

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM HEPATÓCITOS DE *Brachydanio rerio*
(HAMILTON & BUCHANAN) EXPOSTO A AÇÃO DO ENDOSULFAN EM DOSE
SUBLETAL

ALCIANNE VIANA *

ANA PAULA CAMARGO MARTINS **

Realizou-se experimentos com o peixe "paulistinha" (*Brachydanio rerio*), tendo como objetivo observar o efeito tóxico do organoclorado endosulfan nas células hepáticas do peixe. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda, sendo determinado o valor de CL 50 - 96 h de 0,0021083 µL/L e os limites de confiabilidade estabelecidos entre 0,00175 e 0,00254 µL/L para o animal em estudo. Durante o experimento os peixes foram mantidos em meio contaminado num total de 96 h, observando-se os efeitos do produto nos hepatócitos a partir das primeiras 24 horas. As alterações observadas após os tempos de exposição 24 h, 48 h, 72 h, 96 h foram: descaracterização da forma celular e da membrana plasmática, lateralização nuclear, cromatina condensada na região central e núcleos picnóticos, grandes vacúolos citoplasmáticos e necrose focal. Após 48 horas de exposição as modificações permaneceram, havendo regeneração dos hepatócitos. O tecido apresentou-se mais regular, houve aumento do citoplasma e a cromatina apresentou-se mais dispersa. Os resultados indicaram que o endosulfan é altamente tóxico para o peixe *Brachydanio rerio*, e que, apesar da sua rápida degradação na água, ocorre o acúmulo nos tecidos após a exposição ao pesticida. Estudos adicionais sobre a toxicidade do endosulfan a longo prazo seriam necessários, uma vez que algumas alterações histológicas sugerem evolução de neoplasias.

- * Bióloga e Pesquisadora do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - CEPPA/UFPR.
- ** Aluna do Curso de Biologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e Estagiária do CEPPA.

1 INTRODUÇÃO

É inegável a importância dos agroquímicos na economia mundial, tendo em vista o contínuo crescimento da população humana. Entretanto, o aumento registrado no consumo destas substâncias tornou-se preocupante. Somente no Brasil o consumo de pesticidas passou de 27.728 ton em 1970, para 60.188 ton em 1991 (GOELLNER, 1987).

O aumento da utilização de pesticidas, aliado ao despreparo dos aplicadores e dos envolvidos no seu transporte e armazenamento, resultou em problemas de intoxicação humana, contaminação do solo, ar, água, presença de resíduos nos alimentos e bioacumulação (GOELLNER, 1993).

Os problemas relacionados aos efeitos ambientais adversos dos pesticidas levaram ao desenvolvimento de metodologias para identificar, prevenir e minimizar tais danos. Para o controle dos agentes químicos introduzidos no ambiente, em especial nos ecossistemas aquáticos, é necessário o uso de técnicas que possam prever o impacto destes agentes sobre a biota dos recursos hídricos receptores.

De particular interesse nos estudos de toxicidade estão os peixes, pois ocupam o topo da cadeia alimentar. Os testes de toxicidade são análises indispensáveis no controle da poluição hídrica, pois fundamentam-se na utilização de organismos vivos que são diretamente afetados pelos pesticidas.

A toxicidade de vários pesticidas em peixes tem sido avaliada, e o endosulfan está entre os produtos que apresentam maior toxicidade aguda nestes organismos (SWARUP et al, 1981). O endosulfan é um inseticida organoclorado de amplo espectro usado contra muitos insetos e ácaros e considerado como não persistente no ambiente (TOLEDO e JONSSON, 1992).

Em peixes, o endosulfan age sobre o sistema nervoso central (MATTHIESSEN e ROBERTS, 1982), nas brânquias (DALELA et al, 1979; NOWAK, 1992), em glândulas produtoras de hormônios (SHUKLA e PANDEY, 1986), na concentração de proteínas séricas totais (ABIDI, 1990), além de provocarem alterações estruturais nos hepatócitos (RAO et al, 1980). Desta forma, a intoxicação por este organoclorado pode alterar o comportamento, o metabolismo e o sucesso reprodutivo dos peixes.

A presente investigação teve por objetivo avaliar o efeito do organoclorado endosulfan no tecido hepático de *Brachydanio rerio*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados neste experimento exemplares adultos de *Brachydanio rerio*, provenientes da Estação de Piscicultura do Estado do Rio de Janeiro, com peso médio de 0,17 gramas e comprimento variando entre 1,5 e 4,0 cm. Os peixes foram mantidos em tanques de 250 litros, com água

previamente purificada, mantida a 25°C por duas semanas antes do início dos experimentos e alimentados com ração comercial à base de farinha de peixe duas vezes ao dia.

Este estudo foi realizado em duas fases:

Determinação da CL 50: Através de bioensaio semi-estático, foi determinada a CL50 do organoclorado endossulfan, comercializado com o nome de Cupinícida Super, para o *Brachydanio rerio*. Os testes foram realizados em recipientes de vidro de 5 litros, contendo 10 exemplares em cada e mais uma réplica de todas as concentrações. Utilizou-se diferentes concentrações do inseticida em quatro recipientes, ou seja, 0,0005; 0,001; 0,003; 0,005µL/L, e em outros dois recipientes foram dispostos os peixes controle. Diariamente, a água foi trocada a fim de se manter constante as concentrações de O₂ e do endossulfan. O número de exemplares mortos observados após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h serviu de base para posterior estudo estatístico feito pelo método "Trimed Spearman Karber" (HAMILTON et al, 1978).

Experimento Agudo 96 h: Uma vez estabelecida a CL50, decidiu-se pela dose subletal correspondente a 50% da CL50 (0,001µL/L) para se investigar os efeitos do organoclorado endossulfan no tecido hepático de *B. rerio*. Os experimentos foram realizados nos mesmos recipientes

utilizados para a determinação da CL50, mas dispostos da seguinte maneira: dois recipientes com animais controle e dois contaminados com 0,001µL/L de endossulfan, todos eles com 10 exemplares cada.

Para cada período de exposição (24h, 48h, 72h e 96h) utilizou-se cinco animais contaminados e cinco animais para controle. Estes foram removidos e mortos através de secção medular. Após isolado, o fígado foi imediatamente colocado em solução fixadora de Bouin (BÜCHERL, 1962) por 8 horas. Após a fixação, o material foi submetido a sucessivas lavagens em álcool 70% e submetido a procedimento histológico de rotina: desidratação em série gradual de etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina. As secções obtidas foram de 2 a 3 µm de espessura e as lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (BUCHERL, 1962), para posterior observação em microscópio óptico. Tanto o material controle como o contaminado seguiram rigorosamente o mesmo procedimento.

3 RESULTADOS

De acordo com a literatura, os estudos histopatológicos concentram-se no fígado e brânquias, já que estes órgãos têm sido alvos freqüentes dos efeitos tóxicos de pesticidas em peixes.

De modo geral, verificou-se que o endosulfan provocou alterações do estado metabólico do fígado. Algumas dessas alterações estudadas por SINGH, SRIVASTAVA (1981); HURTY, DEVI (1982) e VERNA et al (1983), são caracterizadas pela diminuição do glicogênio com conseqüente elevação de glicemia e diminuição do conteúdo de proteína do fígado.

As células hepáticas observadas no controle caracterizaram-se por apresentar forma poligonal, núcleo evidente com cromatina dispersa, citoplasma vacuolizado, tecido regular e homogêneo.

Após os tempos de exposição ao pesticida foram observadas as seguintes alterações:

* Em 24 h de exposição as células apresentaram os núcleos alterados, com menor tamanho e mais compactados. O tecido apresentou-se disforme, com presença de regiões totalmente necrosadas, vacuolização intensa e moderada, lateralização nuclear e perda de organização dos cordões hepáticos;

* Após 48 h o peixe criou certa tolerância ao produto, pois os núcleos, as células e os tecidos apresentaram-se mais regulares. Observou-se ainda intensa vacuolização em algumas áreas, mas com aumento do citoplasma. Os núcleos já menos compactados apresentaram a cromatina mais dispersa;

* Em 72 h foram observadas as partes do fígado mais afetadas, ficando as regiões periféricas com poucas alterações. Vacuolização intensa em algumas regiões, contrastando com regiões pouco vacuolizadas. Núcleo picnótico, mas já apresentando a cromatina menos condensada, além de regiões necrosadas;

* Após 96 h os núcleos apresentaram-se mais semelhantes aos do controle, mas a vacuolização permaneceu em várias regiões. Algumas células apresentaram tendências para normalidade, havendo reorganização dos hepatócitos; outros continuaram apresentando lateralização nuclear, mas com a cromatina mais dispersa. Pontos de necrose ainda presentes.

Durante a realização do ensaio foram observadas alterações no comportamento dos peixes expostos ao endosulfan. Em doses letais a maioria dos peixes apresentou alta motilidade natatória na superfície do frasco, além de reagirem a estímulos externos e apresentarem alguns pontos hemorrágicos pelo corpo. Já em doses subletais não ocorreram alterações morfológicas externas, nem comportamentais.

4 DISCUSSÃO

A escolha da espécie *Brachydanio rerio* para a realização deste estudo de avaliação toxicológica

fundamentou-se não só na recomendação por organismos internacionalmente aceitos, mas também na fácil disponibilidade, boa adaptação às condições laboratoriais e baixo custo desses organismos.

A curta persistência de resíduos de endossulfan no meio ambiente e conseqüentemente em sistemas biológicos, tem sido o motivo da substituição de pesticidas organoclorados por este composto (MATTHIESSEN et al, 1982).

A absorção dos pesticidas solúveis em água por peixes processa-se principalmente pelas brânquias e seus efeitos podem ser melhor observados nas células do fígado, por tratar-se de órgão bastante irrigado e mais susceptível à ação de produtos químicos.

Observou-se no fígado de *B. rerio* que as zonas periféricas não foram afetadas pelo produto químico, o que não aconteceu com a região central que teve as células degeneradas, sugerindo que há maior irrigação no tecido na parte central do órgão. Segundo alguns autores, no tecido hepático ocorre degeneração lipídica, caracterizada por esteatose microgoticular, que pode estar associada à inibição da enzima Mg^{+13} AtPase pelo endossulfan (DALELA et al, 1978; SHARMA, 1988). Sabe-se que qualquer lesão que prejudique a respiração celular e conduza a diminuição de ATP, resulta em menor utilização de ácidos graxos, originando maior acúmulo lipídico intracelular (COTRAN et al, 1989).

Após 48 horas de exposição ao produto, o peixe criou certa tolerância ao endossulfan, havendo regeneração

celular, sendo possível delimitar a membrana celular de alguns hepatócitos. Nos núcleos, a cromatina encontrou-se um pouco mais frouxa, havendo reorganização celular. Porém, a incidência de focos de necrose para estas exposições foi muito baixa. Os dados revelaram que a ocorrência da esteatose independe da quantidade de endossulfan presente nos tecidos.

Pode-se dizer que quanto à degeneração do endossulfan, comparando-se duas espécies diferentes e de tamanhos distintos, a susceptibilidade ao produto é maior em peixes menores, devido à pequena camada lipídica que apresentam. A camada lipídica mais proeminente funciona como barreira para a penetração do inseticida (JONSSON, 1991). Logo, estudos de bioconcentração com peixes como o paulistinha são de extrema importância, pois a toxicidade de pesticidas para peixes é pouco estudada em países em desenvolvimento.

Comparando-se os dados obtidos com os de outros estudos, observou-se que os valores da CL50 diminuem de acordo com o tempo de exposição do animal ao produto químico.

5 CONCLUSÃO

O endossulfan é altamente tóxico ao peixe *Brachydanio rerio*, apresentando valores de CL50 - 96 h igual a 0,0021083 $\mu\text{L/L}$ e limites de confiabilidade entre 0,00175 e 0,00254 $\mu\text{L/L}$.

O fígado de peixe é um dos principais alvos de ação de pesticidas, tornando-se evidente sua ação após curto período de exposição.

Exposições à concentrações subletais do pesticida endosulfan provocaram alterações histopatológicas no tecido hepático do *B. rerio*, predominando mudanças características de exposição a métodos a longo prazo, evidenciando a necessidade de estudos histopatológicos adicionais após exposição crônica.

Após 48 horas de exposição ao produto químico, o animal criou tolerância ao produto, observando-se organização nuclear do tecido hepático com algumas células tendendo para a normalidade.

Observou-se alterações significativas após os tempos de exposição ao pesticida, como a vacuolização que sugere o acúmulo de material como lipídio e glicogênio, necrose em vários pontos e lateralização dos núcleos. Estas observações merecem investigação posterior para que possa ser feita avaliação dos problemas que estas alterações acarretariam aos indivíduos.

Abstract

Experiments have been carried out with the "zebra fish" (*Brachydanio rerio*) aiming to observe the toxic effect of organochlorine Endosulfan in liver cells. Acute toxicity, tests showed value, for CL50 96 h equal to 0.0021083 µL/L and limits of confidence between 0.0175 and 0.00254 µL/L for the experimental organism. During the experiment the fish have been kept in contaminated environment for 96 h, observing the effects of the product in liver cells from the first 24 h on. The changes observed after the exposition times 24 h, 48 h, 72 h, 96 h were:

significant changes in the original of the celular shape and in the plasmatic membrane; nuclear lateralization, condensed cromatine in the central area and other picnotic cores, large cytoplasmatic vacuolos and focal necrosis. After 48 hours of exposition the changes remained, but there has been regeneration of liver cells; the tissues turned more regular, cytoplasm has increased and the cromatin was scattered. The results showed that Endosulfan is highly toxic for the fish *Brachydanio rerio*, and despite its fast degradation in the water, it happens the backlog in the tissues after the exposition to the pesticide. Additional studies on the endosulfan toxicity are necessary, once some histologic disturbance suggest neoplasm evolution.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABIDI, R. Endosulfan: induced changes in the total serum proteirs of *Channa punctatus* (Bloch). Bol. Fisiol. Anim., v. 14, p. 41-48, 1990.
- 2 BYCZKOWSKA-SMYK, W. Observation of the ultrastructure of the hepatic cell of the Burbot (*Lota lota* 1.). Z. Pol. (Zoologica Poloniae), v. 18, p. 287-297, 1968.
- 3 COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Robbins pathologic basics of disease. 4. ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1989. 1519 p.
- 4 DALELA, R.C. Histological damage of gills in *Channa gachua* after acute and subacute exposure to endosulfan and rogor. Mikroskopie (Wien), v. 35, p. 301-307, 1979.
- 5 DALELA, R.C. et al. Adenosine triphosphatase activity in few tissues of a freshwater teleost, *Channa gachua*, following in vivo exposure to endosulfan. Toxicology, v. 11, p. 361-368, 1978.
- 6 DEVI, A.P. et al. Relative toxicity of the technical grade material, isomers and formulations of endosulfan of the fish *Channa punctata*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v. 27, p. 239-243, 1981.
- 7 GOELLNER, C.I. Impacto ambiental dos defensivos agrícolas: metodologia e interpretação dos resultados. São Paulo, 1987. Palestra ministrada aos técnicos da Associação Nacional dos Defensivos Agrícolas.
- 8 GOELLNER, C.I. Utilização dos defensivos agrícolas no Brasil: análise do seu impacto sobre o ambiente e a saúde humana. São Paulo : Artgraph, 1993. 102 p.
- 9 HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. Trimmed spearmam-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci Technol., v. 12, n. 4, p. 417, 1978.

- 10 MATTHIESSEN, P., ROBERTS, R.J. Histopathological changes in the liver and brain of fish exposed to endosulfan insecticide during tsé-tsé fly control operations in Botswana. J. Fish. Dis., v. 5, p. 153-159, 1982.
- 11 MATTHIESSEN, P. et al. Acumulation of endosulfan residues in fish and their predators after aerial spraying for the control of tsetse fly in Botswana. Pest. Sci., v. 13, p. 39-48, 1982.
- 12 NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. Aquatic Toxicology, v. 23, p. 65-84, 1992.
- 13 RAO, D.M.R., DEVI, A.P., MURTY, A.S. Relative toxicity of endosulfan, its isomers, and formulated products to the freshwater fish *Labeo rohita*. J. Toxicol. Environ. Health, v. 6, p. 825-834, 1990.
- 14 SHARMA, R.M. Effect of endosulfan on adenosine triphosphatase (ATPase) activity in liver, kidney and muscles of *Channa gachua*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v. 41, p. 317-323, 1988.
- 15 SHUKLA, L., PANDEY, A.K. Effects of endosulfan on the hypothalamo-hypophysical complex and fish reproductive physiology. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v. 36, n. 1, p. 122-131, 1986.
- 16 SINGH, N.N., SRIVASTVA, A.K. Effects of endosulfan on fish carbohydrate metabolism. Ecotoxicol. Environ. Saf., v. 5, p. 412-417, 1981.
- 17 SWARUP, P.A., RAO, A.M., MURTY, A.S. Toxicity of endosulfan to the freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v. 27, p. 850-855, 1981.
- 18 TOLEDO, M.C.F., JONSSON, C.M. Bioacumulation and elimination of endosulfan in zebra fish (*Brachydanio rerio*). Pestic. Sci. v. 36, p. 207-211, 1992.
- 19 VERMA, S.R. et al. Pesticide: induced dysfunction in carbohydrate metabolism in there freshater fishes. Environ. Res., v. 32, n. 1, p. 127-133, 1983.