e Mohanty 2008
Fígado	Cr	<i>Carassius auratus</i>	Condensação nuclear	Mishra e Mohanty 2008
Fígado	Cr	<i>Carassius auratus</i>	Necrose	Mishra e Mohanty 2008
Brânquias	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Necrose	Tulasi e Rao 2012

Brânquias	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Fusão lamelar	Tulasi e Rao 2012
Brânquias	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Hipertrofia	Tulasi e Rao 2012
Brânquias	Cr	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Fusão lamelar	Senthil et al. 2011
Brânquias	Cr	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Aneurisma	Senthil et al. 2011
Brânquias	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Necrose	Parvathi et al. 2011
Brânquias	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Fusão lamelar	Parvathi et al. 2011
Brânquias	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Deslocamento do epitélio	Parvathi et al. 2011
Fígado	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Hiperplasia	Parvathi et al. 2011
Fígado	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Hipertrofia do núcleo	Parvathi et al. 2011
Fígado	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Infiltração leucocitária	Parvathi et al. 2011
Fígado	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Vacuolização	Parvathi et al. 2011
Fígado	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Fibrose do parênquima	Parvathi et al. 2011
Fígado	Cr	<i>Cyprinus carpio</i>	Necrose	Parvathi et al. 2011
Brânquias	Hg	<i>Dicentrarchus labrax (L.)</i>	Edema	Giari et al. 2007
Brânquias	Hg	<i>Dicentrarchus labrax (L.)</i>	Descamação	Giari et al. 2007
Brânquias	Hg	<i>Dicentrarchus labrax (L.)</i>	Aneurisma	Giari et al. 2007
Brânquias	Hg	<i>Dicentrarchus labrax (L.)</i>	Descolamento do epitélio	Giari et al. 2007
Brânquias	Hg	<i>Dicentrarchus labrax (L.)</i>	Hiperplasia	Giari et al. 2007
Brânquias	Hg	<i>Dicentrarchus labrax (L.)</i>	Necrose	Giari et al. 2007
Brânquias	Hg	<i>Dicentrarchus labrax (L.)</i>	Infiltração leucocitária	Giari et al. 2007
Fígado	Hg	<i>Dicentrarchus labrax (L.)</i>	Vacuolização	Giari et al. 2007
Fígado	Hg	<i>Dicentrarchus labrax (L.)</i>	Acúmulo de lipídeos	Giari et al. 2007
Brânquias	Endosulfan	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Deslocamento do epitélio	Altinok e Capkin 2007
Brânquias	Endosulfan	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Hiperplasia	Altinok e Capkin 2007
Brânquias	Endosulfan	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Hipertrofia	Altinok e Capkin 2007
Brânquias	Endosulfan	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fusão lamelar	Altinok e Capkin 2007
Brânquias	Endosulfan	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Necrose	Altinok e Capkin 2007
Fígado	Endosulfan	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CMM	Altinok e Capkin 2007
Fígado	Endosulfan	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Necrose	Altinok e Capkin 2007
Fígado	Endosulfan	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Dilatação dos sinusóides	Altinok e Capkin 2007
Fígado	Endosulfan	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Hipertrofia dos hepatócitos	Altinok e Capkin 2007
Brânquias	Cr6+	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Edema	Roberts e Oris 2004
Brânquias	Cr6+	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Hipertrofia	Roberts e Oris 2004
Brânquias	Cr6+	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Deslocamento do epitélio	Roberts e Oris 2004
Brânquias	Cr6+	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Hiperplasia	Roberts e Oris 2004
Brânquias	Cr6+	<i>Cyprinus carpio</i>	Hiperplasia	Tayybah et al. 2012
Brânquias	Cr6+	<i>Cyprinus carpio</i>	Necrose	Tayybah et al. 2012
Brânquias	Cr6+	<i>Cyprinus carpio</i>	Descamação	Tayybah et al. 2012
Brânquias	Cr6+	<i>Cyprinus carpio</i>	Aneurisma	Tayybah et al. 2012
Brânquias	Cr6+	<i>Cyprinus carpio</i>	Fusão lamelar	Tayybah et al. 2012
Brânquias	HgCl2	<i>Acipenser persicus</i>	Hiperplasia	Khoshnood et al. 2011
Brânquias	HgCl2	<i>Acipenser persicus</i>	Fusão lamelar	Khoshnood et al. 2011
Brânquias	HgCl2	<i>Acipenser persicus</i>	Enrugamento lamelar	Khoshnood et al. 2011
Brânquias	HgCl2	<i>Acipenser persicus</i>	Hipertrofia	Khoshnood et al. 2011

RESULTADOS

Após processamento histológico, em ambos os fixadores, a morfologia das brânquias processadas em paraplast era grosseira, o que dificultou a visualização dos detalhes celulares (Figura 3a). Já a morfologia obtida no processamento em historresina permitiu a distinção de cada um dos elementos celulares com clareza, como exemplo: célula pilar, epitélio simples pavimentoso da lamela secundária, epitélio estratificado pavimentoso da lamela primária, célula secretora de muco, granulócitos, e, com muita dificuldade, células de cloreto (Figura 3b).

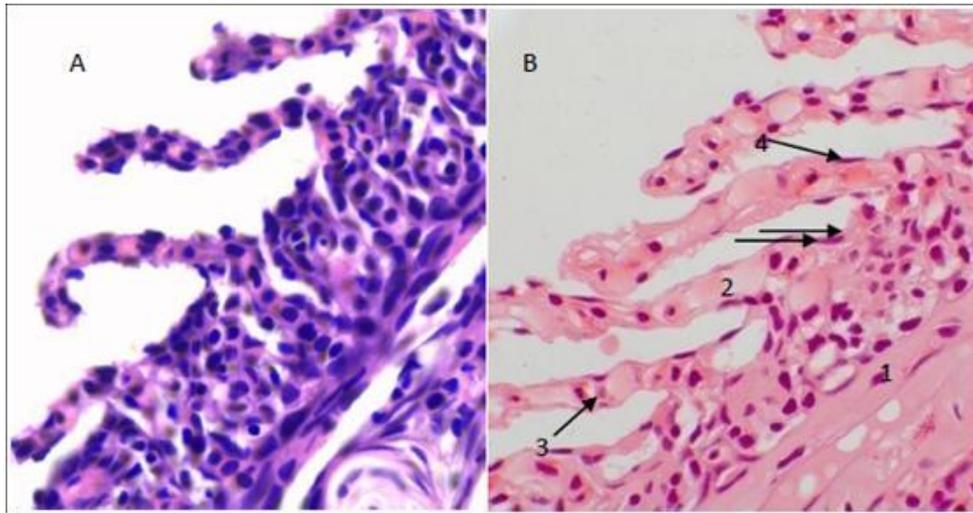


Figura 3. Montagem contendo duas fotomicrografias de brânquias. A-corte longitudinal de brânquia fixada em Paraformoldeído 4% e inclusa em paraplast. B- corte longitudinal de brânquia de *Serrasalmus marginatus* fixada em McDowell e inclusa em historresina Leica. 1- Lamelas primárias; 2- Lamelas secundárias; 3- célula pilar, 4- epitélio simples pavimentoso da lamela secundária; 5- epitélio pavimentoso da lamela primária (setas)

Dentre as alterações encontradas nas brânquias cabe destacar a presença de rodlet cells, espessamento do epitélio da lamela primária, fusão parcial das lamelas secundárias e presença de estruturas amorfas encapsuladas por tecido conjuntivo (Figura 4).

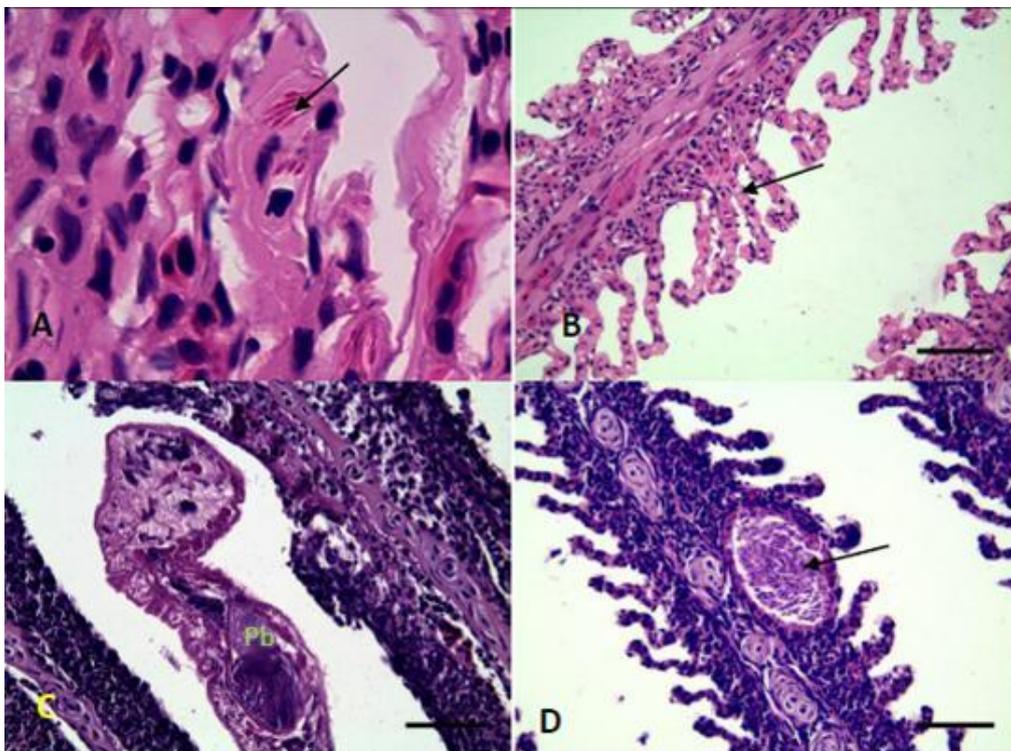


Figura 4. Montagem contendo 4 fotomicrografias de brânquias. A- rodlet cell (seta) de *Pygocentrus nattereri* (barra de escala = 20µm), B- fusão parcial das lamelas secundárias (seta) de *Pygocentrus nattereri* (barra de escala = 50 µm), C- possível parasita branquial (Pb) em *Pygocentrus nattereri* (barra de escala = 20µm), D- estrutura amorfa encapsulada (seta) em *Pygocentrus nattereri* (barra de escala = 50 µm)

A histologia do fígado foi satisfatória nas amostras fixadas em paraformaldeído 4% e inclusos em paraplast. Dentre os achados histológicos encontrados cabe destacar: esvaziamento do citoplasma dos hepatócitos, presença de vacúolos redondos bem delimitados, dilatações sinusoidais, infiltração leucocitária, perda do contorno celular, perda do contorno dos núcleos, e, material amorfo encapsulado por tecido fibroso (Figura 5).

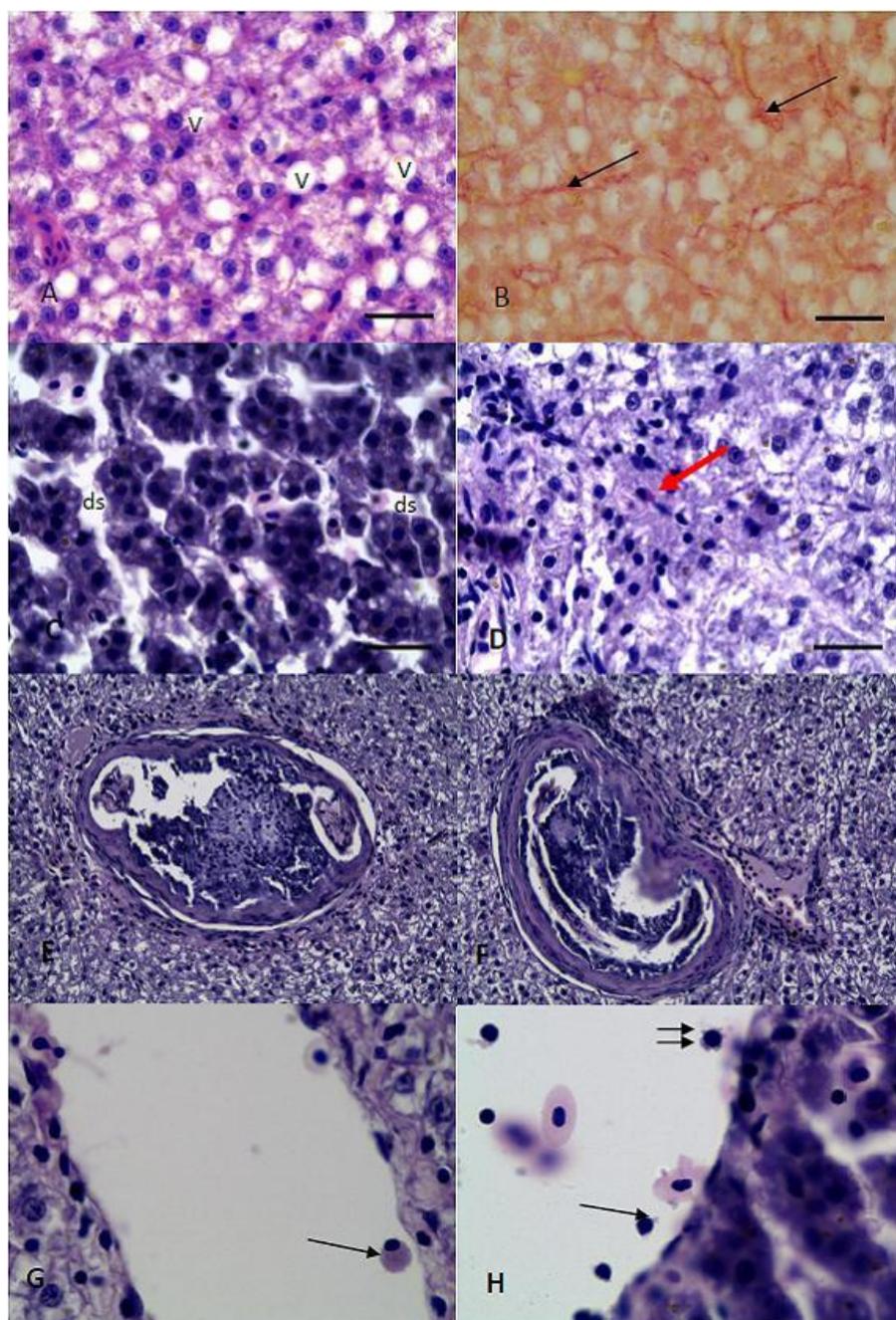


Figura 5. Montagem contendo 6 fotomicrografias de fígado. A-vacuolização citoplasmática (V) em *Serrasalmus marginatus* (barra de escala = 20µm), B- fibrose do parênquima hepático (setas) em *Serrasalmus marginatus* (barra de escala = 20µm), C-dilatação dos sinusóides (ds) em *Pygocentrus nattereri* (barra de escala = 20µm), D- infiltração granulocítica no stroma em *Pygocentrus nattereri* (barra de escala = 20µm), E e F- material amorfo encapsulado em *Pygocentrus nattereri* (barra de escala = 20µm), G e H- Figuras de rolamento leucocitário (seta) e pseudópodes em linfócitos (seta dupla) em *Pygocentrus nattereri*

Dentre os achados histológicos foi constatado que *Serrasalmus marginatus* possui a porção exócrina do pâncreas associada ao fígado, comum em peixes, e chamado hepatopâncreas. Após a análise de 14 artigos indexados, que avaliaram 12 espécies de peixes em condições de contaminação, encontrou-se um total de 14 tipos de alterações (Tabela 2), sendo as principais, visualizadas em brânquias, em condições de contaminação, o aumento, fusão lamelar, aneurisma, hiperplasia e perda morfológica dos detalhes teciduais (Figura 6).

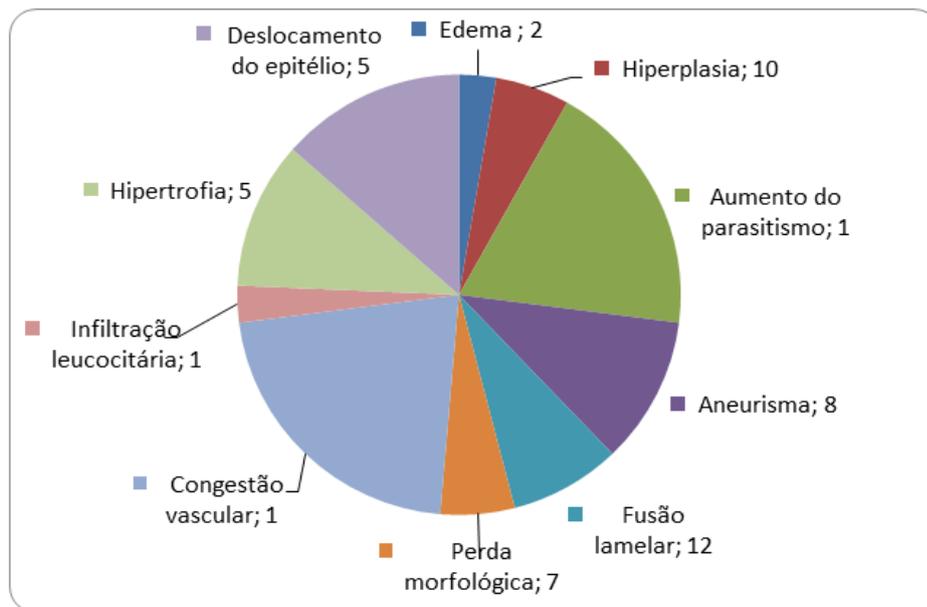


Figura 6. Gráfico de incidência das principais alterações encontradas em brânquias ao longo do levantamento bibliográfico

As principais alterações encontradas no fígado são aumento: vacuolização, perda dos detalhes morfológicos teciduais, infiltração leucocitária, frequência dos centro melanomacrófagos e hiperplasia (Figura 7).

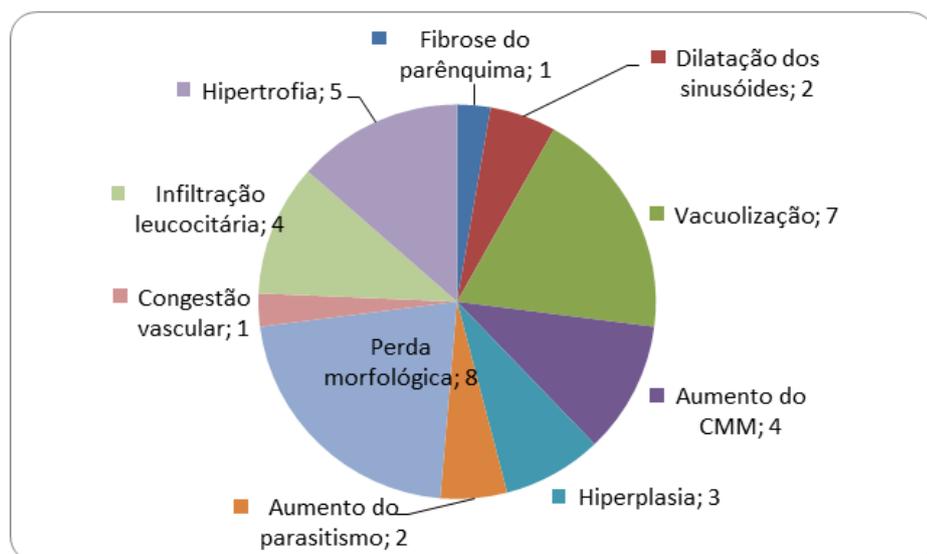


Figura 7. Gráfico de incidência das principais alterações encontradas em fígados ao longo do levantamento bibliográfico

DISCUSSÃO

O material coletado foi submetido a dois fixadores, sendo que o McDowell apresentou compatibilidade com a historesina e incompatível com paraplást, neste caso, é indicado inclusão em historesina para análises de brânquias. No fígado os cortes fixados em paraformoldeído e inclusos em paraplást apresentaram resultados satisfatórios, o que possibilitou boa observação de suas estruturas. Houve compatibilidade quanto as alterações encontradas na literatura com aquelas observadas nesse trabalho de pesquisas. No entanto, deve ser considerado que para validar um biomarcador deve haver conhecimento quanto a natureza do agente agressor, dose (concentração) do agente estressor, interação com o organismo específico e levantamento de dados da unidade geográfica da espécie (Stegeman et al. 1992, Van Der Oost et al. 2003).

Não há levantamento de dados sobre a qualidade da água nos locais amostrados, apenas alguns dados liminológicos (abióticos), o que prejudica a análise dos resultados frente à validação dos biomarcadores. Além disso, difícil afirmar quanto a capacidade migradora das piranhas. Por fim, variações sazonais devem ser consideradas quando o material é coletado em campo, o que pode interferir nos resultados. Segundo Smith (2002), no momento da coleta das amostras deve ser observados os aspectos externos e internos dos peixes. No que refere ao aspecto externo deve-se observar: a superfície total do corpo (lesões) e deformidades na espinha, descoloração local, presença de fungos, pontos brancos ou negros na superfície do corpo, assim como a presença de parasitas (sanguessuga), cabeça e cavidade oral, olhos (exoplâmia, ausência ou hemorragia dos olhos), opérculo (diminuição do opérculo e outras). Dentre os aspectos internos podemos destacar a análise de alguns órgãos como: brânquias (coloração e presença de parasitas), fígado (coloração e presença de nódulos), vesícula biliar (tamanho), biliar (coloração), gônadas (localização, lesões e parasitas), baço (coloração e nódulos) e rim. Esses autores propõem uma ficha de coleta que pode ser preenchida no momento da coleta. Um bom bioindicador revela um sofrimento orgânico de forma precoce ou reversível (Albuquerque 2007). Sendo assim, é fundamental tentar visualizar qualquer sinal de sofrimento dos peixes coletados. Após essa revisão sobre o tema, é possível inferir que para observação morfológica das brânquias é de essencial o processamento em historesina. Já o fígado pode ser processado por ambas as técnicas, no entanto, dando-se predileção pelo processamento em historesina. Para quantificação, existe diversos índices que tentam mensurar as alterações histológicas dos diferentes órgãos (Melletti et al. 2003).

As mensurações de alterações histológicas já consagradas na literatura podem fornecer dados precisos, passíveis de serem correlacionados com as mensurações de bioacumulação de metais nos mesmos órgãos. Cabe mencionar que foram poucos os trabalhos levantados que observaram as células de cloreto na presença de metais, no entanto, são justamente essas células que participam do equilíbrio iônico do organismo. O mesmo vale para células produtoras de muco (Evans 2008).

CONCLUSÃO

Para análise do fígado, o mesmo deve ser fixado em McDowell e incluso em Historesina, sendo que as alterações sugeridas para observação são: perda morfológica, vacuolização, infiltração leucocitária, hiperplasia e aumento de CMM. Para as análises em brânquias, a mesma deve ser fixada em McDowell e inclusa em historesina; para análise dos dados é pertinente a verificação das alterações como: fusão lamelar, hiperplasia, aneurisma, perda morfológicas e hipertrofia. Os dados dessas análises devem ser contemplados com as mensurações de Mercúrio (Hg) e Cromo (Cr), confirmando ou não a relação entre o IAH com o contaminante. As informações apresentadas neste trabalho poderão ser validadas quando se realizar a quantificação de metais e outros agentes estressores nos tecidos analisados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao ADAPTA- Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia e ao CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque C. Uso da acetilcolinesterase e metalotioneina em peixes na avaliação do efeito da contaminação da Baía de Guanabara, RJ [tese]. São Paulo: Escola Nacional de Saúde Pública; 2007.
- Altinok, İlhan, and Erol Capkin. Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. *Toxicol pathol.* 2007; 35(3):405-410.
- Amorim LCA. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev Bras Epidemiol* 2003;6(2):1-13.
- Barreto TR. Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®) [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos; 2007.
- Brito IA. Avaliação da qualidade da água de três reservatórios do rio Paraíba do Sul através de biomarcadores em *Pimelodus Maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae) e *Oligosarcus Hepsetus* (Characiformes, Characidae) [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
- Camargo MMP, Martinez CBR. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop Ichthyol.* 2007;5:327-336.
- De Azevedo FA, Chasin AAM. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: RiMa, São Paulo: Intertox, 2004.
- Domingues I, Agra AR, Monaghan K, Soares AMVM, Nogueira AJA. Cholinesterase and glutathione-s-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environ Toxicol Chem.* 2010;29:5-18.
- Evans DH. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *Am J Physiol Regul Integr Physiol.* 2008;295:704-713.

- Fergusson, HW. Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleosts. Iowa State: Univ Press; 1989. 64-103p.
- Fontainhas-Fernandes A et al. Gill histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to treated sewage water. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2008;52(5):1057-1063.
- Giari L, Manera M, Simoni E, Dezfuli BSX. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. Chemosphere. 2007;67:1171-1181.
- Heath AG. Water pollution and fish physiology. 2. ed. Florida: Lewis Publishers; 1997.
- Henares MNP, Cruz, C, Gomes, GR, Pitelli RA, Machado, M R F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Acta Sci Biol Sci. 2008;30(1):77-82.
- Hibiya, T. An atlas of fish histology, normal and pathological features. New York: Gustav Fischer Verlag, 1982.
- Khoshnood Z, Khodabandeh S, Moghaddam MS, MosaferKhorjestan S. Histopathological and pathomorphological effects of mercuric chloride on the gills of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, Fry. Int J Nat Res Mar Sci. 2011;1:23-32.
- Luiz EA, Agostinho AA, Gomes LC, Hann NS. Ecologia trófica de peixes em dois riachos da bacia do Rio Paraná. Rev Bras Biol. 1998; 58: 273-285.
- Klaassen CD. Metais pesados e antagonistas dos metais pesados. In: Goodman, Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill. 2001; 1389-1407.
- Maduenho LP, Mendes JP, Martinez CBR. Efeitos agudos do inseticida dimilin em parâmetros histológicos do peixe *Prochilodus lineatus*. In: Anais do 8º Congresso de Ecologia do Brasil, 2007 set 23-28; Caxambu, BR. Caxambu: Sociedade de Ecologia Do Brasil; 2007.
- Meletti PC, Rocha O, Martinez CBR. Avaliação da degradação ambiental na bacia do Rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: Brigante J, Espíndola ELG. Limnologia Fluvial – Um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Carlos:UFSCAR; 2003:149-180.
- Mishra AK, Mohanty B. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). Environ Toxicol Pharmacol. 2008;26:136–141.
- Nilsson, GE. Gill remodeling in fish – a new fashion or an ancient secret?. J Exper Biol, 2007; 210:2403-2409.
- Pauly, D. Quantitative analysis of published data on the growth, metabolism, food consumption, and related features of the red-bellied piranha, *Serrasalmus nattereri* (Characidae). Environ Biol Fishes. 1994;41:423–437.
- Parvathi K, Sivakumar P, Sarasu C. Effects of chromium on histological alterations of gill, liver and kidney of fresh water teleost, *Cyprinus carpio* (L.). J Fish Intern. 2011;6(1):1-5.
- Roberts AP, Oris, JT. Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium. Comp Biochem Physiol Part C: Toxic Pharmacol, 138(2), 221-228.
- Romão S, Donatti L, Freitas MO, Teixeira J, Kusma J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. Braz Arch Biol Technol. 2006;49:441-448.

- Santos DCM. Toxidez aguda do zinco em *Lambaris Astyanax aff. bimaculatus* (Linnaeus, 1758) [tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2009.
- Senthil P, Uthaman M, Muthulingam M. Effect of chromium on histopathological changes in the gill tissue of fresh water fish, *Oreochromis Mossambicus* (Peters). Intl J Cur Res. 2011;33(3):018-021.
- Silva AG. Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática [tese]. Paraná: Universidade Estadual de Londrina; 2004.
- Simonato JD. Biomarcadores funcionais e histológicos associados à exposição do peixe *Prochilodus lineatus* ao óleo diesel [tese]. Paraná: Universidade Estadual de Londrina; 2006.
- Smith SB, Donahue AP, Lipkin RJ, Blazer VS, Schmitt CJ, Goede RW. Illustrated field guide for assessing external and internal anomalies in fish. Inf Techn Rep: USGS/BRD/ITR; 2002.
- Stegeman JJ, Brouwer M, Di Giulio RT, Forlin L, Fowler BA, Sanders BM, et al. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Biomarkers Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle Jr PM, Bergman HL (Eds). Boca Raton: Lewis Publishers; 1992, p. 235-335.
- Takashima F, Hibiya T. An atlas of fish histology normal and pathological features. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag. 1995.
- Tayybah, S, Tanveer, A, Ismail M, Khan, M, Pervaiz, K, Ashraf, M Teratological effect of various sublethal concentrations of Chromium Hexavalent [Cr (VI)] on the gills of *Cyprinus carpio*. Int J Agri Biol; 2012;14(2)5-18.
- Thophon, S.et al. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. Environ Pollut. 2003; 121:307-320.
- Tulasi G, Jayantha R Cytoarchitectural changes of chromium toxicity in the gill of fresh water edible fingerlings of fish, *Cyprinus carpio*. Current Biotica. 2012;5(4):519-521.
- Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol. 2003;13:57-149.
- Winkaler EU, Silva AG, Galindo HC, Martinez CBR. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. Acta Sci. 2001;23(2):507-514.