



Morfologia do fígado de tilápia-do-nilo como biomarcador de exposição ao alumínio

Vagne de Melo Oliveira¹

¹Médico Veterinário – UFRPE. E-mail: vagne_melo@hotmail.com

Resumo: A análise morfológica de tecidos fornece informações importantes a respeito da fisiopatologia celular. Assim, padrões teciduais e anatômicos podem ser analisados como biomarcadores de exposição de contaminantes em peixes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a integridade do fígado de tilápias do Nilo expostas a concentração de 1 ppm de sulfato de alumínio. Foram cultivados 10 peixes durante um período de 456 horas, sendo 120 horas de adaptação e 336 de exposição ao contaminante, em aquários com 90 litros de água, todos com alimentação *ad libitum*, troca dinâmica da água (80%) a cada 24 horas com reposição do metal nos aquários de exposição, com limpeza periódica para evitar sujidades e fotoperíodo de 12:12. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais, sendo o controle (sem exposição) e exposto a 3 ppm de sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$). Após o período de exposição, as brânquias foram retiradas para procedimentos histológicos. As peças foram fixadas em solução de Bouïn por 24 horas, desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. As peças foram incluídas de tal maneira que puderam ser observadas ao microscópio de luz, cortes transversais. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 5 micrômetros (μm), os cortes foram coradas pela hematoxilina e eosina (H.E), observado e fotografado em microscópio Olympus BX-51. Não foi observado qualquer tipo de alteração morfológica anormal para as vísceras estudadas. Concluímos que, nessa concentração e durante esse intervalo de tempo o sulfato de alumínio não é prejudicial a morfologia do fígado.

Palavras-chave: biomarcador, fígado, morfologia.

1. INTRODUÇÃO

Os metais pesados são substâncias quimicamente reativas e bioacumuláveis, ou seja, os organismos não são capazes de eliminá-las; que possuem número atômico superior a 22, situados entre o cobre (Cu) e o chumbo (Pb) na tabela periódica, tendo peso atômico entre 63,546 e 200,590 e densidade superior a $4,0 \text{ g/cm}^3$ (BAIRD et al., 2002). Esses elementos ocorrem naturalmente em pequenas concentrações, na ordem de partes por bilhão (ppb) a partes por trilhão (ppt), no meio ambiente e na matéria viva (FARIAS et al., 2007). Alguns metais tomam parte do metabolismo fisiológico, sendo considerados essenciais por atuarem como componentes funcionais, estruturas, e regulatório de numerosas biomoléculas no metabolismo, podendo ser classificados como potencialmente tóxicos (p. ex.: arsênio, cádmio, mercúrio, chumbo), provavelmente essenciais (p. ex.: níquel, vanádio, cobalto) e essenciais (p. ex.: cobre, zinco, ferro, manganês). Estes elementos tóxicos podem ser muito prejudiciais, mesmo em baixas concentrações, quando ingeridos durante um longo período de tempo (TUZEN, 2003; ULUOZLU et al. 2007).

É crescente o número de pesquisas acerca dos metais e suas consequências para a biota aquática. De 2000 até 2010 foram registrados vários estudos na tentativa de elencar os principais elementos metálicos envolvidos na poluição marinha - os quais os principais trabalhos são listados na tabela 1 -, e seus efeitos toxicológicos na biota em geral. Dentre estes elementos, cádmio (Cd), prata (Ag), cobre (Cu), cobalto (Co), cromo (Cr), mercúrio (Hg), manganês (Mn), chumbo (Pb) e zinco (Zn) merecem destaque por já terem sido citados pela sua potencialidade tóxica, sobretudo ao atingir os sistemas nervoso, gastrointestinal e respiratório das espécies acometidas, além de ocasionar danos carcinogênicos quando do consumo de pescado contaminado por estes metais (BISINOTI et al., 2004).

Dentre os metais, o alumínio é o mais abundante da crosta terrestre, e o terceiro elemento mais abundante depois do oxigênio e silício (ATWOOD e YEARWOOD, 2000), ocorrendo apenas na forma combinada. É usado extensivamente em utensílios de cozinha, móveis, automóveis e na mineralização, além de sua utilização no tratamento de água, na forma de sais - sulfato de alumínio



($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), agindo de forma floculante na remoção de detritos (CAMARGO et al., 2009). Por causa da distribuição ambiental, é considerado ubíquo (NAYAK, 2002; GOURIER-FRÉRY e FRÉRY, 2004). É nocivo para o ecossistema aquático, sendo responsável por eventos de toxicidade com graves consequências ecológicas (CORREIA et al., 2010). Este metal pode se acumular na mitocôndria (KUMAR et al., 2009), no lisossoma, no núcleo da célula e/ou na cromatina (NAYAK, 2002).

O organismo aquático quando exposto ao contaminante tende a acumular esses xenobióticos em células e tecidos – como no tecido hepático, por exemplo –, acarretando em alterações enzimáticas responsáveis por processos vitais, podendo ocasionar aumento da atividade enzimática no meio extracelular por extravasamento da proteína para este meio; aumento da atividade enzimática no meio extracelular ou intracelular por ativação enzimática, através da interação direta do agente químico com a enzima; aumento da atividade enzimática intracelular por indução na síntese da proteína; diminuição da atividade no meio extracelular ou intracelular por inibição, através da interação direta do agente químico com a proteína; ou uma diminuição da atividade no meio intracelular por comprometimento da membrana celular e extravasamento da proteína (ARAGÃO e ARAÚJO, 2008; JONSSOM e AOYAMA, 2010).

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo; entretanto, a determinação quantitativa destes parâmetros usados como indicadores biológicos ou biomarcadores, só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância. Desta forma, o biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde (AMORIM, 2003). Independente da finalidade e aplicação dos biomarcadores, eles podem ser classificados em 3 tipos, a saber: os *biomarcadores de exposição*, que podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna; os *biomarcadores de efeito*, que podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição e absorção da substância química. Dessa forma, a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeitos contribui para a definição da relação dose-resposta; e por fim, os *biomarcadores de suscetibilidade*, que permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos (VAN DER OOST et al., 2003).

As alterações histopatológicas são excelentes ferramentas de marcação biológica de exposição a agentes químicos por serem compatíveis às respostas bioquímicas, principalmente alterações nas cinéticas enzimáticas. Neste sentido, análises de vísceras como brânquias, fígado, estômago e/ou intestino podem subsidiar num processo de investigação biológica. A análise morfológica de tecidos também fornece informações importantes a respeito da fisiopatologia celular. Assim, padrões bioquímicos, teciduais e anatômicos podem ser analisados como biomarcadores de exposição de contaminantes em peixes e outros organismos aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003). O objetivo deste trabalho foi avaliar a integridade dos rastros brânquias de tilápias do Nilo expostas a concentração de 1 ppm de sulfato de alumínio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram cultivados 10 peixes, machos e fêmeas, durante um período de 456 horas, sendo 120 horas de adaptação e 336 de exposição ao contaminante, em aquários com 90 litros de água, todos com alimentação *ad libitum*, troca dinâmica da água (80%) a cada 24 horas com reposição do metal nos aquários de exposição, com limpeza periódica para evitar sujidades e fotoperíodo de 12:12. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais, sendo o grupo controle (sem exposição ao metal: 10,28 cm; 22,13 g; 27,29°C; pH 6,50; 80,48% OD) e grupo exposto a 1 ppm de sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) (10,19 cm; 38,0 g; 27,38°C; pH 6,13; 77,77% OD). Após o período de exposição, o fígado de todos os peixes foi retirado para procedimentos histológicos. As peças foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas, desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. As peças foram incluídas de tal maneira que puderam ser observadas ao microscópio de luz, cortes transversais. Os blocos foram cortados em micrótomo

ajustado para 5 micrômetros (μm), os cortes foram coradas pela hematoxilina e eosina (H.E), observado e fotografado em microscópio Olympus BX-51. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fígado dos teleósteos é um órgão multifuncional responsável pela conversão do alimento, produção da vitelogenina durante o crescimento gonadal e desintoxicação de compostos estranhos. Alterações como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos vasos sinusóides e neoplasmas podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, desta forma, considerados como indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (FLORES-LOPES e MALABABA, 2007), ocupante de uma posição central no metabolismo do organismo (SANTOS et al., 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; RODRIGUES, 2009). Estudando indicadores histopatológicos em peixes, Schwaiger et al. (1997) salientaram que as alterações histopatológicas mais severas observadas no fígado são mais frequentes nos indivíduos de áreas contaminadas, mas que também ocorrem em indivíduos de áreas menos degradadas, só que em menor frequência (FLORES-LOPES e MALABABA, 2007).

Em nosso trabalho, como ilustrado nas figuras abaixo, não foi observado qualquer tipo de alteração de ordem morfológica nos hepatócitos dos peixes expostos a concentração de 1 ppm de sulfato de alumínio, como ilustrado de forma comparativa entre as figuras 1 (sem exposição) e a 2 (com exposição do metal). Também não foi observado estado de necrose das células hepáticas, sinalizando que o tempo de exposição empregado neste trabalho atrelado a exposição do metal, até a concentração utilizada (1ppm), não acarreta danos do ponto de vista histopatológico, não afetando assim a morfologia do tecido. Cada hepatócito apresenta um ou dois núcleos arredondados e centrais, com um ou mais nucléolos bem evidentes, que no caso do nosso experimento, não tiveram sua morfologia modificada por causa do metal. A organela mais evidente é o retículo endoplasmático, na forma lisa ou rugosa. Na forma rugosa aparece como corpúsculos basófilos da microscopia clássica. É nessa organela que ocorre a síntese de várias proteínas plasmáticas produzidas pelo fígado, entre as quais a albumina e o fibrinogênio do sangue. Cada célula abriga muitos perfis de complexo de Golgi, principalmente nas vizinhanças dos canalículos biliares (CAVICHIOLO, 2009).

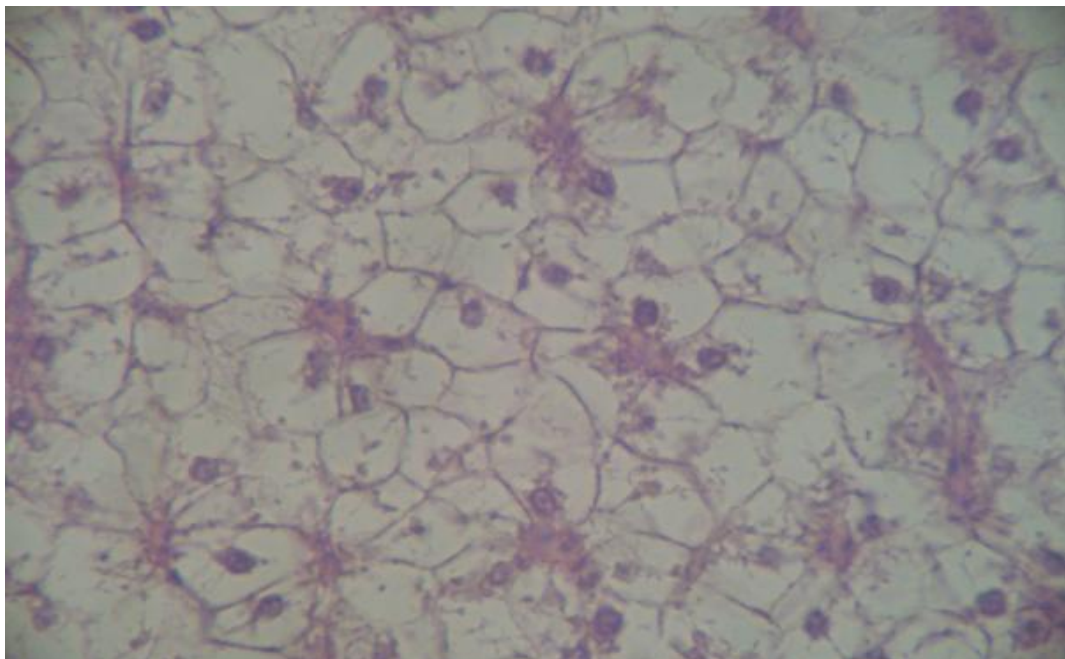


Figura 1 - Corte histológico do fígado. Sem exposição. Coloração H-E. (10x).

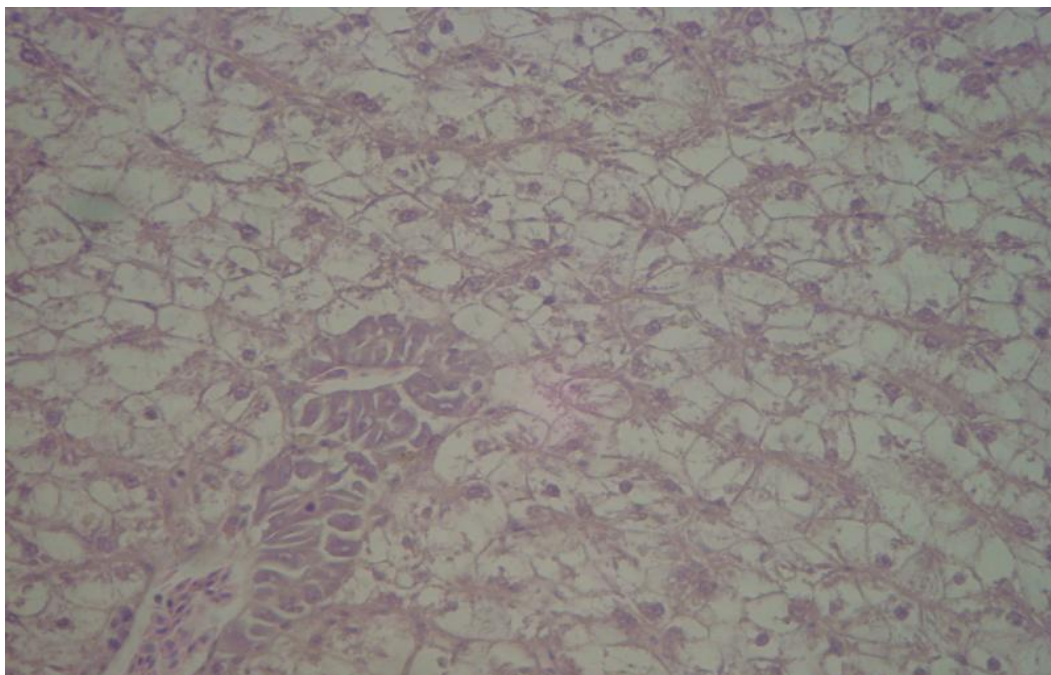


Figura 2 - Corte histológico do fígado. Grupo exposto a 1 ppm. Coloração H-E. (10x).

Os hepatócitos podem ser considerados o primeiro alvo da toxicidade de uma substância, o que caracteriza o fígado como um órgão biomarcador da poluição ambiental (SANTOS et al., 2004). desempenhando funções anabólicas, como a síntese de proteínas; e catabólicas, como metabolização do glicogênio e do nitrogênio, detoxicação, além de processos biotransformativos e tentativas de neutralização dos efeitos dos poluentes químicos ou metabólicos (WILLIAMS e IATROPOULOS, 2002; CAVICHILOLO, 2009). A literatura relata que, no fígado, o metabolismo de biotransformação e detoxicação de compostos químicos, dentre eles dos xenobióticos, está intimamente relacionado a variações individuais e fatores externos, como a temperatura, o pH, turbidez do meio, salinidade e alimentação (DER OOST et al., 2003).

4. CONCLUSÕES

As lâminas observadas não demonstraram alteração morfológica para a espécie estudada, nas condições experimentais empregadas (tempo de exposição, concentração do metal, condições de cultivo).

5. REFERÊNCIAS

- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 1-13, 2003.
- ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A., Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: Zagatto, P.A.; Bertolotti, E. (eds), **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. São Carlos. RIMA Ed., p. 117-152, 2008.
- ATWOOD, D.A.; YEARWOOD, B.C. The future of aluminum chemistry. **Journal of Organometallic Chemistry**, n. 600, p. 186–197, 2000.



BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 622 p., 2002.

BISINOTI, M.C.; YABE, M.J.S.; GIMENEZ, S.M.N. Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina, Paraná. **Revista Analytica**, n. 8, p. 22–27, 2004.

CAMARGO, M.P.; FERNADES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 40–46, 2009.

CAVICHIOLO, F. **Histologia: ferramenta relevante para estudo em peixes cultivados**. In: TAVARES-DIAS, M. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, p. 602–624, 2009.

CORREIA, T.G.; BIANCHINI, A.; MOREIRA, R.G. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, p. 461–466, 2010.

DER OOST, R. V.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environm Toxicol Pharmacol.**, v. 13, p. 57–149, 2003.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Food and agriculture organization, Roma, 196 p., 2009.

FARIAS, M. S. S.; LIMA, V. L. A.; DANTAS NETO, J.; LEITE, E. P.F; LIRA, V. M.; FRANCO, E. S. Avaliação dos níveis de boro e chumbo na água do rio cabelo – João Pessoa, Paraíba. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 4, n. 1, p. 024–031, 2007.

FLORES-LOPES, F.; MALABARBA, L.R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambarí *astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (*teleostei, characidae*) sob influência de efluentes petroquímicos. **Biociências**, v. 15, n. 2, p. 166-172, 2007.

GOURIER-FRÉRY, C.; FRÉRY, N. Aluminum. **EMC-Toxicologie Pathologie**, v. 1, p. 74–95, 2004.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives on Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 54–53, 2008.

JONSSON, C.M.; AOYAMA, H. Alteração da atividade enzimática em organismos aquáticos por poluentes de origem agrícola: uma abordagem geral e sobre a suscetibilidade da fosfatase ácida. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 920–928, 2010.



JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^aed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 533 p., 2008.

NAYAK, P. Aluminum: Impacts and Disease. **Environmental Research Section A**, v. 89, 101–115, 2002.

KUMAR, V.; BALB, A.; GILL, B.D. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. **Toxicology**, v. 255, p. 117–123, 2009.

SANTOS, A.A.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N.; RODRIGUES, E.L. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 2, p. 141–145, 2004.

SCHWAIGER, J., WANKE, R., ADAM, S., PAWERT, M., HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluated contaminant-related stress in fish. **J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.** 6, p. 75 – 86, 1997

TUZEN, M. Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 80, p.119–123, 2003.

ULUOZLU, O. D.; TUZEN, M.; MENDIL, D.; SOYLAK M. Trace metal content in nine species of fish from the Black and Aegean Seas, Turkey. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, 835–840, 2007.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57–149, 2003.

WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.J. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. **Toxicologic Patholog**, v. 30, n. 1, p. 41–53, 2002.