

Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas – MG

Diego José Nogueira^{1*}, Sumaya Cardoso de Castro¹ & Odila Rigolin de Sá²

¹ Laboratório de hidrobiologia, FESP/UEMG. Av. Juca Stockler, 1130, 37900-10635, Passos, MG, Brasil. * Tel. 3535298024
correio eletrônico: diegoj.nogueira@oi.com.br

² Professora adjunta e coordenadora do Curso de Ciências Biológicas, FESP/UEMG. Av. Juca Stockler, 1130, 37900-10635, Passos, MG, Brasil.

Abstract. Use of the gills of *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) as biomarker of environmental pollution in the reservoir UHE Furnas-MG - Brazil. The present study had the objective of analyzing the pollution effects at the UHE Reservoir in Furnas – MG, using the gills of *Astyanax altiparanae* as biomarkers, through the histopathological lesion rate in the branchial tissue and estimating the reversibility rate after being transferred to clean water during a period of 30 days. The samples of *Astyanax altiparanae* were collected in the UHE reservoir in Furnas – MG for the branchial filament excretion. Fixed with Bouin, impregnated with paraffin and stained with Hematoxylin-eosin to be analyzed in light microscopy. The average rate of branchial alterations was 31,2 and the effects on the gills were moderate to serious lesions. The gills samples kept in clean water for 30 days were analyzed by light microscopy and presented alteration rate of 20,4; and the lesions were thus classified as light to moderate. The kinds of histopathological lesions analyzed in the samples collected in the reservoir indicate that the fish are answering to a non-specific environmental contamination to a xenobiotic and the criterion of reversibility in this study has shown that the pollution and reservoir contamination, depending on the intensity, are reversible.

Key words: reservoir; biomarker; histopathological; gills; *Astyanax altiparanae*.

Resumo. O presente estudo teve o objetivo analisar os efeitos da poluição no reservatório UHE Furnas – MG, utilizando as brânquias de *Astyanax altiparanae* como biomarcadores, através do índice das lesões histopatológicas no tecido branquial e estimando o índice de reversibilidade após ser transferido para água limpa durante um período de 30 dias. Os exemplares de *Astyanax altiparanae* foram coletados no reservatório da UHE Furnas - MG e transportados vivos para o laboratório da FESP/UEMG-campus de Passos-MG para extração do filamento branquial. Fixados com Bouin, incluídas em parafina e coradas com Hematoxilina-Eosina para análise em microscopia de luz. O índice médio das alterações branquiais foi de 31,2 e os efeitos nas brânquias foram lesões moderada para grave. As brânquias dos exemplares mantidos em água limpa no período de 30 dias foram analisados por microscopia de luz apresentaram um índice de alteração de 20,4 e as lesões classificadas como leve para moderada. Os tipos de lesões histopatológicas analisados nos exemplares coletados no reservatório indicam que os peixes estão respondendo a contaminação ambiental não específica a um xenobiótico e o critério de reversibilidade nesse estudo mostrou que a poluição e contaminação do reservatório, dependendo da intensidade, são reversíveis.

Palavras-chave: reservatório; biomarcador; histopatologia; brânquias; *Astyanax altiparanae*.

INTRODUÇÃO

Os efeitos de contaminantes em peixes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos e modificações comportamentais que levam ao prejuízo do crescimento e reprodução (Adams, 1990).

Estas respostas biológicas ao estresse provocado pelos poluentes podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes e podem ser denominadas biomarcadores.

Ahistopatologia representa uma resposta de nível superior, refletindo alterações prévias nas funções fisiológicas e/ou bioquímicas (Hinton *et al.*, 1992). Tecidos como brânquias e fígado são freqüentemente utilizados em tais análises (Arellano *et al.*, 2001; Rosety-Rodríguez *et al.*, 2002).

Biomarcadores histopatológicos de exposição à xenobióticos têm sido amplamente reconhecidos como ferramentas valiosas para detecção de efeitos crônicos adversos nos organismos aquáticos, após exposição à contaminantes, ajudando a identificar órgãos alvos da toxicidade e os mecanismos de ação, (Myers *et al.*, 1998).

Além disso, os efeitos em níveis histológicos são visíveis após exposição a baixas concentrações de substâncias tóxicas em comparação a outras medidas de toxicidade, tais como mortalidade e mudanças comportamentais (Wester *et al.*, 2002).

As brânquias da maioria de peixes teleósteos são formadas por quatro arcos branquiais nos quais estão inseridas duas fileiras de filamentos branquiais ou lamelas primárias, as quais são denominadas holobrânquias. Na região interbranquial se encontram os vasos sanguíneos, músculos e terminações nervosas, sendo compostas basicamente por três tipos de células, as pavimentosas ou respiratórias, as células de cloreto (que são responsáveis pelas trocas iônicas) e as células mucosas (que desempenham a função de proteção das brânquias a partir de produção de muco) (Newman & Jagoe, 1994).

O epitélio não respiratório é formado por várias camadas de células, enquanto que o epitélio

respiratório (lamelas secundárias) é formado por duas camadas de células pavimentosas (Perry & Laurent, 1993), sendo que o epitélio respiratório representa a maior parte da superfície branquial (96%), e o restante (4%) é constituído pelo epitélio dos filamentos branquiais (não respiratório) (Laurent & Dunel, 1980).

As brânquias são responsáveis por funções vitais como respiração, osmorregulação e excreção. O contato permanente com o ambiente aquático e sua grande área de superfície são as principais razões que tomam as brânquias dos peixes um órgão-alvo da poluição. Geralmente, devido a essas características, é o primeiro órgão a reagir a condições ambientais desfavoráveis (Poleksic & Mitrovic -Tutundzic, 1994). Portanto, a utilização de biomarcadores histopatológicos pode ser uma ferramenta bastante útil para a avaliação dos efeitos da contaminação ambiental no reservatório.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da poluição no reservatório UHE Furnas - MG, utilizando as brânquias como biomarcadores; determinar o índice de alterações histopatológicas nas brânquias de *Astyanax altiparanae* causadas pela poluição ambiental e verificar se as alterações histopatológicas nas brânquias de *Astyanax altiparanae* são reversíveis após os exemplares serem transferido para água limpa durante um período de 30 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e acondicionamento dos peixes

Foram coletados dez exemplares de *Astyanax altiparanae*, popularmente chamado de Lambari-do-rabo-amarelo, no reservatório da UHE Furnas - MG, localizado a (20°40'24.05"S 46°15'42.38" O). Após a coleta os exemplares foram transportados para o laboratório de reprodução de peixes da FESP/UEMG onde cinco exemplares foram sacrificados imediatamente por secção medular tendo suas brânquias coletadas e processadas para análise em microscopia de luz e cinco exemplares permaneceram 30 dias em tanques de 500 L com água limpa, com fluxo contínuo de água e aeração constante, com foto período 12h:12h claro/escuro, temperatura de 25°C ± 1°C para verificar a reversibilidade das lesões.

Análise histopatológica e microscopia de luz

Para a análise histopatológica das brânquias foi retirado o segundo arco branquial, lavadas com solução salina 0,9%, fixado em Bouin (24 horas), lavado em álcool 70% (± 2 horas) e desidratado em banhos sucessivos de álcool 70% e 100%. Após a desidratação, amostras foram incluídas em parafina. Após a polimerização da parafina, as brânquias foram seccionadas em cortes seriados de 6 - 7 μ m efetuados em micrótomo manual Spencer A0 820 - 301 com navalha de aço, colocados em lâminas de vidro, corados com Hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio de luz.

Para avaliação das histopatologias branquiais, foi seguido um procedimento hierárquico na preparação das peças, com a finalidade de garantir a aleatoriedade amostral. Assim, a peça principal foi dividida em blocos e esses foram fracionados, retirando-se aleatoriamente um desses últimos blocos, que foi processado histologicamente. As alterações histopatológicas foram analisadas em 10 secções, num total de 50 filamentos branquiais por peixe.

Índice de alterações histopatológicas

Utilizou-se o índice IAH (Índice de alterações histológicas), utilizado por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) na avaliação de efeitos crônicos da poluição nas brânquias de três espécies de ciprídeos. Esse índice foi baseado em uma lista de alterações branquiais, e cada tipo de alteração foi classificado, conforme a severidade, em estágios I, II e III.

De acordo com os autores, os estágios foram descritos:

Estágio I: Alterações leves que permitam a recuperação da estrutura e da função dos tecidos branquiais caso haja melhoria nas condições ambientais. "Sob condições ambientais inalteradas tais lesões devem persistir e, no caso de exposições a longo prazo, as alterações provavelmente progredirão para o segundo estágio."

Estágio II: Alterações mais severas que comprometem a função dos tecidos; lesões reparáveis no caso de melhoria da qualidade da água, exceto quando grandes áreas nas brânquias forem danificadas; lesões que, em situação de poluição crônica ou de

aumento no nível de poluição ou, ainda, de deterioração de outras condições ambientais (temperatura, pH, OD, etc.), colocam em risco as funções branquiais, podendo levar a alterações do terceiro estágio.

Estágio III: Alterações que não permitem a restauração da estrutura branquial. "Mesmo com melhoria da qualidade da água, ou com fim da exposição ao dano das funções branquiais vitais e até a morte."

A partir da classificação das lesões em estágios, os autores assumiram empiricamente que a cinética das alterações tem crescimento exponencial. Então:

- Para o primeiro estágio: 10^0
- Para o segundo estágio: 10^1
- Para o terceiro estágio: 10^2

Assim, formulou-se a equação:

$$\bar{I} = \frac{10^0 \cdot a \cdot I + 10^1 \cdot b \cdot I + 10^2 \cdot c \cdot I}{5}$$

Sendo:

- Primeiro estágio de alterações.
- Segundo estágio de alterações
- Terceiro estágio de alterações

a: número total de alterações consideradas como sendo do primeiro estágio.

b: número total de alterações consideradas como sendo do segundo estágio.

c: número total de alterações consideradas como sendo do terceiro estágio.

Os valores do I, entre 0 e 10, indicam funcionamento normal do tecido, entre 11 e 20, indicam danos leves a moderados ao órgão, entre 21 e 50 indicam danos de moderados e severos e maiores que 100, indicam danos irreversíveis no tecido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em alguns cortes do tecido branquial dos indivíduos coletados no reservatório verificaram-se condições normais nas estruturas branquiais, com lamelas secundárias bem desenvolvidas e espaços entre elas bem definidos e epitélio estratificado do filamento (fig.1A).

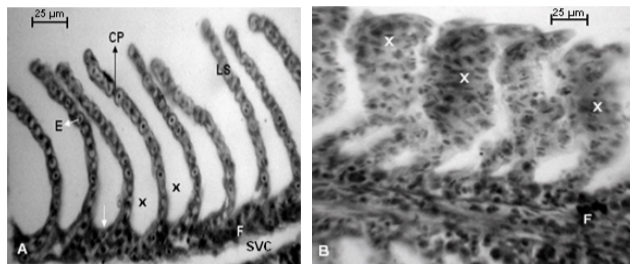


Figura 1. Corte longitudinal do filamento branquial de *Astyanax altiparanae*. **A** - Observar as lamelas secundárias bem desenvolvidas (LS), os espaços interlamelares bem definidos (X) e o epitélio estratificado do filamento branquial (seta). E, eritrócito; CP, Célula pilar; F, filamento branquial (Coloração: HE). **B** - Dilatação de capilares nas lamelas secundárias, proliferação de células epiteliais e desorganização das células pilares (X) (Coloração: HE).

As alterações histopatológicas observadas nos organismos coletados no reservatório foram principalmente de primeiro estágio, segundo Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994) representadas pela proliferação entre as lamelas secundárias com conseqüente diminuição da área de trocas gasosas (fig.2C) e dilatação de capilares com espessamento de lamelas secundárias (fig.1B), também foram observadas alterações de segundo estágio, como fusão completa de lamelas, aneurismas (fig.2D) e hemorragias com rupturas de tecido.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lupi *et al.* (2006), avaliando as histopatologias nas brânquias de *Oreochromis niloticus* coletados no córrego Bebedouro-SP e Nogueira *et al.* (2008), avaliando os tecidos branquiais de *Pimelodus maculatus* coletados no reservatório UHE Furnas – MG. Esses autores observaram alterações histopatológicas de primeiro e segundo estágio (proliferação celular, dilatação de capilares, fusão lamelar e aneurisma), tendo sido causadas por contaminação ambiental não específica a um xenobiótico.

De acordo com Smart (1976), a proliferação celular é uma resposta inicial do aparelho branquial caracterizada pelo aumento das funções das células e tecidos, provocados pela alteração das atividades fisiológicas destes. Para Takashima & Hibiya (1995), são mecanismos típicos de defesa das brânquias que promovem o aumento da barreira água-sangue reduzindo e até mesmo, impedindo a passagem da água entre as lamelas secundárias. Caracterizada pela

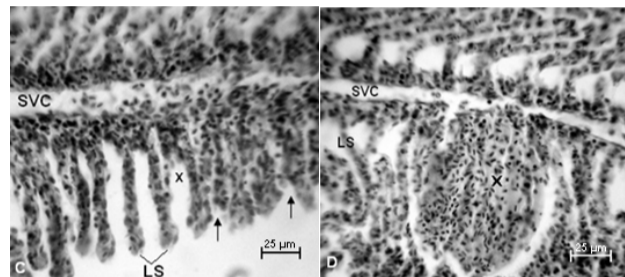


Figura 2. Corte longitudinal do filamento branquial de *Astyanax altiparanae* coletados no reservatório. **C** - Observar hiperplasia de células epiteliais entre lamelas secundárias com fusão total de algumas lamelas (setas), diminuição do espaço interlamelar (x). Seio venoso central (SVC); Lamela secundaria (LS). **D** - Observar aneurisma (X); Seio venoso central (SVC); Lamela secundaria (LS) (Coloração: HE).

“fusão das lamelas secundárias”, essa perda da superfície respiratória pode resultar em morte por anoxia (Rand & Petrocelli, 1985).

O grau da fusão depende da intensidade e da localização da hiperplasia. A fusão será parcial se a proliferação das células se restringir à base ou somente a uma porção das lamelas secundárias (Meletti *et al.*, 2003), porém, se a hiperplasia estiver presente ao longo dos filamentos, a fusão será total, considerando, obviamente, que as células preencham todo o espaço interlamelar (Meletti *et al.*, 2003). Fusões completas de algumas lamelas secundárias foram observadas nos indivíduos coletados no reservatório.

Nos exemplares em que ocorreu a dilatação dos capilares das lamelas secundárias foi observada com frequência congestão vascular, segundo Meletti *et al.* (2003), sendo caracterizada pela paralisação do sangue, em razão do pequeno diâmetro desses capilares, raramente são observados em condições normais, mais de dois eritrócitos ocupando o lúmen.

No caso da congestão, ocorre um acúmulo de eritrócitos ocasionando um aneurisma, situação em que o sistema de células pilares encontra-se completamente ausente (Meletti *et al.*, 2003), ou até mesmo ocorrendo rompimento das células pilares e extravasamento de sangue, conseqüente desarranjo estrutural das lamelas (Heath, 1987). Como já citados, foram encontrados aneurismas nas brânquias dos indivíduos coletados no reservatório.

Devido ao desenvolvimento de atividade agropecuária nas margens do reservatório de Furnas e

ao aumento da entrada de fertilizantes e esgotos em vários locais, esses poluentes podem ocorrer em concentrações subletais, acarretando a modificação na estrutura e funcionamento dos organismos aquáticos.

Através das alterações histológicas encontradas no tecido branquial de *Astyanax altiparanae* coletados no reservatório e mantidos em água limpa por 30 dias, foi estimado o IAH (índice de alterações histopatológicas) e verificado a reversibilidade das alterações.

O IAH classificou as alterações das brânquias de *Astyanax altiparanae* coletados no reservatório, em moderada para grave e as alterações das brânquias dos peixes mantidos 30 dias em água limpa foram classificadas em leve para moderada, ocorrendo reversão das alterações (tab.1). Cerqueira & Fernandes (2002), avaliando a recuperação de tecidos branquiais de indivíduos da espécie *Prochilodus scrofa* expostos em concentrações de 29 mg/L de cobre num período de 96 horas, observaram que o tempo necessário para a recuperação do tecido branquial, depois que os peixes foram removidos para água limpa, foi no mínimo de 30 dias.

Nogueira *et al.* (2008) em exemplares de *Pimelodus maculatus* coletados no reservatório de UHE Furnas – MG classificaram as lesões histopatológicas em moderada para grave. Segundo os autores não foi possível utilizar o critério de reversibilidade nos exemplares que permaneceram 30 dias na água limpa, devido a uma enorme proliferação de parasitas monogenéticos, necessitando um novo estudo, com as mesmas condições, para que os resultados sejam confirmados. Lupi *et al.* (2006) classificaram as lesões nas brânquias em exemplares de *Oreochromis niloticus* coletados no córrego Bebedouro-SP em lesões moderada para grave e após transferências dos exemplares para água limpa, por 30 dias, as lesões foram reversíveis.

Tabela 1. Índices e efeitos das alterações nas brânquias dos exemplares de *Astyanax altiparanae* coletados no reservatório de Furnas (n=5) e mantidos em água limpa por 30 dias (n=5).

Grupo	Índice Médio	Alteração
Reservatório	31,2	Moderada para grave modificação branquial
Mantidos em água limpa	20,4	Leve para moderada modificação branquial

CONCLUSÃO

Utilizando as brânquias como biomarcador de poluição ambiental na UHE Furnas – MG, observou-se que as alterações branquiais detectadas foram de primeiro estágio e segundo estágio sendo causadas pela contaminação ambiental não específica a um xenobiótico.

As brânquias podem ser utilizadas como um biomarcador da contaminação ambiental e o critério de reversibilidade das alterações branquiais, no presente estudo, mostraram que a poluição e contaminação do reservatório, dependendo da intensidade são reversíveis.

AGRADECIMENTOS

A Estação de Hidrobiologia e Piscicultura das Centrais elétricas de Furnas – MG, pela coleta dos exemplares propiciando ao desenvolvimento desse trabalho. Ao CNPq, pela bolsa de iniciação científica. Ao laboratório de Hidrobiologia da Fundação de Ensino Superior de Passos (FESP/UEMG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S. M. 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. **American Fisheries Society Symposium** 8: 1-8.
- ARELLANO, J. M.; ORTIZ, J. B.; CANALES, M. L. G. & SARASQUETE, C. 2001. Histopathological alterations and induction of cytochrome P450 1A in the liver and gills of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Journal of the Histochemical Society** 33 (3): 663-674.
- CERQUEIRA, C.C.C. & FERNANDES, M.N. 2002. Gill tissue recovery copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 52 (2): 83-91.
- EWALD, G. 1995. Chronic measures of toxicant – induced effects on fish. **Annales Zoologici Fennici Finnish Academy of Sciences** 32 (3): 311-316.
- GERNHÖFER, M.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M.; MÜLLER, E. & TRIEBSKORN, R. 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery** 8 (3-4): 241-260.

- HEATH, A.G. 1987. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton: CRC Press. 245p.
- HINTON, D. E.; BAUMEN, P. C.; GARDENER, G. C.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D. MURCHELANO, R. A & OKHIRO, M. S. 1992. Histopathological biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M. & BERGMAN, H. L. (ed), **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 155-210.
- LAURENT, P.; DUNEL-ERB, S. 1980. Morphology of gill epithelia in fish. **American Journal of Physiology** **238** (3): 147-519.
- LUPI, C.; NHACARINI, N. I.; MAZON, A. F. & RIGOLIN – SÁ, O. 2006. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Hispici & Lema** **9** (3): 30-36.
- MELETTI, P. C.; MARTINEZ, C. B. R.; ROCHA, O. 2003. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes, pp. 149-180. In: BRIGANTE, J.; ESPINDOLA, G. E. L. (ed.). **Liminologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**, Rima, São Carlos. p. 278.
- MYERS, M. S.; JOHNSON, L. L.; OLSON, O. P.; STEHR, C. M.; HORNESS, B. H.; COLLIER, T. K. & McCAIN, B. B. 1998. Toxicopathic Hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the Northeast and Pacific coasts, USA. **Marine Pollution Bulletin** **37** (1-2): 92-113.
- NEWMAN, M.C. & JAGOE, C.H. 1994. Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. In: HAMELINK, J.L., LANDRUN, P.F., BERGMAN, H.L. & BENSON, W.H. (eds.). **Bioavailability, physical, chemical, and biological interactions**. Cambridge, Cambridge University Press: p. 420-445.
- NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C. & RIGOLIN – SÁ, O. 2008. Avaliação da qualidade da água no reservatório UHE Furnas - MG, utilizando as brânquias de *Pimelodus maculatus* (LACÈPÈDE, 1803) como biomarcador de poluição ambiental. **Revista Ciência et Praxis** **1** (1): 15-20.
- PAWERT, M.; MÜLLER, E. & TRIEBSKORN, R. 1998. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. **Tissue & Cell** **30** (6): 617-626.
- PERRY, S.F. & LAURENT, P. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RAKIN, J.C. & JENSEN, F.B. (eds.). **Fish Ecophysiology**, p. 231-264.
- POLEKSIC & MITROVIC-TUTUNDZIC, V. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R. & LLOYD, R. (eds.). **Sublethal and chronic effects of pollutants on fresh water fish**. Oxford: **Fishing News Books**, p. 339-352.
- RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. Introduction. 1985. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, p.1-28.
- ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F. J.; ROSETY, M.; ROSETY, J. M.; ROSETY, I.; RIBELLES, A. & CARRASCO, C. 2002. Morphohistochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **51** (3): 223-228.
- SMART, G. 1976. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology** **8** (6): 471-475.
- TAKASHIMA, M.; HIBIYA, 1995. P. **An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features**. 2. Col. New York: Fisher, 1995, 95p.
- WESTER, P. W.; VAN DER VEN, L. T. M.; VETHAAK, A. D.; GRINWIS, G. C. M. & VOS, J. G. 2002. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicology and Pharmacology** **11** (3): 289-295.

Recebido: 13/02/2009
 Revisado: 01/07/2009
 Aceito: 14/12/2009