

UNIVERSIDADE DE RIO VERDE - UniRV
FACULDADE DE BIOLOGIA E QUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA E BACHARELADO

Determinação da sensibilidade de *Poecilia reticulata* para poluentes orgânicos de origem doméstica e industrial.

Thalmo Antunes de Oliveira

Orientadora: Prof^ª. MS. SILVIA ROSANA PAGLIARINI CABRAL

Co-orientador: Profa. Dra. MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES DA SILVA

Artigo de Trabalho apresentado à Faculdade de Biologia e Química da UniRV- Universidade de Rio Verde, como parte das exigências para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

RIO VERDE – GOIÁS

2015

Determinação da sensibilidade de *Poecilia reticulata* para poluentes orgânicos de origem doméstica e industrial.

Thalmo Antunes de Oliveira ¹
Silvia Rosana Pagliarini Cabral ²
Maria de Fátima Rodrigues da Silva ^{1,3}

Resumo

O *Poecilia reticulata*, que é popularmente conhecido como guppy guaru ou lebiste, é um peixe comumente utilizado como bioindicador em testes ecotoxicológicos. Os efeitos decorrentes da exposição poluentes orgânicos de origens doméstica e industrial de águas do município de Rio Verde-GO foram avaliados utilizando este espécie de peixe. A amostra de águas de poluentes orgânicos de origem doméstica e industrial, foram coletadas em córregos da cidade para verificação de análises de alterações comportamentais, análise histopatológica e análise de morfometria. Foram encontradas alterações comportamentais e as alterações morfológicas, vacuolização, degeneração do citoplasma, hiperemia, hemorragia e frequência de melanomacrófagos nos hepatócitos dos animais expostos às águas dos córregos do Sapo e Abóboras analisadas.

Palavras-chave: bioindicadores, córregos urbanos, peixe.

¹ Acadêmico do curso de Ciências Biológicas Licenciatura e Bacharelado. Universidade de Rio Verde - UniRV.

² Professora Mestre da Faculdade de Biologia da Universidade de Rio Verde – UniRV

³ Professora Doutora da Faculdade de Biologia da Universidade de Rio Verde – UniRV

Introdução

O *Poecilia reticulata*, que é popularmente conhecido como guppy guaru ou lebiste, é um peixe teleósteo e eurialino pertencente á ordem dos Ciprinodontiformes (Silva *et al.*, 2003). Esta espécie é originaria da América Central e norte da América do Sul. São animais de hábitos onívoros, possuem nado ágil, alta fertilidade, rusticidade e diversificação de cores (Lima,2003). Vivem em variados habitats, com, em pequenos riachos e córregos, que por sua vez estão presentes em áreas agrícolas (Kiss *et al.*, 2003).

De acordo com Silva (1995), o *Poecilia reticulata* por se alimentarem de larvas de insetos e sobreviverem em águas impuras, foi introduzido no Brasil como controle de mosquitos transmissores da dengue e da malária.

Segundo Skelton (1993), os guppies apresentam ampla faixa de tolerância à salinidade da água requerendo temperaturas entre 23 e 24 °C para sua vivencia. A espécie possui dimorfismo sexual com machos menores que as fêmeas e presença de nadadeira anal modificada como órgão copulador, chamado de gonopódio (Allen, 1991). As fêmeas como são maiores possuem em média 6,5cm já os machos 3,3cm (Lima, 2003).

De acordo com Kiss *et al.*, 2003, os bioindicadores são adequados para avaliar os efeitos que podem causar as substâncias químicas que interagem com componentes biológicos de forma simultânea, e que esses organismos utilizados em testes ecotoxicológicos podem avaliar impactos causados pela utilização direta ou indireta de agrotóxicos e outros poluentes.

À utilização do peixe *Poecilia reticulata* como bioindicadores é comum na realização dos testes de toxicidade aguda ou crônica Miliou *et al.* (1998), Tollefsen *et al.* (2006), Beesson *et al.* (1999).

A crescente industrialização, expansão das cidades, e a larga escala da agricultura tem provocado maior emissão de poluentes no meio ambiente. Entre os alvos destes poluentes destacam-se os recursos hídricos que abastecem as cidades os quais estão cada vez mais poluídos.

Os bioindicadores são utilizados para avaliar os impactos que esses poluentes podem causar. Executar essa avaliação é fundamental para saúde pública, verificar a qualidade dessas águas que são alvos de efluentes de indústrias e residências e se esses resíduos estão tendo ou não o adequado tratamento. Neste contexto este estudo tem por

objetivo verificar a influência de poluentes orgânicos de origens doméstica e industrial em *Pecilia reticulata* por meio da análise da presença de alterações hepáticas e, verificar a presença e frequência de melanomacrófagos no fígado; analisar a morfologia geral dos hepatócitos, comparando-os na presença e ausência dos poluentes.

Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido nos meses de setembro a outubro de 2015, após a aprovação da Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA). Foram coletadas águas em córregos urbanos do município de Rio Verde- GO, assim distribuídos: Ponto 1: Córrego do Sapo e Ponto 2: Efluentes da BRF (Ribeirão Aboboras). Foram separados 3 aquários distribuídos da seguinte maneira: A1- Controle (água limpa), A2- Resíduo doméstico (córrego do Sapo), A3- Efluente Industrial (BRF). Em cada aquário foram acondicionados 15 Guppys (*Poecilia reticulata*) fêmeas, que passaram por um período de 7 dias (168horas) expostos aos tratamentos. Foram processados na seguinte sequência: Primeira dissecação: 24horas, segunda dissecação: 96horas, terceira dissecação: 168horas.

Os peixes foram mortos de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), utilizando água gelada e o anestésico lidocaína que foi dissolvido em álcool e posteriormente diluído em água. A dissecação foi realizada sob lupa e os órgãos foram rebatidos. O fígado foi fixado em formol a 10% e processado para inclusão em parafina paraplast. Foram feitos cortes de 3µm de espessura e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

Para as análises do tecido hepático foram verificadas as seguintes alterações: vacuolização, degeneração citoplasmática, hiperemia, hemorragia, degeneração do núcleo, alteração do volume nuclear e ocorrência do aumento de melanomacrófagos.

Para análises dos hepatócitos, as lâminas foram visualizadas e fotografadas (100x) no foto microscópio do Laboratório de Processamento Histológico da Universidade de Rio Verde (UniRV). Também foi verificada a ocorrência de alterações no volume do núcleo, onde foram analisadas 10 células por campo entre os diferentes cortes totalizando 50 células para cada tratamento. Os parâmetros analisados foram: Área, Perímetro e Raio do núcleo.

Para verificar alterações comportamentais foram feitas três observações, no período diurno, logo após 24, 96 e 168 horas, nos 3 tratamentos, durante 15 minutos cada. Foram observadas as seguintes manifestações: alterações na natação, localização dos peixes no aquário, distribuição no aquário, animais mortos e estáticos.

Resultados e Discussão

1. Análise comportamental

Os peixes do grupo controle apresentaram natação ativa e coordenada e localização preferencial no terço médio inferior do aquário.

As manifestações comportamentais dos peixes nos dois tratamentos foram similares, porém diferente do grupo controle. Os peixes permaneceram preferencialmente localizados na parte inferior do aquário, deslocando-se pouco e com movimentos lentos das nadadeiras. O reflexo de fuga foi mantido quando instigados, mas, permaneceram aglomerados e movimentando-se na mesma direção.

No aquário contendo resíduos domésticos provenientes do córrego sapo, foram registradas duas mortes após um período de 96 horas (4 dias).

A ocorrência de alterações de padrões de comportamento normal se manifesta em resposta a tentativa de adaptação e sobrevivência dos indivíduos no meio (Souza-Filho 2011).

2. Histologia do fígado

As análises histológicas do tecido hepático dos tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle que teve suas células normais sem nenhuma alteração aparente (Figura 1A). Os hepatócitos de *Poecilia reticulata* são células arredondadas com citoplasma claro, apresentando um núcleo esférico, basófilo, situado geralmente na porção central da célula e de limites nítidos. Apresentam, ainda, nucléolo único, bem evidente e central.

Os peixes expostos ao efluente da indústria alimentícia apresentaram nas primeiras 24 horas maior densidade de melanomacrófagos e vacuolização (figura 1D e E).

Após, em 96 horas além destas alterações, também ocorreram hiperemia e hemorragia (figura 1C e B). Porém, no período de 168 horas, além das alterações já citadas anteriormente, as células hepáticas se mostraram aparentemente regeneradas (figura 1F).

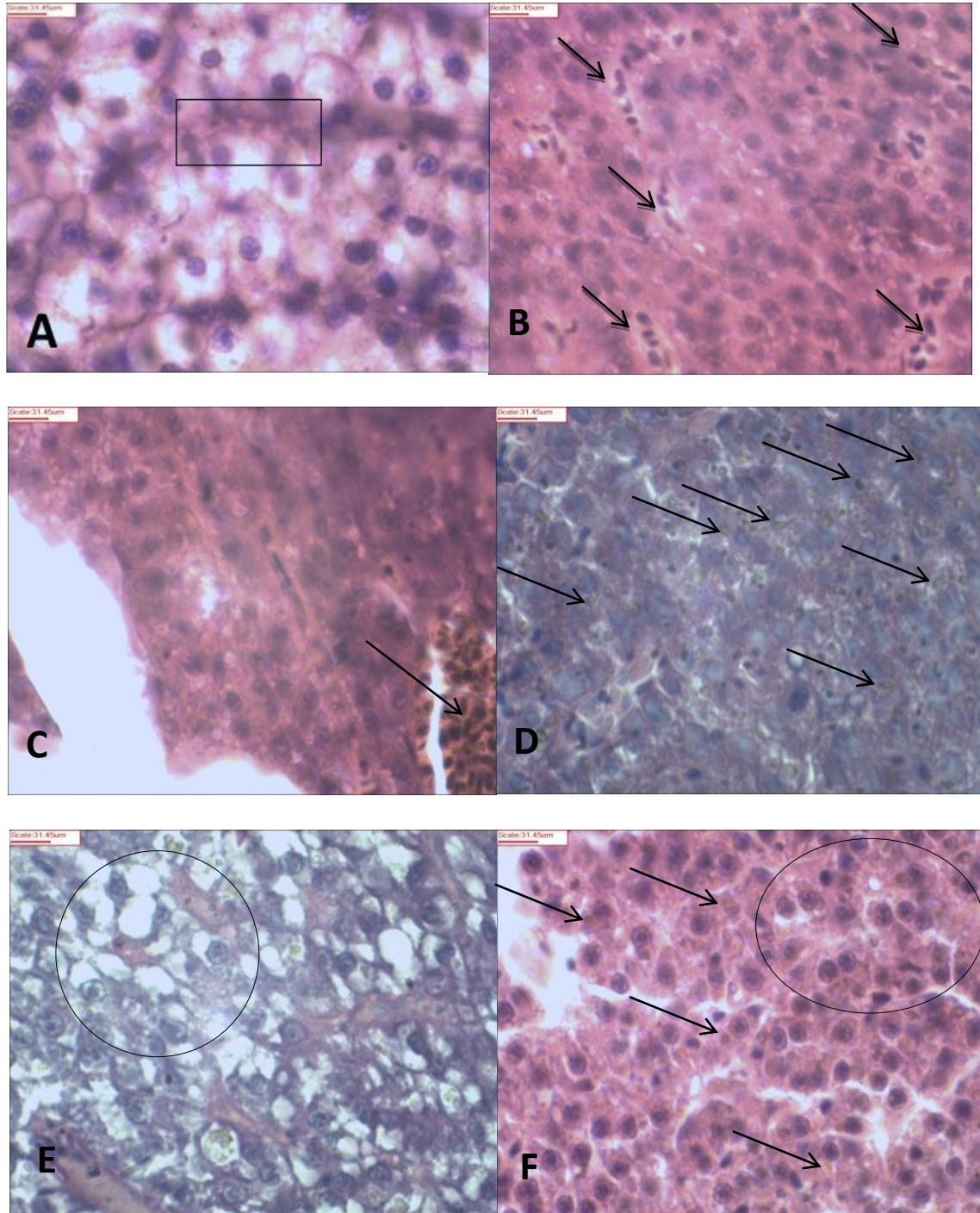


Figura 1 – Fotomicrográfica de tecido hepático de *Poecilia reticulata* expostos ao efluente de uma indústria alimentícia. A) Controle negativo- Células normais (Circulo), Vaso sanguíneo (Retângulo), B) Hemorragia, C) Hiperemia, D) Melanomacrófagos, E) Vacuolização, F) Melanomacrófagos (setas), Regeneração das células hepáticas (Circulo). Coloração HE. Aumento 100x.

As amostras do córrego do Sapo apresentaram em suas células hepáticas vacuolização, degeneração do citoplasma, hiperemia e aumento de melanomacrófagos (Figura 2). Todas as alterações ocorreram após as 24 horas de exposição com exceção do aumento de melanomacrófagos que se mostrou mais evidente em 168 horas de exposição.

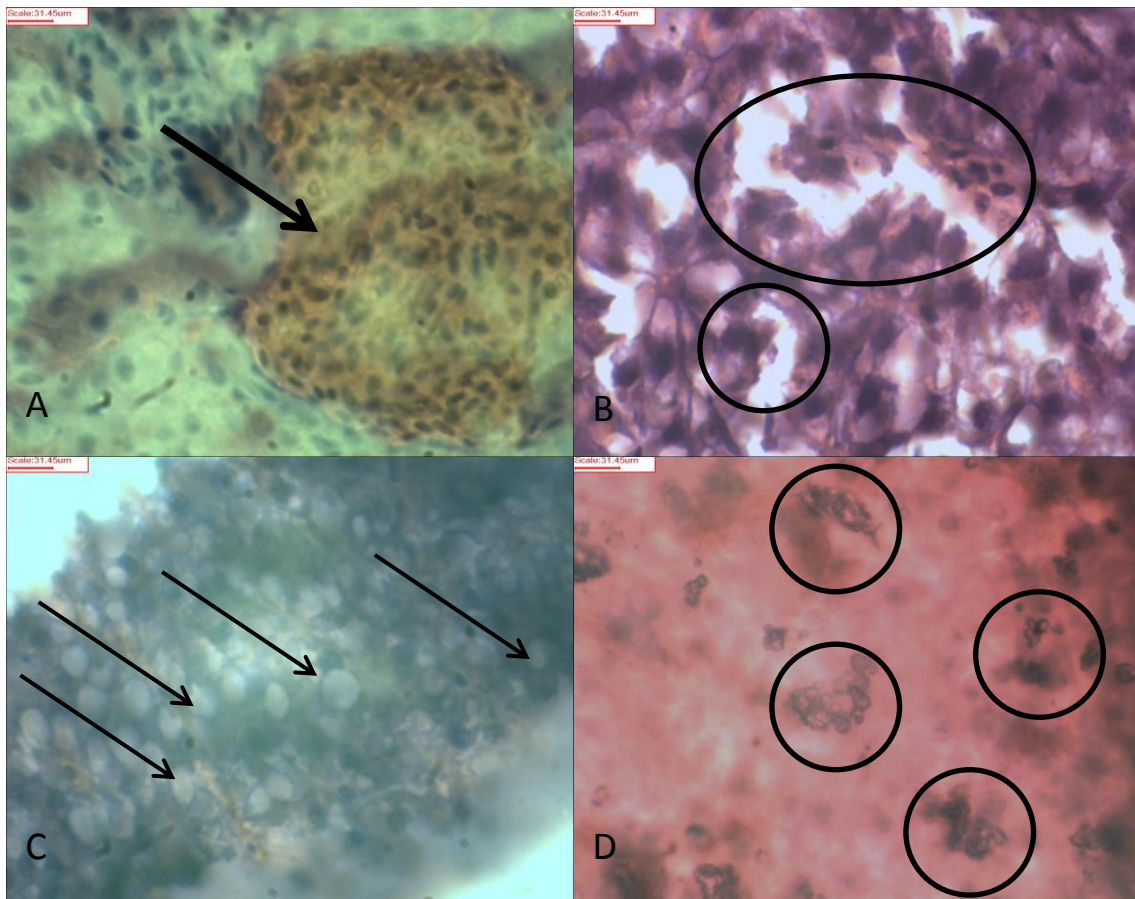


Figura 2 – Fotomicrográfica de tecido hepático de *Poecilia reticulata* expostos a águas contaminadas com esgoto doméstico. A) hiperemia, B) degeneração citoplasmática, C) vacuolização, D) Melanomacrófagos. Coloração HE. C. D. Aumento 100x

A ocorrência dessas alterações são comumente relatadas por vários autores como, Silva (2008), Robbins; Cotran, (2005), Gingerich, (1982), Dutta, et al., (1993) e Hartley et al. (1996).

Segundo Silva (2008), o fígado é um órgão que metaboliza e excreta substâncias xenobióticas, sendo assim, um dos primeiros órgãos a entrar em contato com os contaminantes.

As alterações histológicas observadas nos tratamentos estão relacionadas aos processos de intoxicação sendo que a extensão e gravidade das lesões são proporcionais

ao tipo, duração, severidade da agressão e ao e estado fisiológico da célula envolvida (Robbins; Cotran, 2005). De acordo com características morfofisiológicas peculiares do fígado dos peixes Gingerich, (1982) sugere que este órgão especialmente susceptível à ação de produtos químicos, pois apresenta fluxo sanguíneo mais lento em relação aos mamíferos. De acordo com o mesmo autor, o fluxo biliar é aproximadamente 50 vezes mais lento que o de mamíferos, tornando mais vagarosa à depuração de produtos tóxicos. Conseqüentemente os elementos tóxicos que chegam ao fígado pela corrente sanguínea apresentarão efeitos mais prolongados do que nos mamíferos.

Devido à função de acumular substâncias tóxicas a fim de impedir a passagem para outros órgãos, o fígado também é alvo das ações tóxicas dessas substâncias, podendo sofrer uma série de alterações morfológicas e fisiológicas, podendo até mesmo prejudicar sua função vital e levar o animal a morte (Faria, 2009). De acordo com Dutta, et al., (1993), tais alterações podem indicar degeneração dos processos intracelulares dos hepatócitos, por consequência de desempenhar funções importantes na desintoxicação do animal.

Em todos os tratamentos observou-se, aumento da frequência de melanomacrófagos no tecido hepático. A ocorrência destas células assim como seu aumento é esperada e foi relatada em vários estudos (Campos, Moraes e Moraes, 2008; Castro et al., 2014; Bombonato et al., 2014. Segundo Hartley et al. (1996) os melanoacrófagos acumulam pigmentos tais como a melanina que por sua vez pode ter a capacidade de proteger as células contra poluentes. Diz também que o nível elevado de melanina pode proteger contra os danos celulares, pois, absorve os radicais livres que são tóxicos para as células. Apesar de não ter sido objetivo deste estudo foi observado um significativo aumento da pigmentação das brânquias e do peritônio.

3. Morfometria do núcleo

A análise de morfometria do núcleo apresentou uma discreta diminuição entre os parâmetros analisados nos tratamentos com resíduo doméstico e industrial em relação ao grupo controle (Figura 3).

No tratamento com resíduo industrial as médias foram: 259,94 μm de Área, 56,66 μm de Perímetro e 9,02 μm de Raio do núcleo. No resíduo doméstico foram: 289,78 μm de Área, 60,16 μm de Perímetro e 9,57 μm de Raio do núcleo. Grupo controle: 381,46 μm de Área, 69,03 μm de Perímetro e 10,99 μm de Raio do núcleo.

Alterações no volume do citoplasma e núcleo dos hepatócitos são frequentes e ocorrem em resposta a uma substância estressora (Souza- Filho 2011).

São frequentemente citadas hipertrofia do citoplasma e do núcleo e de acordo com Takshima e Hibiya (1995) apud Souza Filho (2011), estas alterações são decorrentes do aumento da atividade hepática. Os menores valores encontrados nos tratamentos podem ser atribuídos, a uma diminuição da atividade dos hepatócitos mediante a grande quantidade de alterações observadas.

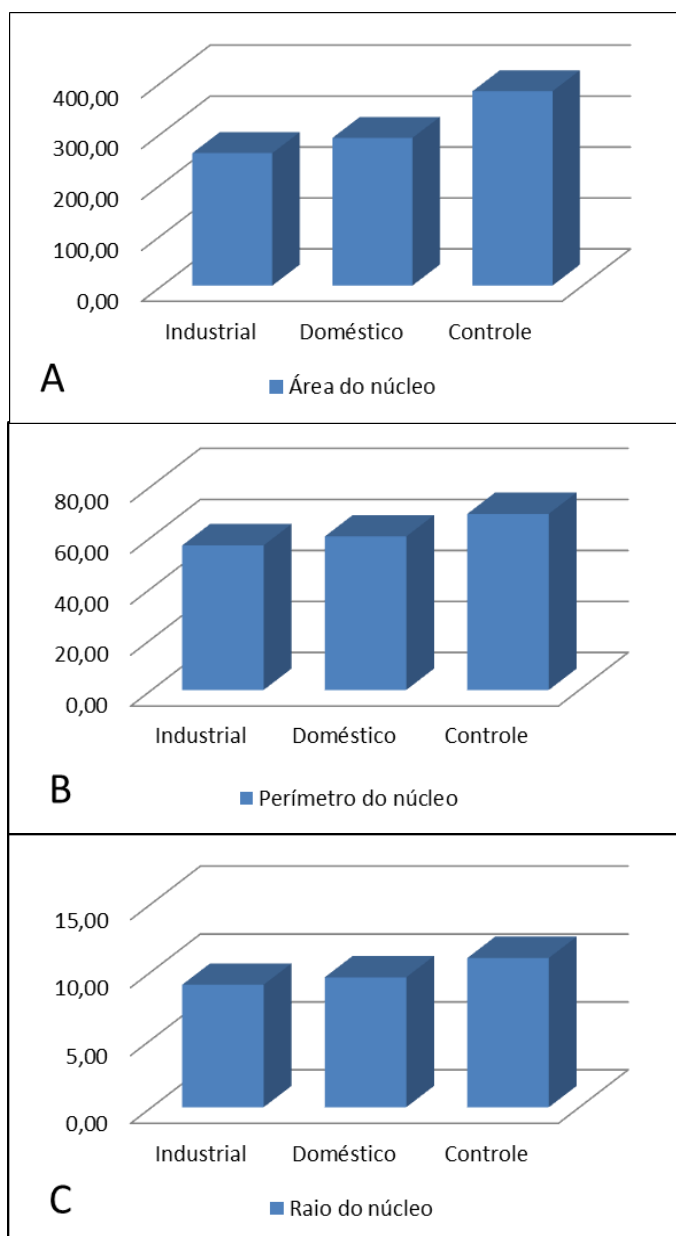


Figura 3. Morfometria do núcleo de *Poecilia reticulata* expostos a águas contaminadas com esgoto doméstico e industrial. A) Área do núcleo, B) Perímetro do núcleo, C) Raio do Núcleo.

Conclusões

Em ambos os tratamentos, ocorreram alterações. Incidência de vacuolização, degeneração do citoplasma, hiperemias, hemorragias e aumento de melanomacrófagos. Ressalta-se também que após o período de 168 horas, aparentemente houve regeneração das células hepáticas do animal.

Foram observadas também, alterações comportamentais dos animais em estudo, apresentando natação lenta e ficando todos agrupados na parte inferior do aquário com movimentos lentos das nadadeiras.

Sendo assim pode-se dizer que, as alterações encontradas nas análises do fígado de *Poecilia reticulata*, ocorreram devido à exposição as águas contendo poluentes domésticos e industriais.

O *Poecilia reticulata* se mostrou sensível aos poluentes tanto de origem doméstica e de origem industrial, em relação ao grupo controle.

Referências Bibliográficas

ALLEN, G.R. **Field guide to the freshwater fishes of New Guinea**. Christensen Research Institute, Madang, Papua New Guinea. 1991. Disponível em: <http://filaman.ifmgeomar.de/References/ReferencesList.Cfm?Author=&Year=&Title=&Source=&RefNo=2847&database=FB> Acesso dia 02/06/2015.

BEESON, D.R.; POWELL, J.M.; LEWIS, M.C. Effects of pollution on freshwater organisms. *Wat. Environ. Res.*, v.5. 1092-1099p.

BOMBONATO, M. T. S.; ROCHEL, S. S.; VICENTINI, C.A e VICENTINI, I. B. F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. *Acta Sci. Biol. Sci. Maringá*, v. 29, n. 1, p. 81-85, 2007 MELANO

CAMPOS, C. M; MORAES, J. R. E; e MORAES, F. R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17, 4, 200-205 (2008)

CASTRO, J.S.; SILVA, J.S.; FREITAS, L.C e. CARVALHO-NETA, R.N.F. **Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA).** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.6, p.1687-1694, 2014

DUTTA, H.M. et al. Histopathological changes induced by Malathion in the liver of freshwater catfish heteropneustes fossilis (Bloch). *B. Environ. Contam. Tox.*, New York, v. 51, p. 895-900, 1993.

FARIA, J. C. N. D. M. (2009). Avaliação histopatológica, histoquímica e morfométrica dos efeitos da toxicidade aguda do herbicida roundup® nas brânquias e no fígado do peixe *Poecilia vivipara*.

GINGERICH, W.H. Hepatic toxicology of fishes. In: WEBER, L.F. (ed.) *Aquatic toxicology*, New York: Plenum Press. 1982. p. 55-105.

HARTLEY, W.R. et al. Liver Lesions in Gar Fish (Lepisosteidae) as Biomarkers of Exposure. *Mar. Environ. Res.*, Oxford, v. 42, p. 217-221, 1996.

KISS, I., Kováts, N., Svalay, T., Evaluation of some alternative guideline for risk assessment of various habitats. *Toxicol. Let.*, 2003, v. 140-141, p. 411-417.

LIMA, A. O. Aquicultura Ornamental: O potencial de mercado para algumas espécies de peixes ornamentais. *Panorama da Aquicultura*. v. 13, n. 78, p:28-29, 2003.

MILIOU, H; ZABOUKAS, N.; MORAITOU-APOSTOLOTOULO,M. **Biochemical composition, growth, and survival of the Guppy, *Poecilia reticulata*, during chronic sublethal exposure to Cadimium.** *Arch.Environ. Contam.Toxicol.*,v.35.58-63p.

ROBBINS, S.; COTRAN, R.S. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. (Eds) Elsevier: Rio de Janeiro. 2005. 1592p.
SILVA, C. P. D. Community structure of in urban and natural streams in the

Central Amazon. *Amazoniana*. v. 8, n. ¾, p. 221-236, 1995.

SILVA, L. D., Nascimento, V., Santos, S.C., Morais, J.O.R., Sabóia-Morais S.M.T.,
Análise morfológica das células do cloro de *Poecilia vivípara* expostas a frações da
folha e da casca do caule de *Caryocar brasiliensis*. *Acta Scintiarum* (2003), 25(1): 195-
201.

SILVA, M. D. Biomonitoramento de uma reserva particular do patrimônio natural
(RPPN) através da aplicação de biomarcadores bioquímicos, morfológicos e genéticos
em *Astyanax* sp. Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre em ecologia
e conservação, Universidade Federal do Paraná, 2008.

SOUZA FILHO, J. D. (2011). Efeitos tóxicos e genotóxicos do herbicida Roundup
Transorb® em Guppy (*Poecilia reticulata*) submetido a tratamento agudo.

SKELTON, P. H. **A complete guide to the freshwater fishes of southern
Africa.** Southern book publishers. 1993. 388p.

TOLLEFSEN, K.E., BRATSBERG, E., BOYUM, O., FINNE, E.F., GREGERSEN, I.K., HE
GSTEH, N., SANDBERG, C., HYLLAND, K. **Use of fish in vitro hepatocyte assays to
detect multi-endpoint toxicity in Slovenian river sediments.** *Marine
Environmental Research*. v.62.2006.