

Análise histológica da hepatotoxicidade do herbicida Roundup Transorb® em *Poecilia reticulata* sob diversos tempos de exposição

Ana Paula Rezende dos SANTOS¹, Thiago Lopes ROCHA¹, Joana Cristina Neves de Menezes FARIA¹, Simone Maria Teixeira de SABÓIA-MORAIS^{1,2}

¹Depto. de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFG.

²Profa. Dra. / Orientadora – Depto. de Morfologia – ICB / UFG

Email: anapaula.bio10@gmail.com

Palavras-chave: Fígado, histopatologia, herbicida, Guaru.

Introdução

Os herbicidas são químicos fitotóxicos usados para destruir ou inibir o crescimento de ervas daninhas, favorecendo o desenvolvimento das plantações de cultura (Gupta, 2007; Manno, 2007). O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] é um tipo de herbicida que foi desenvolvido pela Monsanto Company em 1970 e tem se tornado o mais utilizado no mundo desde sua introdução em 1974, sendo não seletivo e muito efetivo (Duke & Powles, 2008; Cerdeira & Duke, 2006).

E devido ao aumento da contaminação de ambientes aquáticos por metais pesados e componentes orgânicos (hidrocarbonos e pesticidas) observa-se o maior interesse nos efeitos de diferentes contaminantes nos organismos aquáticos (Romero et al., 2010). Nesse sentido, diversos trabalhos têm analisado o potencial toxicológico de herbicidas que contém o glifosato como princípio ativo em peixes (Gluszczak et al., 2007; Jiraungkoorskul *et al.*, 2002; Modesto & Martinez, 2010). Tendo em vista que esses animais são considerados bioindicadores do ambiente aquático pela sua capacidade de responder a poluentes (Padmini, 2008).

O modelo biológico utilizado será o *Poecilia reticulata* (Peters, 1859), um peixe pequeno bentopelágico, não migratório, e que ocupa uma ampla gama de habitats, como estuários, lagos, lagoas, pequenas valas e canais (Skelton, 1993). É considerado como adequado para ser utilizado como organismo teste em estudos ecotoxicológicos com agrotóxicos (Manrique, 2009) e apresenta dimorfismo sexual, que facilita a identificação do gênero e a realização de estudos comparativos entre eles. Além disso, esta espécie é recomendada como organismo teste pela American

Public Health Association (APHA, 1991) e pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1992).

A utilização de biomarcadores histopatológicos a fim de determinar os efeitos de contaminação ambiental é considerada como uma metodologia de grande relevância, pois demonstra o verdadeiro estado de saúde do animal (Costa et al. 2011). E tem ajudado a estabelecer a relação causa e efeito, entre a exposição a contaminantes e várias respostas biológicas (Boran et al., 2010).

As análises qualitativas das histopatologias são importantes para a detecção de alterações teciduais, que possam ser bioindicadores do estado fisiológico do animal. Entretanto, análises semi quantitativas são necessárias quando se deseja integrar dados biológicos com parâmetros ambientais mensuráveis, a fim de identificar a relação causa efeito (Costa et al., 2011).

Material e métodos

Fêmeas de *P. reticulata* foram coletados na piscicultura da Estação de Tratamento de Efluentes da empresa de saneamento de água de Goiânia – Goiás – Brasil (Saneamento de Goiás – SANEAGO), coordenadas: 16° 37' 59" S e 49° 15' 44" W. A exposição foi realizada em cinco aquários, sendo um controle com três litros de água sem o herbicida, e os demais aquários com três litros de solução de RDT na concentração de 3.5µL/L, contendo oito animais em cada. Os grupos experimentais foram organizados da seguinte forma: T0 (grupo controle), T4 (grupo exposto/4 horas), T8 (grupo exposto/8 horas), T12 (grupo exposto/12 horas), T24 (grupo exposto/24 horas).

Os testes foram realizados em duplicata como recomenda o guia da OECD (1992).

As amostras de fígado foram dissecadas e fixadas em solução fixadora de paraformaldeído tamponado a 10% por duas horas, lavados três vezes a cada cinco minutos em tampão fosfato de sódio e depois transferidos para etanol 70%, onde permaneceu até o processamento histológico. Parte do material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, incluso em parafina (Paraplast/McCormick), seccionados a 3 µm e corados por Hematoxilina e eosina (H&E), para evidenciar a morfologia tecidual, e diagnosticar as alterações histopatológicas. Para a

histoquímica dos carboidratos os cortes foram tratados por Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Ácido Periódico de Schiff mais a enzima amilase (PAS + amilase), para detecção de glicoconjugados neutros e para controle negativo da presença de glicogênio, respectivamente. Sendo preparadas três lâminas histológicas coradas por HE e duas para cada reação histoquímica.

Resultados e discussão

A morfologia do fígado dos animais do grupo controle demonstrou que não há organização dos hepatócitos em lóbulos ou ácinos, ou mesmo dos ductos, vasos e artérias na tríade portal como nos mamíferos. Os hepatócitos apresentam citoplasma homogêneo, formato poliédrico e em sua maioria com nucléolo evidente. Observa-se em alguns animais o pâncreas exócrino invadindo o parênquima hepático, sendo referido como pâncreas intrahepático.

As alterações hepáticas observadas foram tempo dependente, ou seja, apresentaram-se mais acentuadas de acordo com o aumento do tempo de exposição dos animais (Fig. 1).

Para os grupos expostos por quatro horas, notou-se o aumento da presença de melanomacrófagos e de vacúolos lipídicos, além disso, houve processos de hemorragia, dilatação dos vasos sanguíneos, e somente nas fêmeas, para este tempo, foi possível observar infiltrações de leucócitos.

O grupo exposto por oito horas apresentou pleomorfismo nuclear, principalmente com núcleos picnóticos e lesão granulomatosa. Os focos de hemorragia e a dilatação dos vasos sanguíneos tiveram aumento considerável e mantiveram-se estável os focos de melanomacrófagos em relação ao grupo T4. Além disso, houve a ampliação de infiltrado leucocitário e lipídose.

A necrose e a eosinofilia citoplasmática foram observadas pela primeira vez no grupo T12, destacando-se nesses grupos o aumento na dilatação dos vasos sanguíneos e de vacúolos lipídicos.

Em T24 somente os melanomacrófagos e os focos eosinofílicos não tiveram aumento importante, sendo que as demais alterações tiveram considerável ampliação em sua frequência, com destaque para a lipídose e os focos necróticos.

Pela análise de PAS pode-se notar a diminuição do glicogênio hepático devido à pouca marcação observada nos grupos tratados em relação aos controles, tanto em machos quanto em fêmeas, e pelo controle negativo realizado pelo PAS+amilase confirmou-se que o a marcação realizada por PAS se tratava de glicogênio.

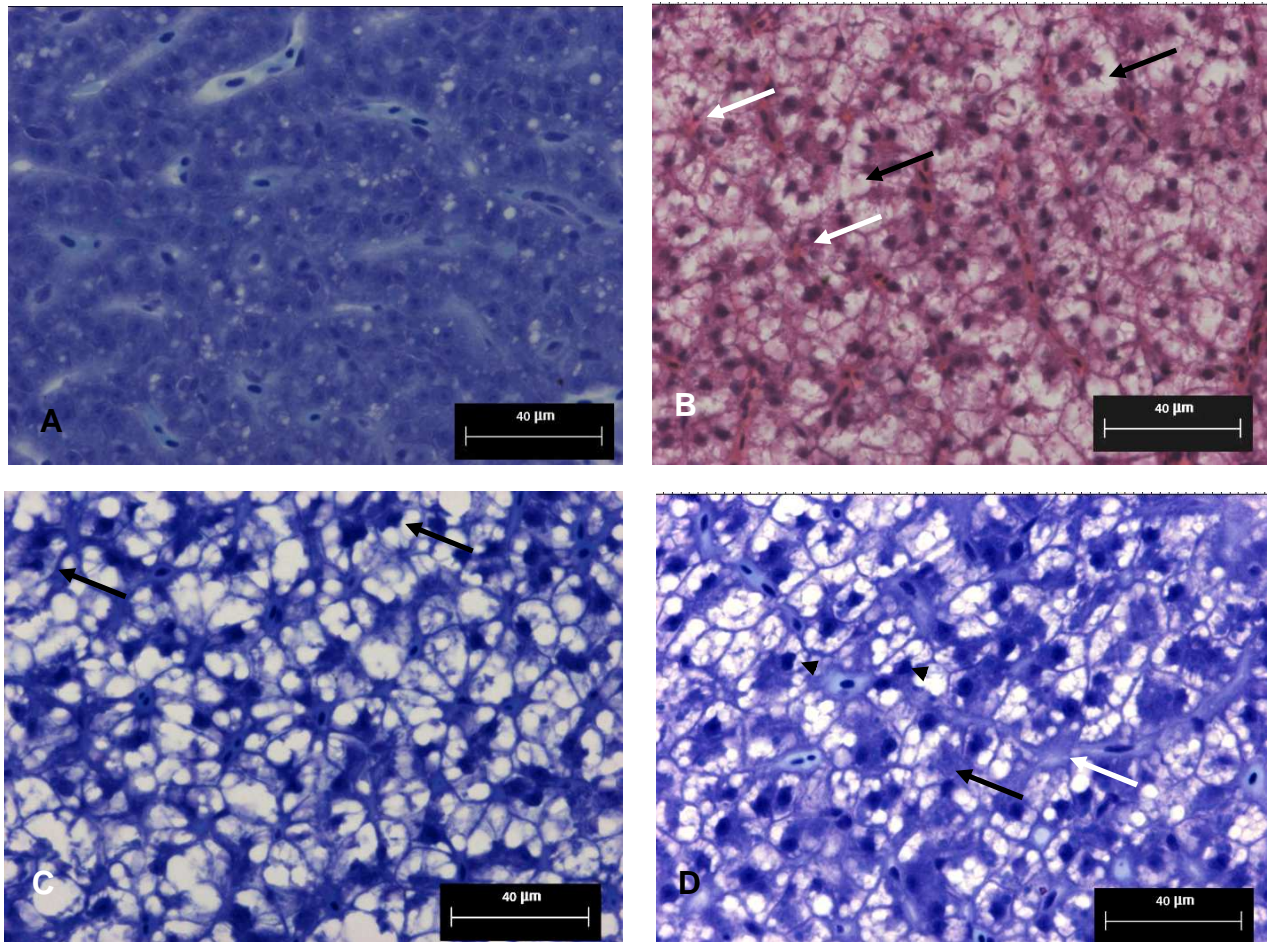


Fig. 1. - Perfil histopatológico observado nos grupos experimentais. (A) T0 controle: os hepatócitos com arranjo estrutural normal, e pequenos vacúolos (seta) AT, aumento: 400x; (B) T4: hepatócitos pouco vacuolizados (seta preta), com alguns focos hemorrágicos (seta branca), H&E, aumento 400X; (C) T8: hepatócitos moderadamente vacuolizados, com focos hemorrágicos (seta preta) e melanomacrófagos (seta branca), H&E, aumento 400X; (D) T24: nota-se lesões granulomatosas (seta branca), núcleos picnóticos (cabeça de seta) e necrose de hepatócitos (seta preta), AT, aumento: 400x. Barra: 40 µm.

Conclusões

Este estudo ressalta a importância do uso da investigação histopatológica, e histoquímica aliada à quantificação dos dados, para avaliar o efeito de herbicidas em peixes, considerando-o como método válido no diagnóstico da toxicidade de xenobióticos no organismo animal.

E por meio das análises histológicas e histoquímicas realizadas observou-se que a exposição ao herbicida proporcionou alterações severas no tecido hepático, confirmando que este é órgão alvo do metabolismo do herbicida Roundup Transorb®.

Desse modo os resultados demonstram também que o peixe *Poecilia reticulata* é um bom modelo biológico para os estudos de toxicidade, tendo em vista que o comportamento histopatológico diagnosticado é similar ao encontrado em outras espécies aquáticas amplamente estudadas.

Instituição de fomento: CNPq e CAPES

Referências Bibliográficas

- APHA. 1991. Toxicity tests methods for aquatic organisms. In: Standart methods for the examination of water and waste water. 17.ed. Washington,. p. 689-819.
- Boran, H., Capkin, E., Altinok, I., Terzi, E., 2010. Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout. *Experimental and Toxicologic Pathology* doi:10.1016/j.etp.2010.08.003.
- Cerdeira, A.L., Duke, O.S. 2006. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. *J. Environ. Qual.* 35, 1633-1658.
- Costa, P.M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DeIValls, T.A., Costa, M.H., 2011. Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. *Marine Pollution Bulletin* 62, 55–65.
- Duke, S.O., Powles, S.B., 2008. Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci.* 64, 319-325.
- Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol* 146, 519-524.
- Gupta, P.K. Toxicity of herbicides pp. 567-586
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia* 28, 121-127.
- Manno, M. 1996. Herbicides. *Human Toxicology*, J. Descotes (Ed.)
- Manrique, W. G., 2009. Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o Guaru (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático. Dissertação de mestrado em aqüicultura – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1992. Fish, acute toxicity test. In: *OECD Guideline for Testing of Chemicals*. 203.
- Padmini, E., Geetha, B. V., Rani, M.U., 2008. Liver oxidative stress of the grey mullet *Mugil cephalus* presents seasonal variations in Ennore estuary. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41, 951-955.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787.
- Romero, D.M., Molina, M.C.R., Juárez, A.B., 2010. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, doi:10.1016/j.ecoenv.2010.10.034
- Skelton, P. H., 1993. A complete guide to the freshwater fishes of Southern Africa. South Africa: Southern Book Publishers, Halfway House., pp:388