

JOANA CRISTINA NEVES DE MENEZES FARIA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA
DOS EFEITOS DA TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA ROUNDUP® NAS
BRÂNQUIAS E NO FÍGADO DO PEIXE *Poecilia vivipara***

**Goiânia-GO
2009**

JOANA CRISTINA NEVES DE MENEZES FARIA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA
DOS EFEITOS DA TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA ROUNDUP® NAS
BRÂNQUIAS E NO FÍGADO DO PEIXE *Poecilia vivipara***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre.
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais

Co-orientador: Prof^º Dr. José Carlos Seraphin

**Goiânia-GO
2009**

À DEUS, pelo seu grande poder em realizar

os bons desejos do meu coração

AGRADEÇO

**A minha vovó Zita (*in memoriam*),
pelo exemplo de amor, perdão e caridade**

MINHA HOMENAGEM

Aos meus pais Paulo e Silvia

Aos meus familiares

Aos meus irmãos em Cristo Jesus

DEDICO

**Ao meu marido Marcelo pelo seu imenso amor,
carinho e companheirismo.**

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS GERAIS

- Ao **programa de Mestrado em Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás**, pela oportunidade de realização deste curso de pós-graduação.
- Ao **Profº Dr. Gilmarcos de Carvalho Correia (EA/UFG)** pela consideração, apoio e pela valiosa contribuição na execução deste trabalho.
- Ao **Profº Dr. José Oscar Rodrigues Morais (ICB/UFG)** pelo auxílio e sábias sugestões.
- Aos **Professores do Mestrado** que me propiciaram o conhecimento amplo e variado dentro de tantas áreas específicas. Em destaque ao Profº Dr. Carlos Estrela e Profª Dra. Ana Helena pela motivação, amizade e por serem excelentes docentes.
- À **Secretária Gleize do Programa de Pós-Graduação**, pelas palavras positivas, afeto e alegria transmitida.
- Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de demanda social que deu suporte financeiro para realização do presente trabalho.
- À **Funape** pelo apoio financeiro para participar de eventos científicos.
- A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- À **DEUS** pela força, perseverança, paciência e por ter cumprido mais uma de suas Palavras em minha vida. Provando o seu amor e mostrando que aqueles que guardam os teus mandamentos, ele honra na Terra.
- À **Prof^a Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais (ICB/UFG)**, pela confiança atribuída a mim, inicialmente como estagiária e, posteriormente como mestranda. Obrigada pela atenção, dedicação, pelos conselhos, exemplos de bom senso, a harmonia transmitida e carinho, durante o período em que estivemos juntas. Também por ter me conduzido ao crescimento pessoal e profissional, durante este trabalho.
- Ao **Prof^o Dr. José Carlos Seraphin (IME/UFG)**, pela oportunidade, compromisso, seriedade, compreensão e pelo tempo disponibilizado para a realização e conclusão de grande parte do trabalho relacionado às análises estatísticas.
- À “**Equipe Guarú**”, estagiários **Ana Paula Rezende dos Santos, Thiago Lopes Rocha, Iedda Carolina Sousa, Dônovan Ferreira Rodrigues, Adriana Maria Antunes, Priscilla Marinelli** que auxiliaram na execução deste. Obrigado pelos grandes momentos compartilhados, vocês foram grandes companheiros nos momentos difíceis.
- À **amiga do LCC, mestre Ana Flávia Vigário** pela sua grande ajuda motivação e aprendizagem. Obrigada pelo carinho, atenção e amizade.

- **Aos meus Pais**, pela vida material e pelos exemplos de garra, força e fé. Em especial a minha **SUPER MÃE**, que mesmo tão longe desse mundo científico sempre transmitiu positividade, força, perseverança, além de acreditar e sempre faz reviver o sentimento de vitória em mim.
- **Aos meus irmãos Paulo Henrique e João Victor** pela atenção.
- **Ao meu marido Marcelo** pelo incentivo constante, por me fazer acreditar que era possível e por ter trilhado comigo de mãos dadas. Além do carinho constante, das palavras amigas e amorosas, de participar dos momentos de decisão e sempre mostrando-se um verdadeiro companheiro.
- **A toda irmandade** que orou por mim, nos momentos de dificuldade.

AGROTÓXICO NO CERRADO

*Agrotóxico é, hoje em dia,
Parte do nosso menu
Nas águas e nos alimentos
Seja cozidos ou crus
Não escapa nem o vento
Deste perigo comum*

*O costume de fazer
Destruição sem pensar
Fez o homem deste tempo
Do veneno precisar
Pra se defender daqueles
Que não têm onde habitar*

*O nosso organismo é feito
Pra fazer a digestão
Daquilo que ingerimos
Pra nossa alimentação
Mas no caso de veneno
É só acumulação*

*Ele não é digerido
No organismo animal
Todo veneno ingerido
Vai formando um capital
Que se transforma em doenças
Desequilíbrio em geral*

*A água, o Ar e o Solo
Que são nossos componentes
Por causa dos agrotóxicos
Hoje se encontram doentes
E os viventes da Terra
Não podem estar diferentes*

*O homem traiu a Deus
Por irresponsabilidade
Pois Deus lhe deu como herança
Desde sua tenra idade
Toda terra e seus viventes
Confiou na lealdade*

*E o homem deu um susto
No seu próprio Criador
Feito sua semelhança
O nosso pai nos criou
E nós por nossa vontade
Passamos a destruidor*

*Negamos nossa origem
Divina e maravilhosa
Criamos uma natureza
Egoísta e vaidosa
Destruindo as leis divinas
E trocando pela nossa*

*Somos os únicos propensos
A querer acumular
A matar pelo prazer
A mentir e enganar
A usufruir da terra
Sem, contudo, respeitar*

*Olhamos a natureza
Não mais para conviver
Mas pra dominar, mudar
Transformar sem aprender
Para usar em nosso favor
Em vez de compreender*

*Isso fez com que o homem
Por causa da ambição
Fizesse Deus ficar triste
Pela sua má ação
Porque planta, bicho e homem
São de sua criação*

*Ficou pro homem cuidar
Das plantas e dos animais
Da água, do chão, do ar
E de outras coisas mais
Mas detonou com a terra
Com gana e sede voraz*

*O homem, esse ser completo
Encontra-se em contradição
Entre o que realmente é
E sua outra opção
Onde se põe dividido
Em boa é má ação*

*Pra produzir alimento
O homem agora está
Matando quem parece
Que possa lhe atrapalhar
Seja planta ou animal
Ou a terra que vai lavar*

No princípio o homem usava
Pra combater os insetos
Plantas tóxicas conhecidas
Por muito tempo deu certo
Depois outros interesses
Trouxeram o veneno para perto

A exemplo do Brasil
Foi tudo uma transação
De interesse econômico
Atendendo à ambição
Que trouxeram pro Brasil
Essa nova educação

Ensinaram pro Brasil
Que para bem produzir
Tinha que usar veneno
E tinha que investir
Na indústria de Agrotóxico
Pra melhor se garantir

Financiaram o Brasil
Para se envenenar
Emprestaram pro Brasil
Dinheiro para comprar
Veneno dos próprios credores
Como forma de explorar

Mandaram para o Brasil
Investir na plantação
De café, soja e cacau
Provocando a situação
De monocultura pura
Trazendo devastação

Cana-de-açúcar e soja
Junto com capim pro gado
Trouxeram dano à natureza
Que pra se solucionado
Precisa que esse sistema
Venha a ser reformulado

Essa nova prática agrícola
Padrão internacional
Desrespeito o saber
E trazendo extensão rural
Provocou desequilíbrio
Na estrutura em geral

Além de contribuir
Pra concentração de terra
Nas mãos de poucas pessoas
Deus início a uma guerra
Levando o agricultor
A sobrevivência eterna

Porque quem vive na roça
Tem ali a profissão
Mantém a família perto
Dando a sua educação
E tem uma herança antiga
De viver de plantação

Mas como o agricultor
Vai competir e ganhar?
Com a indústria de alimento
Com máquinas pra trabalhar
Com veneno e com dinheiro
Para a terra explorar!

Seus instrumentos agrícolas
Já ficaram superados
O preço do seu produto
Não paga o que deu de gasto
Seu suor não vale nada
Nem mesmo como empregado

E corre o agricultor
Pra cidade atrás de emprego
Ele com sua família
Perdem de vez o sossego
Vai viver no submundo
Do desespero e do medo

Olhando toda essa história
Não dá para acreditar
Mas, a extensão rural
Quero responsabilizar
Junto com máquinas e agrotóxico
Pelo quadro que está

Também universidades
Governo e capitalismo
Com a ciência apoiando
Como apóia o consumismo
Se omitindo muitas vezes
Gerando danos gravíssimos
Pois quando se faz uma cova
Para a semente plantar
E junto põe o veneno
Não tem jeito de errar
Manda direto para boca
Do que vai se alimentar

Manda também para o ar
Que segue para o pulmão
Que faz caminho pelas veias
Atacando o coração
E se aloja nas células
Criando deformação

*Manda também para a água
Que embaixo da terra está
Que no final vem num copo
Para a gente degustar
E cozinhar os alimentos
Que em comum vai-se usar*

*Quando envenena a terra
Pra salvar a plantação
Junto está envenenando
A toda população humana
e outras espécies
Sem ter consideração
E mais, o lucro tirado
Não paga ao que adoecer
Que muitas vezes são pobres
Que mal têm o que comer
Não podendo se tratar
Aumenta mais seu sofrer*

*Portanto, essa agricultura
Traíçoeira e criminosa
Tem permissão pra matar
Da forma mais perigosa
Com alimentos e venenos
Em comidas saborosas*

*Quem lucra com essas coisas
Deveria imaginar
Um pai sofrendo com um filho
Sem ter como lhe tratar
Pois mesmo tendo dinheiro
Não tem jeito de sarar*

*Câncer e sistema nervoso
São os que afetam mais
Deformações, alergias
Nos homens e nos animais
Além de adoecer
Os sistemas naturais*

*E ao povo do cerrado
E todo seu morador
Que são na sua essência
Tradição de agricultor
Vamos acordando aos pouquinhos
Para a vida e com amor*

***Pela vida desse povo
Dessa fauna e dessa flora
Desse ar e dessa água
Vamos cuidar sem demora
Para que o bioma Cerrado
Tenha conosco vitória***

SUMÁRIO

Apresentação	IX
Resumo	X
Abstract	XI
Introdução	1
Objetivos	7
<i>ARTIGO 01</i> - Efeitos da toxicidade aguda do herbicida Roundup [®] sobre a morfologia hepática do guaru (<i>Poecilia vivipara</i>).	9
<i>ARTIGO 02</i> - Efeitos comportamentais, histopatológicos e histoquímicos em brânquias na exposição aguda do herbicida Roundup [®] no peixe (<i>Poecilia vivipara</i>).	44
<i>ARTIGO 03</i> – Morfometria nas brânquias e no fígado do <i>Poecilia vivipara</i> exposto ao herbicida Roundup [®] .	76
Anexos – Normas das Revistas	
A - Ecotoxicology and Environmental Safety	93
B – Brazilian Journal of Veterinary Research	100
C – Brazilian Journal of Animal Health and Production	102

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho constitui parte da linha de pesquisa “Comportamento celular frente a variações ambientais” e contém pesquisas multidisciplinares desenvolvidas no Instituto de Ciências Biológicas e Instituto de Matemática e Estatística da Universidade Federal de Goiás, no período de 2007 a 2009. Este estudo propõe a análise dos parâmetros estatísticos aplicados a aspectos morfológicos de células de peixes que serão expostos ao herbicida de largo uso, o Roundup[®]. Sendo, também enfatizada a problemática da contaminação ambiental, proveniente ao uso indiscriminado dos agrotóxicos em todo o mundo e por fim os prejuízos causados à fauna.

Para tal pesquisa foi utilizado o peixe *Poecilia vivipara* (guaru) como sistema modelo para investigar o comportamento animal e celular das brânquias e do fígado, após contaminação da água com o herbicida descrito anteriormente.

Após a análise dos dados obtidos, foi feito um estudo em relação ao efeito do herbicida testado, sobre o peixe *P. vivipara*, através da morfometria. Esta análise estatística vem a enriquecer e até mesmo confirmar os resultados obtidos através do estudo da morfologia nas células das brânquias e do fígado do peixe *P. vivipara*.

Os resultados apresentados mediante tal estudo visam gerar informações a serem utilizadas em novas análises comportamentais, ou até mesmo na preservação do ambiente e conseqüentemente na melhora na qualidade de vida. Enfim proporcionando um melhor conhecimento sobre a contaminação ambiental, referente às possíveis conseqüências do uso inadequado do herbicida e seus efeitos sobre o guaru (*P. vivipara*).

RESUMO

O uso desordenado e indiscriminado de agrotóxicos, que acabam por contaminar o solo, a água e o homem, é uma problemática atual que suscita grandes preocupações. Os efeitos da toxicidade aguda do herbicida Roundup® sobre o comportamento animal, tecidual e celular das brânquias e do fígado do peixe *Poecilia vivipara* foram estudados para determinação e comparação de sua histoarquitetura, bem como para identificação de possíveis alterações morfológicas. As concentrações letais médias de Roundup® foram calculadas e, em seguida, os espécimes foram tratados com este herbicida em exposição aguda (24 h) nas concentrações de 0, 15, 25 e 35 µl por litro de água. As brânquias e os fígados foram dissecados, fixados em formalina neutra e em solução de Karnovsky. As análises, feitas por meio de histologia básica, histoquímica clássica e morfometria, permitiram a identificação de alterações nos espécimes tratados quando comparados ao grupo controle. As alterações comportamentais, celulares e teciduais evidenciadas neste estudo confirmaram o efeito tóxico do Roundup® para o modelo-teste. Sendo assim, deve-se buscar o equilíbrio entre os benefícios da utilização desses produtos químicos e a proteção do meio ambiente e à saúde humana.

Palavras-chave: hepatócitos, células mucosas, aneurisma, vacuolização, glifosato.

ABSTRACT

The indiscriminate use of agricultural pesticides, which contaminate the soil, water, and human beings, has become a problem that causes great concern nowadays. We studied the acute toxic effect of the herbicide Roundup® on animal behavior, tissue, and cells of the neotropical fish species *Poecilia vivipara* gills and liver in order to determine and compare their histoarchitecture, as well as to identify possible morphological alterations. The average lethal concentrations of Roundup® were calculated and, after that, the specimens were treated with acute exposure of this herbicide (24 h) at the concentrations of 0, 15, 25, and 35 µl per liter of water. The gills and livers were dissected, fixed in neuter formalin and Karnovsky's solution. The analyses, carried out using basic histological, classical histochemical, and morphometric tests, allowed the identification of alterations in the specimens treated compared to the control group. The alterations in animal behavior, tissue, and cells evidenced in this study confirmed the toxic effect of Roundup® on the model-test. Consequently, it is advisable to find a balance between the benefits of this type of product and the protection of the environment and human health.

Key words: hepatocytes, mucous cells, aneurysm, vacuolization, glyphosate.

INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento da demanda por alimento que acompanhou a explosão demográfica resultou em recursos agrícolas inadequados com o uso intensivo e impróprio do solo, resultando forte degradação nos ecossistemas. Esses recursos são mais comuns em culturas intensivas de agrotóxicos que visam corrigir as irregularidades do solo e prevenir ou eliminar as pragas que prejudicam a produtividade (Veiga, 2007). Dessa forma, várias moléculas novas surgiram, com características físico-químicas peculiares que garantem funções diferentes (Armas et al. 2005).

A utilização dos agrotóxicos é uma das práticas mais utilizadas pelos produtores rurais, entretanto, muitas das vezes esse uso é feito de forma indiscriminada, sem o conhecimento das verdadeiras necessidades do solo e das plantas. Dessa forma, deve-se buscar o equilíbrio entre os benefícios da utilização desses produtos químicos com a proteção do meio ambiente e à saúde humana (Veiga, 2007). Contudo, os impactos ambientais provocados pelo uso dos agrotóxicos podem ocorrer segundo a capacidade de permanência dos mesmos por mais tempo que o necessário para executarem sua verdadeira ação, atingindo o ecossistema como um todo através da contaminação dos solos, cursos d'água, atmosfera e alimentos.

No ambiente, os resíduos de agrotóxicos podem ser perigosos para todos os ecossistemas. Dentre os variados tipos de ecossistemas, o meio aquático destaca-se como um ambiente extremamente suscetível a diversos contaminantes. Os sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos tem sido grandes alvos de contaminação por agrotóxicos e tem gerado grandes preocupações, principalmente quando a água é usada para consumo humano. Em várias partes do mundo, alguns estudos evidenciaram que o número de casos, ou seja, a porcentagem do uso de compostos utilizados na agricultura

que atingem o meio aquático é geralmente baixa. Embora, agrotóxicos que tenham uma grande persistência e mobilidade no ambiente têm sido encontrados em águas superficiais e subterrâneas (Dores & Lamonica-Freire, 2001). Neste sentido, observa-se que o efeito cumulativo destas substâncias causa reações nocivas dentro da cadeia alimentar, da teia alimentar e acaba por envolver os ecossistemas e às vezes os biomas em questão nesta complexa rede de impacto ambiental.

As respostas à contaminação aquática podem diferir dentre os indivíduos de uma mesma população, e entre espécies e níveis tróficos distintos. Existem determinados parâmetros, metodologias e marcadores que asseguram uma avaliação consistente do efeito de substâncias a certos organismos e os peixes têm papel fundamental neste tipo de estudo (Vigário, 2005).

O uso de peixes como modelo biológico em pesquisas, tem aumentado desde a década de 60, comparando-se a outros vertebrados. Por apresentarem grande diversidade de espécies e habitarem regiões distintas, em ecossistemas com diferentes condições bióticas e abióticas, constituírem fonte de matéria experimental bastante utilizada em diferentes ramos das atividades de pesquisa biológica, em especial nos estudos de ecotoxicologia (Dennis, 1989, Bolis et al. 2001).

Um exemplo é o *Poecilia vivipara*, peixe eurialino conhecido pelo nome vulgar de guaru, pertencente à ordem Cyprinodontiformes, família Poeciliidae. Ele é encontrado tanto em água doce como em água salgada, e possui uma larga distribuição geográfica, sendo amplamente utilizado em pesquisas relacionadas a comportamentos celulares frente a variações ambientais, tais como estudos relacionados a impactos ambientais quando expostos as variações ambientais, tais como, impactos causados por fluoreto de sódio (Breseghelo et al. 2004) e por poluentes químicos acumulativos, como acetato de chumbo (Araújo et al. 2001). Eles são teleósteos cosmopolitas do continente

americano, vivíparos e adaptáveis ao cativeiro, onde se reproduzem com facilidade. É um espécime neotropical, de baixo custo de manutenção, fácil manipulação, pequeno porte e que vêm sendo estudado em diversos aspectos.

Segundo Winkaler et al (2001) os peixes respondem ao estresse provocado pelos poluentes de diversas formas, seja em níveis de alterações na organização biológica, fisiológicas, morfológica, ou até mesmo no seu crescimento e no processo reprodutivo. Assim, as respostas provenientes deste estado de estresse, podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes, chamadas de biomarcadores, sendo excelentes ferramentas para monitorar a qualidade do meio aquático. Nesse sentido, o estudo da morfofisiologia de alguns órgãos-alvo é utilizado como bioindicadores de poluição nos ambientes aquáticos, devido às evidentes respostas celulares dos peixes frente ao efeito dos agentes poluentes.

Dentre esses órgãos, as brânquias são os primeiros órgãos a serem afetados por contaminantes, ou seja, pontos de contato direto do peixe com a água. Apresentam uma ampla área de superfície epitelial, que faz deste o mais conhecido órgão-alvo dos peixes e o principal local de reação com poluentes ambientais. As brânquias são essenciais à respiração, osmorregulação e equilíbrio iônico dos peixes e excreção de compostos nitrogenados. No epitélio branquial se localizam as células do cloro responsáveis pelo balanço iônico entre a água e o plasma sanguíneo e também as células secretoras de muco (células mucosas), o qual tem importante papel de proteção contra patógenos e substâncias tóxicas, além de outras funções (Araújo et al. 2001).

Além das brânquias, o fígado dos peixes caracteriza-se como órgão-alvo, e tem importante atuação no controle de várias funções vitais, sendo também órgão de atividade metabólica muito intensa. Assim, apresenta-se muito sensível a contaminantes ambientais, pois muitos desses se acumulam no tecido hepático, podendo ser

considerado bom indicador de saúde para o peixe (Vigário, 2005).

Existem muitas contradições em relação aos efeitos tóxicos dos agrotóxicos em relação aos seres bióticos e aos abióticos presentes no ambiente e ao ser humano. Isso justifica a necessidade de se aumentar as pesquisas sobre monitoramento de resíduos presentes no ambiente e seus efeitos sobre o ambiente e em especial aqueles relacionados à saúde humana (Dores & Lamonica-Freire, 2001). Dessa forma, a ecotoxicologia, que é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos, ou físicos no ecossistema, tem buscado e necessita de mais estudos sobre os efeitos de contaminantes nos mais diversos organismos, sendo terrestres ou de vida aquática.

REFERÊNCIAS

- Araújo, E.J.A., Morais, J.O.R., Souza, P.R., Sabóia-Morais, S.M.T., 2001. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). **Acta Scientiarum** 23, 391-399.
- Armas, E.D., Monteiro, R.T.R., Amâncio, A.V., Correa, R.M.L., Guercio, M.A., 2005. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova** 25, 975-982.
- Bolis, C.L; Piccolella, M., Dalla Valle, A.Z., Rankin, J.C., 2001. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacological Research** 44, 265-277.
- Breseghele, L., Cardoso, M.P., Borges-de-Oliveira, R., Costa, M.F., Barreto, J.C.B., Sabóia-Morais, S.M.T., Yamada, A.T., 2004. Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 41, 274-280.
- Dennis, A., 1989. "Fish as model systems." **Science**. 246, 1-13.
- Dores, E.F.G.C., Lamonica-Freire, E.M., 2001. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de casos: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso: análise preliminar. **Química Nova** 24, 27-36.
- Veiga, M.M., 2007. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciências & Saúde Coletiva** 12, 145-152.
- Vigário, A.F., 2005. Análise do comportamento celular e animal do peixe (*Poecilia vivipara*) sob efeito agudo do herbicida ácido 2,4 – diclofenoxiacético (2,4 –D). **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)** – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Winkaler, E.U, Silva A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R., 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientarium** 23, 507-514.

OBJETIVOS

Gerais:

- Verificar as alterações provocadas pelo Roundup[®] em células branquiais (mucosas) e hepáticas do peixe *Poecilia vivipara*;
- Avaliar a presença ou ausência de toxicidade do produto-teste no sistema - modelo.

Específicos:

- Determinar a CL-50 do Roundup[®] para peixes de pequeno porte, guarus (*Poecilia vivipara*);
- Usar diferentes situações de contaminações em quatro (4) concentrações distintas com o herbicida para especificar os níveis de toxicidade aguda;
- Verificar os aspectos comportamentais dos animais em estudo;
- Observar as conseqüências em relação à estrutura celular na exposição aguda sobre as células branquiais e hepáticas do peixe *Poecilia vivipara*;
- Analisar a morfologia geral das células dos órgãos em estudo, comparando-as, na presença e ausência do herbicida;
- Avaliar as alterações celulares do peixe *Poecilia vivipara* exposto ao Roundup[®] e a partir daí fazer um estudo comparativo dos dados observados;
- Aplicar métodos estatísticos (morfometria) apropriados para análise dos resultados obtidos nos experimentos.

A ação do herbicida Roundup[®] N-(fosfometil) glicina sobre as células branquiais e hepáticas do peixe *Poecilia vivipara* serão estudadas utilizando-se técnica de microscopia fotônica para determinação da histoarquitetura das mesmas e comparadas para identificar possíveis alterações morfológicas. Será diagnosticado a concentração letal em nível agudo da substância teste e em seguida um estudo (morfológico, histoquímico e morfométrico) dos efeitos provocados pela exposição ao Roundup[®] em células branquiais e hepáticas do peixe “*Poecilia vivipara*”.

Estes estudos foram organizados no formato de artigo, seguindo as normas das Revistas: **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **Brazilian Journal of Veterinary Research e Brazilian Journal of Animal Health and Production**, sendo as instruções presentes em anexo.

ARTIGO 1

EFEITOS DA TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA ROUNDUP[®] SOBRE A MORFOLOGIA HEPÁTICA DO GUARU (*Poecilia vivipara*)

(ARTIGO SUBMETIDO PARA REVISTA –

ECOTOXICOLOGY ENVIRONMENTAL SAFETY (Qualis A Internacional)

**EFEITOS DA TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA ROUNDUP® SOBRE A
MORFOLOGIA HEPÁTICA DO GUARU (*Poecilia vivipara*)**

Joana Cristina Neves de Menezes Faria¹, Ana Paula Rezende dos Santos¹, Michelle Furquim Leão¹, José Carlos Seraphin², Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais¹

¹Departamento de Morfologia – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Goiás – Caixa postal: 131 - CEP 74001-970 – Goiânia – Goiás – Brasil.

²Instituto de Matemática e Estatística – Universidade Federal de Goiás.

*Contato: saboias@terra.com.br Telefone: +55(62) 3521-1485. Fax: +55(62)3521-1109.

Resumo

Este estudo investigou os efeitos do herbicida Roundup[®] glifosato N-(fosfometil) glicina sobre o fígado do peixe *Poecilia vivipara* (guaru), através de exposição aguda por 24 horas, testando concentrações variadas: 0, 15, 25 e 35µl/L. No fígado foram feitas análises histológica e histoquímica. Realizaram-se técnicas de colorações: HE, Azul de Toluidina e reações histoquímicas: Periodic Acid Schiff (PAS), PAS + Amilase salivar e Feulgen. A CL50 do herbicida para os guarus foi de 26,61µl/L. Hepatócitos dos grupos de 15 e 25µl/L possuíam vacuolização, os do grupo 35µl/L, tinham vacuolização, grande deterioração celular, intensa vasodilatação, indicando alto grau de necrose tecidual. Convertendo-se para unidades compatíveis, observou-se que em 35µl/L, 80% dos peixes morreram, o que corresponde a 12,6 µg/L de glifosato, valor muito aquém do permitido pela legislação ambiental atual que admite o uso de até 65µg/L de glifosato.

Palavras-chave: *Poecilia vivipara*, Roundup[®], glifosato, concentração letal média, vacuolização, vasodilatação, necrose, hepatócitos, peixes, histoquímica.

Abstract

This study investigates the effects of Roundup[®] glyphosate N-(fosfonomethyl) glycine herbicide on the liver of the fish *Poecilia vivipara* (guppy), through severe exposure for twenty-four hours testing the following concentrations: 0, 15, 25 e 35 µl/L. Histological and histochemical analyses were performed on the liver as well as the staining techniques HE, Toluidine blue, and the histochemical reactions: Periodic Acid Schiff (PAS), PAS + salivary amylase and Feulgen. The herbicide LC50 for the guppies was 26,61 µl/L. Hepatocytes in the 15 and 25µl/L group presented vacuolization, while the hepatocytes in the 35µl/L group presented vacuolization, extensive cellular deterioration and intense vasodilation, indicating a high level of tissue necrosis. On conversion to compatible units, the 35µl/L concentration, 80% of the fish perished which is equivalent to 12,6 µg/L of glyphosate, a concentration much lower than that permitted by the current environmental legislation which allows up to 65µg/L of glyphosate.

Key words: *Poecilia vivipara*, Roundup[®], glyphosate, average lethal concentration, vacuolization, vasodilation, necrosis, hepatocytes, fish, histochemistry

A presente pesquisa teve apoio financeiro do CNPq pela concessão da bolsa de demanda social a pós-graduanda que é autora da pesquisa; FUNAPE e CAPES que apoiaram em forma de suporte financeiro a aquisição de reagentes e equipamentos utilizados para execução deste trabalho.

Os procedimentos efetuados, estudados e analisados, foram aceitos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás com parecer consubstanciado e protocolado sob nº 126.

1. INTRODUÇÃO

Desde que o homem deixou a vida nômade, iniciou então o hábito de cultivar, com intuito de produzir, armazenar os alimentos para dali retirar seu sustento e o de sua família e de evitar as surpresas que a natureza poderia lhe causar, quando esta por algum motivo ou outro não lhe fornecesse a caça e a pesca (Soares & Porto, 2007).

Essa busca constante por mais alimentos foi o que tornou a agricultura uma atividade “desbravadora”, tendo como consequência a derrubada de florestas e a degradação de variados biomas. Os ambientes foram então modificados, a fim de ceder lugar à insaciável produção de alimentos, sem que fosse dada nenhuma orientação conservacionista para preservação destes ecossistemas, que estavam e que ainda estão em franco processo de devastação (Barbosa & Nascimento, 1994).

Devido a essa exploração desordenada para formação de espaços agricultáveis, nas últimas décadas, tanto o solo quanto os recursos hídricos foram degradados, com propósito de aumentar a produtividade agrícola. Em resposta a isso, não demoraram a surgir às consequências, tais como: a baixa fertilidade do solo e o aparecimento de agentes nocivos às plantas, resultado de um desequilíbrio ecológico fomentado pelo próprio homem (Silveira et al. 2001).

Dessa forma, algumas pesquisas, identificaram a necessidade de técnicas de cultivo que considerasse os impactos ambientais causados por essas plantações, entre as quais se enquadra o sistema do plantio direto (PD) – prática que causa menor desgaste do solo, reduzindo, assim, os efeitos nocivos do processo de erosão dos solos e sedimentação dos recursos hídricos. Nessa técnica, o meio ambiente sofreria um menor grau de agressão, pois a palhada que permanece no solo após o processo de dessecação auxilia na prevenção dos processos erosivos, além de ser fonte de nutrientes,

umentando a microbiota do solo (Stone & Moreira, 2000; Silveira et al. 2001; Jacques, 2003). Embora em PD, o controle de pragas, doenças e ervas daninhas seja feito geralmente com agrotóxicos, confirmando o maior consumo desses, quando comparada com os métodos mais rudimentares.

A utilização dos agrotóxicos e sua aplicação pela comunidade rural e urbana tornaram-se um fator preocupante, pois nem sempre os usuários dos defensivos agrícolas fazem seu preparo e seu uso do modo correto, como é descrito nas especificações do produto. Estes produtos são geralmente conhecidos como micropoluentes, formados por variedade de substâncias químicas e possuem ação biocida, ou seja, foram criados para matar, exterminar e combater as pragas do meio agrícola (Veiga, 2007).

Os impactos ambientais provocados pelo uso dos agrotóxicos podem ocorrer segundo a capacidade de permanência dos mesmos por mais tempo que o necessário para executarem sua verdadeira ação, atingindo o ecossistema como um todo através da contaminação dos solos, cursos d'água, atmosfera e alimentos (Ruegg, 1987). Tudo isto pode trazer conseqüências danosas e até irreversíveis não só a quem manipula tais produtos, como também ao meio ambiente, onde esses agrotóxicos podem ser eliminados.

Os herbicidas são os tipos mais utilizados, pois são largamente empregados em culturas agrícolas, terrenos florestais, jardins e campos. São muitas vezes, aplicados em ambientes lênticos como lagos para controlar o crescimento exagerado de algas, plantas submersas, flutuantes ou emergentes (Spadotto, 1996; Aguiar et al. 2001; Amarante et al. 2002; Tsui & Chu, 2003).

Dentre os vários tipos de herbicidas, destacam-se aqueles considerados não-seletivos. O Roundup[®] glifosato N-(fosfometil) glicina é classificado como herbicida

não-seletivo, sistêmico e pós-emergente e é citado como o mais vendido em todo o mundo, em diferentes formulações, produzido por distintas indústrias de agrotóxicos (Amarante et al. 2002). O Roundup[®], entre outros herbicidas, foi formulado para ser tóxico e biocida, isto é, para eliminar algumas espécies, de seres vivos, cuja ação é danosa aos interesses de lucro dos seres humanos. Por isso, tem sido comum o uso de modelos biológicos em biomonitoração ambiental, a fim de identificar se houve ou não contaminação dos ecossistemas por herbicidas.

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo e dentre os grupos de vertebrados mais representados, os peixes ocupam o 1º lugar. A utilização de peixes como modelo biológico em pesquisas tem aumentado desde a década de 60, comparando-se a outros vertebrados. Por apresentarem grande diversidade de espécies e habitarem regiões distintas, em ecossistemas com diferentes condições bióticas e abióticas, constituírem fonte de matéria experimental bastante utilizada em diferentes ramos das atividades de pesquisa biológica (Bolis et al. 2001).

Segundo Winkaler et al (2001) os peixes respondem ao estresse provocado pelos poluentes de diversas formas, seja em níveis de alterações na organização biológica, fisiológica, morfológica, ou até mesmo no seu crescimento e no processo reprodutivo. Assim as repostas provenientes deste estado de estresse, podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes, chamados de biomarcadores, sendo excelentes ferramentas para monitorar a qualidade do meio aquático.

Os testes de toxicidade em organismos aquáticos vêm sendo utilizados como ferramenta eficaz para avaliação, predição ou detecção dos efeitos dos poluentes sobre os organismos vivos. O modelo teste utilizado neste estudo *Poecilia vivipara* (Blochii & Schneider, 1801) é um peixe teleósteo, caracterizado como eurialino e possui moderada

sensibilidade as alterações ambientais. É um espécime neotropical com fecundação interna e apresenta dimorfismo sexual (Sabóia-Morais et al. 1999).

O fígado dos peixes e de outros vertebrados tem importante atuação no controle de várias funções vitais como: armazenamento e biotransformação das substâncias obtidas pela corrente sanguínea, sendo também um órgão de atividade metabólica muito intensa. Assim, apresenta-se muito sensível a contaminantes ambientais, pois muitos destes se acumulam no tecido hepático, podendo este órgão ser considerado um bom indicador de saúde para o peixe (Au, 2004).

Neste sentido, esse estudo visa determinar a concentração letal média (CL50) do herbicida Roundup[®] no *Poecilia vivipara*, com o intuito de identificar as possíveis alterações no comportamento tecidual e celular e avaliar as eventuais modificações morfológicas. Para isso, foi descrito o detalhamento da histoarquitetura do fígado, com particular enfoque na disposição geral do tecido hepático para permitir uma avaliação morfofuncional entre as células que compõem este órgão.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta do material e manutenção dos animais em cativeiro.

Os modelos testes utilizados no experimento foram adquiridos na Piscicultura da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG) – Campus II (16° 35' 37"S e 49° 16' 50" W). Os espécimes foram submetidos à aclimação por 72 horas em aquários de 40 litros com oxigenação, temperatura, amônia e pH controlados, com ciclo de 12 horas claro / 12 horas escuro e alimentados uma vez ao dia com ração Alcon Guppies (Alcon Basic Ltda, Santa Catarina, Brasil).

2.2. Produto químico (produto teste)

O herbicida Roundup[®] (C₃H₈NO₅P) utilizado no experimento é fabricado pela Monsanto do Brasil S/A e registrado no Ministério da Agricultura e do Abastecimento sob o nº 898793. Neste trabalho, utilizou-se uma solução aquosa concentrada composta por sal de isopropilaminada N-(fosfonometil) glicina, numa concentração de 480g/L. Sendo que 360g/L é o equivalente em glifosato, de classe toxicológica IV, ou seja, este agroquímico é considerado pouco tóxico.

2.3. Cálculo da Concentração letal média (CL50) do Roundup[®].

Os testes de toxicidade iniciaram-se com a mensuração da concentração letal média (CL50, 96h) do Roundup[®]. Esse valor foi determinado pelo programa estatístico Spearman Karber-Programa (USA EPA). Para tanto, os espécimes coletados aleatoriamente do tanque de manutenção foram divididos em cinco (5) grupos experimentais contendo seis (6) peixes adultos cada, perfazendo um total de 30 peixes. Os aquários continham quatro (4) litros de água decolorada com diferentes concentrações do herbicida (0, 15, 25, 35 e 45µl/L por litro d'água), durante um período total de 96 horas.

2.4. Exposição aguda do Roundup[®] e processamento do material biológico.

Após o cálculo da CL50 (96h), realizou-se a exposição aguda de 20 peixes por 24 horas nas concentrações 0, 15, 25, e 35µl/L do herbicida Roundup[®] por litro de água. Para obtenção dos tecidos, os animais foram sacrificados por decapitação, em seguida o fígado foi dissecado para análise morfológica e histoquímica. Os materiais biológicos submetidos à fixação por imersão em formalina neutra a 1% e Karnovsky foram processados para inclusão em paraplast e historesina, respectivamente. Parte das

amostras inclusa em paraplast foi seccionada com três (3) μm de espessura, e posteriormente os cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). A segunda parcela, após a inclusão em historesina e secção com 1 μm de espessura, foi corada com Azul de Toluidina pH 8,5 (AT). Para as análises histoquímicas utilizaram-se as reações de Periodic Acid Schiff (PAS) e PAS + Amilase salivar (PAS + AM) para detecção de glicoproteínas neutras ou glicogênio, e a reação de Feulgen (F) para identificação de DNA. As lâminas de todos os procedimentos histológicos e histoquímicos foram analisadas e fotografadas no fotomicroscópio (Olympus-CH 30).

3. RESULTADOS

3.1. Concentração letal média (CL50)

Estimou-se que a CL50 foi de 26,61 μl de Roundup[®] por litro de água, em peixes expostos por 96 horas (Tabela 1).

Foi mensurado o índice de mortalidade dos peixes expostos em 24 horas (exposição aguda). Os animais dos grupos controle, 15 e 25 $\mu\text{l/L}$ apresentaram após o experimento 0% de mortalidade, embora para o último grupo os peixes encontravam-se extremamente alterados. E no tratamento de 35 $\mu\text{l/L}$ houve 80% de mortes dos indivíduos.

3.2. Alterações teciduais e celulares

Grupo controle: Os hepatócitos apresentaram-se distribuídos em cordões hepáticos regulares a partir da veia central de forma homogênea, com presença de sinusóides, hemácias nucleadas, citoplasma basófilo, núcleo com cromatina descondensada e nucléolo evidente (Fig. 1).

Grupos tratados: apresentaram alterações celulares (Figs. 2 – 8) acentuadas conforme o aumento das concentrações experimentais, confirmando o alto potencial tóxico do herbicida Roundup® (Quadro 1).

Diante das reações observadas no órgão estudado podem-se classificar as respostas celulares e teciduais como de Classe I quando houve modificações suaves que marcavam uma resposta celular e tecidual mais tênue, é o caso observado na exposição à concentração 15 µl/L. Classe II quando as alterações celulares e teciduais já caracterizavam uma ação tóxica mais intensa, com comprometimento parcial de certas regiões celulares e teciduais o que foi observado em fígados de animais expostos a 25 e 35 µl/L e, por fim aqueles de Classe III, nos quais a severidade dos casos torna irreversíveis os danos celulares e teciduais e neste caso os animais vão a óbito como na concentração de 35 µl/L.

3.3 Análise histoquímica

As células do fígado dos grupos controle e 15 µl/L apresentaram reatividade positiva e uniforme ao PAS. Os hepatócitos do grupo 25 µl/L tinham citoplasma menos homogêneo e as reações positivas foram esparsas, uma vez que as células estavam muito vacuolizadas. Foram observadas regiões sem a marcação específica e com formação de espaços intracelulares que se acentuaram no grupo de 35 µl/L.

Para todos os grupos foi notada uma reação negativa ao PAS com amilase salivar, confirmando a presença de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos.

A reação de Feulgen usada para identificação de material genético (DNA) indicou positividade, apenas no grupo 35 µl/L, com a presença de micronúcleo evidente ao longo do tecido hepático.

4. DISCUSSÃO

O uso do peixe *Poecilia vivipara*, para o presente estudo, é justificado, por apresentar moderada sensibilidade, ter alta taxa de fecundidade e reprodução, ser nativo, de pequeno porte e fácil manutenção nos aquários experimentais em pequenos espaços. Tais características permitem ampliar o espectro de informações importantes sobre o efeito do Roundup® no peixe, onde foram observadas respostas morfológicas satisfatórias nos ensaios toxicológicos.

A concentração letal média (CL50, 96h) é um dado preliminar que oferece uma avaliação acerca da toxicidade de um agrotóxico aos peixes e outros organismos. A CL50 (96h) do herbicida Roundup® para o peixe *Poecilia vivipara*, calculada neste trabalho, foi de 26,61 µl/L que corresponde a 9,5µg/L, concentração capaz de levar os peixes a morte. Para o CONAMA (Resolução nº 357, 2005) a concentração máxima permitida de glifosato em corpos d'água é de 65µg/L. Observa-se então, que o valor de CL50 encontrado para o espécime testado neste trabalho é muito aquém do permitido pela legislação ambiental atual. No entanto sabe-se que não é liberado nos corpos d'água e na lavoura o glifosato *in natura* e sim associado ao agroquímico como um todo que é o Roundup®, o qual além do glifosato possui em sua formulação o surfactante, para o qual estudos de Cox, (1998) relatam ser muito mais tóxico que o próprio glifosato. Contudo, os dados laboratoriais apresentados buscaram avaliar como este composto que é largamente utilizado na agricultura brasileira e mundial, poderia atuar em tecidos e células de animais aquáticos, se ele atingisse mananciais próximos de lavouras.

Conforme as informações contidas no rótulo do produto, o Roundup® foi caracterizado como de classe toxicológica IV, ou seja, pouco tóxico para os mamíferos,

embora seja descrito numa classificação ambiental III, sendo considerado produto perigoso ao meio ambiente. Assim os resultados encontrados neste estudo indicam a alta toxicidade do mesmo para o modelo-teste (guaru). Com o intuito de se averiguar e comparar as alterações promovidas pelo Roundup[®] nos hepatócitos foi de suma importância o conhecimento da morfofisiologia deste órgão.

No fígado dos animais do grupo controle, ou seja, não exposto ao Roundup[®] averiguou-se o aspecto regular dos hepatócitos, confirmando o seu padrão de normalidade descrito também para diversas espécies tais como: *Hoplias malabaricus* (Lemes & Braccini, 2004), *H. lacerdae* (Cruz et al. 2005), *Oreochromis niloticus* (Vicentini et al. 2005) e *Oligosarcus jenynsii* (Petcoff et al. 2006). Nestes o fígado é caracterizado por dividir-se em lóbulos irregulares, com os hepatócitos apresentando formas hexagonais e segundo Rocha et al (1997), diferenciando-se entre espécies de acordo com a idade, o sexo, a nutrição e os aspectos sazonais.

Para os espécimes adultos usados neste trabalho, a distribuição típica dos hepatócitos observada no grupo não tratado com o herbicida é descrita com uma organização cordonal ao redor dos sinusóides que se irradia de uma veia central. Estes dados estão em consonância com os descritos por Petcoff et al (2006) para a espécie *Oligosarcus jenynsii*. Essas características morfológicas do fígado do guaru são indicativas do estado de bem estar do peixe nas condições de laboratório.

Os hepatócitos dos guarus se apresentavam homogêneos, com citoplasma rico em lipídeos e glicogênio, e com grande núcleo esférico, central ou sub-central, contendo cromatina frouxa e nucléolo evidente. Por vezes, observou-se mais de um nucléolo por núcleo e hepatócitos binucleados, tal como foi descrito para *O. niloticus* por Figueiredo – Fernandes et al (2007). O comportamento das células supracitadas que constituem a estrutura hepática do guaru foi analisado quando os animais foram expostos a

concentrações de Roundup[®]. Por isso, estudos que identifiquem as reações teciduais e celulares frente a agentes agressores podem ser utilizados como parâmetro para identificação e controle de qualidade do meio ambiente.

Os estudos e as análises realizados neste trabalho sugerem uma relação positiva entre a exposição do peixe *Poecilia vivipara* ao herbicida Roundup[®] e a ocorrência de alterações histopatológicas no fígado deste animal. Os dados expostos por Szarek et al (2000), confirmam também que após exposição de *Cyprinus carpio* ao Roundup[®], puderam verificar alterações histopatológicas no fígado. Portanto, o Roundup[®] seria o agente interveniente das respostas celulares e teciduais adversas verificadas em diferentes espécies.

O fígado de peixes, como de outros animais, apresenta uma função ímpar, pois é o principal órgão com ação detoxificante nos vertebrados. Pode metabolizar ou acumular substâncias tóxicas, a fim de impedir que outros órgãos mais vulneráveis sejam atingidos (Matos et al. 2007). Porém devido a sua função, esse órgão também é alvo da ação tóxica das substâncias e sofre várias alterações morfológicas e fisiológicas, que poderão inclusive prejudicar sua função vital, caso a exposição seja feita a agente de efeito cumulativo. Ou mesmo, seja sujeito a uma exposição crônica, ou ainda a substâncias que possam promover em exposição aguda, efeitos tão tóxicos, com modificações irreversíveis que possam levar o animal a morte por alterações irreversíveis das células e dos tecidos.

Por isso, o fígado é caracterizado como um órgão biomarcador da poluição ambiental, pois os hepatócitos são considerados o primeiro alvo da toxicidade de substâncias, e neles é possível identificar diversas alterações, quando o mesmo encontra-se em situações de estresses (Zelikoff, 1998).

A histoarquitetura dos hepatócitos de guaru mostrou-se extremamente alterada nos grupos de 25 e 35µl/L, isto é, houve hipertrofia dos hepatócitos e mudança na localização dos mesmos. As lesões histopatológicas analisadas no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos ao inseticida Dipterex 500[®] (Trichlorfon) confirmaram a migração lateral do núcleo dos hepatócitos (Rodrigues et al. 2001). E em *Oreochromis niloticus* tratados com herbicida diquate verificou-se também a hipertrofia dos hepatócitos (Henares et al. 2008).

Entre as diversas alterações diagnosticadas durante toda experimentação com guarus, a vacuolização dos hepatócitos estava presente em todos os grupos tratados, mostrando-se mais evidente nos grupos de 25 e 35µl/L. De acordo com Santos et al (2004), Blazer et al (2007), Van Dyk et al (2007) esta resposta celular sugere a presença de regiões com acúmulo de inclusões lipídicas e glicogênio, ou a combinação de agentes tóxicos com os lipídios intracitoplasmáticos. Por isso, indica-se que um pré-distúrbio na fisiologia do animal, poderá levar a bioacumulação dos produtos químicos no tecido e como consequência a dificuldade de degradação destes agentes agressores.

É válido ressaltar que houve correlação entre o aumento do processo de vacuolização dos hepatócitos dos guarus em relação aos valores crescentes de concentrações do herbicida testado. E este mesmo resultado é também relatado por Matos et al (2007) ao expor *Oreochromis niloticus* ao pesticida carbaryl e por Van Dyk et al (2007) que avaliou as mudanças histológicas do fígado de *O. mossambicus* após a exposição em cádmio e zinco. Expressando então, que a resposta celular pode ter relação direta com o tempo de exposição e com os níveis de doses ou concentrações utilizadas para um dado poluente ambiental.

A vasodilatação observada nos sinusóides e vasos de maior calibre associada com aumento do número de hemáceas no interior dos vasos sanguíneos, a congestão dos

sinusóides e a presença de focos hemorrágicos foi observado em todos os grupos experimentais dos guarus. Estes dados estão em consonância com os obtidos por Albinati et al (2007) que realizaram a exposição aguda de *Leporinus macrocephalus* ao herbicida Roundup[®]. Estas alterações poderão estar relacionadas às lesões no tecido hepático ou a uma reação patológica (Santos et al. 2004). Isto significa um alto grau de comprometimento tecidual em virtude do rompimento dos capilares e, conseqüentemente, da migração dos eritrócitos para diversas regiões entre os hepatócitos.

Um grupo especial de macrófagos, os melano-macrófagos (MMCs), variam em tamanho e número dependendo da espécie e da saúde do peixe (Agius & Roberts, 2003). Estas são células que podem sofrer mudanças adaptativas em condições variadas tais como alterações climáticas sazonais ou exposição à xenobióticos (Grassi et al. 2007).

Os MMCs foram predominantemente encontrados nos grupos de 25 e 35µl/L de exposição. Estes dados são semelhantes aos descritos por Raldúa et al (2007) ao analisar em *Barbus graellsii* e *Alburnus alburnus* a agressividade do metil-mercúrio sobre hepatócitos destes animais. Lemes & Braccini (2004) sugerem que os MMCs estejam envolvidos no armazenamento, realocação e reciclagem de componentes férricos de eritrócitos danificados. Assim, pode-se inferir que devido à crescente vasodilatação encontrada nos grupos expostos às concentrações de 25 e 35µl/L de Roundup[®], houve como conseqüência a alteração e comprometimento de vários eritrócitos o que provocou o aumento dos MMCs e a diminuição da hemossiderina. Sendo este último presente no grupo de 15µl/L de exposição.

Notou-se a presença de focos eosinofílicos em animais expostos a 15µl/L, sendo estes mais evidentes nos grupos de 25 e 35µl/L. Focos eosinofílicos são áreas

arredondadas e irregulares, provenientes do aumento do estado de eosinofilia nas células quando comparadas a hepatócitos vizinhos. A presença desses focos é justificada como um estágio pré-neoplásico reconhecidos em fígado de peixes (Blazer et al. 2007). Ao se considerar esta reação, supõe-se que o efeito citotóxico do Roundup[®] nas concentrações citadas seja tão intenso que em exposição crônica possa levar ao desenvolvimento de carcinoma.

Em todas as concentrações testadas no presente estudo foi possível perceber a presença de núcleos picnóticos. Em pesquisas realizadas com *Hoplias malabaricus* (traíra) frente à privação alimentar, averigou-se que os hepatócitos com alterações nucleares caracterizadas como cariopcnose, são de fato, resultantes da atrofia nuclear (Rios et al. 2007). Diante disto, é possível concluir que estas reações nucleares em guarus e em outros modelos animais são um indicativo da diminuição da atividade metabólica dessas células, que acabam levando à sua completa ociosidade. Reações promotoras da diminuição metabólica seriam respostas a agentes tóxicos em virtude da degradação dos componentes celulares, constituindo-se então como uma das primeiras manifestações celulares irreversíveis.

O aumento da deposição de fibras colágenas foi detectado nos grupos tratados de 25 e 35µl/L. Este estado de fibrose hepática foi verificado em uma diversidade de organismos, dentre eles suíno, perus e outros ao serem expostos às doses letais de aflatoxinas (Cullen & Newberne, 1994). Infere-se que tal característica esteja correlacionada com o processo de proliferação dos hepatócitos e dos ductos biliares (Grassi et al. 2007). Portanto, tal dado confirma o estado de anormalidade tecidual presente no parênquima hepático do organismo do guaru frente ao herbicida Roundup[®].

Nas concentrações de 25 e 35µl/L a estrutura hepática apresentou no interior dos sinusóides um infiltrado leucocitário. Segundo Noreña-Barroso et al. (2004), Santos et

al (2004); tal resposta sugere a ocorrência de um possível processo inflamatório. E então serve como um dos parâmetros de estimativa do nível de estresse celular que uma espécie apresente quando exposta a um agente tóxico.

A evolução do processo de necrose foi registrada nos grupos de 25 e 35µl/L e pode levar à lesão celular irreversível e conseqüentemente a morte celular. Esta anormalidade é considerada uma alteração qualitativa importantíssima e de melhor representatividade, quando comparada às estruturas celulares do grupo controle (Figueiredo – Fernandes et al. 2006). Isto é, os focos necróticos em um tecido representam um estado de afecção desordenado e ocorrem quando as células estão aparentemente lisadas, faltando quase toda sua organização interna. Por isso, ao se detectar um acentuado processo de necrose tecidual, supõe-se que houve uma perda de eficiência desempenhada pelo fígado e, conseqüentemente, isto pode levar a morte do animal.

A maior parte dessas alterações foi classificada conforme o fator de importância (FI), para permitir o conhecimento prévio de tais situações encontradas no modelo biológico estudado em *Hoplias malabaricus* (traíra) segundo Rios et al (2007). Considera-se com baixo FI a mudança na histoarquitetura dos hepatócitos e dos ductos biliares, vacuolização, depósitos intracelulares e presença de melanomacrófagos. Como intermediário FI tem sido diagnosticado a presença dos núcleos picnóticos, fibrose e infiltração leucocitária. E por fim, com alto FI a necrose. É possível estabelecer estes parâmetros para as reações observadas no fígado do guaru quando expostos as concentrações crescentes de Roundup[®]. Uma vez que, quando a concentração aumentava, tornavam-se mais intensas e mais severas as respostas celulares e teciduais. O reflexo disto se dá também nas análises dos componentes químicos que constituem as células.

Por meio da análise histoquímica, os hepatócitos do grupo controle e tratados apresentaram positividade ao PAS e reação negativa ao PAS + amilase, indicando a presença de glicogênio, embora a presença de vacúolos tenha interferido na reatividade das mesmas. Tais observações foram observadas por Santos et al (2004) e Matos et al (2007) ao evidenciarem diferenças no teor de glicogênio em relação aos peixes que tinham fígado no aspecto normal e alterado. Assim deduz-se que esta metodologia clássica é adequada para se detectar presença e alteração de glicoprotéínas neutras e glicogênio em diversas células, entre elas os hepatócitos.

Micronúcleos evidenciados no grupo de 35µl/L revelaram uma ação genotóxica do Roundup[®] para o peixe estudado. Essas estruturas nucleares podem variar em função da época, do tipo de poluente envolvido e entre as espécies de peixes consideradas (Palhares & Grisólia, 2002). Segundo Grisólia (2002), ao testar e comparar a frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes e camundongos expostos a ciclofosfamida, mitomicina C e vários pesticidas dentre eles o Roundup[®], pode-se perceber um alto grau de características mutagênicas nos peixes em relação aos camundongos. Assim, os estudos têm mostrado que os testes de micronúcleos em peixes são eficientes para detecção da sensibilidade destes animais quando expostos aos poluentes aquáticos.

Nos peixes, os testes de micronúcleo são geralmente baseados em eritrócitos, embora as brânquias e o fígado também tenham sido utilizados (Palhares & Grisólia, 2002). Neste estudo, foi identificada ao longo do tecido hepático a presença dessas deformidades nucleares, sugerindo então o início de formação tumoral no órgão estudado. Dessa forma, propõe-se que os testes de micronúcleos em peixes sejam efetuados diversas vezes em um dado tratamento, a fim de mensurar a frequência de evolução e o prognóstico dos mesmos.

Pelas avaliações histopatológica e histoquímica do fígado de *Poecilia vivipara*, as alterações encontradas estão relacionadas à ação do herbicida Roundup®. Por isso, esse órgão foi considerado como alvo principal dos contaminantes e poluentes aquáticos.

5. CONCLUSÃO

A liberação e o uso indiscriminado de agrotóxicos e a conseqüente contaminação de mananciais interferem na sobrevivência e bem-estar dos peixes. O herbicida Roundup® amplamente utilizado em todo o mundo apresentou-se tóxico para *P. vivipara*, com evidentes alterações histopatológicas. Dessa forma, este estudo qualifica o guaru como biomonitor das alterações físico-químicas promovidas por agrotóxicos em ambientes aquáticos.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FUNAPE, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

7. REFERENCIAS

Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Disease** 26, 499-509.

Aguiar, D.C.R., Honrado, H.R.R., Correia, R.B., 2001. Intoxicação em peixes por pesticidas utilizados na agricultura. **Lisboa: FMV-UTL.**

Albinati, A. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J.V., Santos, G. B., Lira, A. D., 2007. Toxicidade aguda do herbicida Roundup® para piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Revista Brasileira de Saúde Prod. An.** 8, 184-192.

Amarante Júnior, O.P., Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro M.L., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova** 25, 589-593.

Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin** 48, 817-834.

Barbosa, A.S., Nascimento, I.V., 1994. Cultura e ambiente em áreas do sudoeste de Goiás. In: Pinto, M.N. (Eds.), Cerrado: caracterização, ocupação e perspectiva, 2ª ed. Editora da Universidade de Brasília, Brasília – DF, pp. 75-108.

Blazer, V.S., Fournie, J.W., Wolf, J.C., Wolfe, M.J., 2007. Manual for the Microscopic Diagnosis of Proliferative Liver and Skin lesions in the Brown Bullhead (*Ameiurus nebulosus*).

Bolis, C.L; Piccolella, M., Dalla Valle, A.Z., Rankin, J.C., 2001. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacological Research** 44, 265-277.

CONAMA - **Conselho Nacional do Meio Ambiente**, 2006. Resolução nº357 de 17 de março de 2005, (<http://www.mma.gov.br/conama>). Acesso: 08/07/2007.

Cox, C., 2004. Glyphosate. **Journal of Pesticides a Reform**, 24, 10-15.

Cullen, J.M., Newberne, P.M., 1994. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: David, E., John, G. (Eds.), **Academic Press, Inc.**, pp. 3-26.

Cruz, C., Fujimoto, R.Y., Luz, R.K., Portella, M.C., Martins, M.L., 2005. Toxicidade aguda e histopatologia do fígado de larvas de trairão (*Hoplias lacerdae*) expostas à solução aquosa de formaldeído a 10%. **Pesticidas: revista ecotoxicol. e meio ambiente** 15, 21-28.

Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Ferendas, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesq. Vet. Bras.** 27, 103-109.

Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, R., Reis-Henriques, A., Rocha, E., 2006. Effects of the fungicide Mancozeb on Liver Structure of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: assessment an Quantification of Induced Cytological Changes Using Qualitative Histopathology and the Stereological Point-Sampled Intercept Method. **Bull. Envirom. Contam. Toxicol.** 76, 249-255.

Grassi, T.F., Pires, P.W., Barbisan, L.F., Pai-Silva, M.D., Said, R.A., Camargo, J.L.V., 2007. Liver lesions produced by alfatoxins in *Rana catesbeiana* (bullfrog) **Ecotoxicology and Environmental Safety** 68, 71-78.

Grisolia, C.K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research** 518, 145-150.

Henares, M.N.P., Cruz, C., Gomes, G.R., Pitelli, R.A., Machado, M.R.F., 2008. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) **Acta Sci. Biol. Sci. Maringá** 30, 77-82.

Jacques, A.V.A., 2003. A queima das pastagens naturais: efeito sobre o solo e a vegetação. **Ciência Rural** 33, 177-181.

Lemes, A. S., Braccini, M. C., 2004. Descrição e Análise Histológica das Glândulas Anexas do Trato Digestório de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), (teleostei, erythrinidae). **Biodiversidade Pampeana** 2. 33-41.

Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Carrola, J., Rocha, E., 2007. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 89, 73-80.

Noreña-Barroso, E., Simá-Álvarez, R., Gold-Bouchot, G., Zapata-Pérez, O., 2004. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the Bay of Chetumal, México, **Marine Pollution Bulletin** 48, 263-269.

Palhares, D., Grisólia, C.K., 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology** 25, 281-284.

Petcoff, G. M., Díaz, A. O., Escalant, A. H., Goldemberg, L., 2006. Histology of the liver of *Oligosarcus jenynsii* (Ostariophysi, Characidae) from Los Padres Lake, Argentina. **Iheringia, Série Zool.** 96, 205-208.

Raldúa, D., Diez, S., Bayona, J.M., Barceló, D., 2007. Mercury levels and liver pathology in feral fish living in the vicinity of a mercury cell chlor-alkali factory. **Chemosphere** 66, 1217-1225.

Rios, F. S., Donatti, L., Fernandes, M. N., Kalinin, A. L. , Rantin, F. T., 2007. Liver histopathology and accumulation of melano-macrophage centres in *Hoplias malabaricus* after long-term food deprivation and re-feeding. **Journal of Fish Biology** 71, 1393-1406.

Rocha, E., Monteiro, R.A.F., Pereira, C.A., 1997. Liver of the brown trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): a stereological study at light and electron microscopic levels. In: Petcoff, G.M., Díaz, A.O., Escalante, A.H., Goldemberg, A.L. (Eds.), *Iheringia, Série Zool.* 96, 205-208

Rodrigues, E.L., Ranzani-Paiva, M.J.T., Pacheco, F.J., Veiga, M.L., 2001. Histopathologic lesions in the liver of *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae_

exposed to a sublethal concentration of the organophosphate insecticide Dipterex 500[®](Trichlorfon). **Acta Scientiarum** 23, 503-505.

Ruegg, E.F., Puga, F.R., Souza, M.C.M., Úngaro, M.T.S., Ferreira, M.S., Yokomizo, Y., Almeida, W.F., 1987. Impactos dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde. In: Martine, G., Garcia, R.C. (Ed.), **Os impactos sociais da modernização agrícola**. São Paulo: Caetés.

Sabóia-Morais, S.M.T., Santos, S.C., Carneiro, C.E.A., Silva, R.M., Pires, D. R., Araújo, E.J.A., Morais, J.O.R., 1999. Evaluation of the effects of extracts of Cerrado plants of gill cells of guppies *Poecilia vivipara* used as biomonitors. **Acta Microsc.** 8, 357-358.

Santos, A. A., Ranzani-Paiva, M. J. T., Felizardo, N. N., Rodrigues, E. L., 2004. Análise histopatológica de fígado de Tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **B. Inst. Pesca** 30, 141-145.

Silveira, P.M., Silva, O.F., Stone, L. F. Silva, J.G., 2001. Efeitos do preparo do solo, plantio direto e de rotações de cultura sobre o rendimento e a economicidade do feijoeiro irrigado. Pesquisa **Agropecuária brasileira** 36, 257-265.

Soares, W.L., Porto, M.F., 2007. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise à partir do uso de agrotóxicos no cerrado. **Ciência e Saúde Coletiva** 12, 131-143.

Spadotto, C.A., 1996. Uso de agrotóxicos no Brasil e riscos ambientais. Viçosa, MG: **SBCS: UFV, DPS**, 855-865.

Stone, L.F., Moreira, J.A.A., 2000. Efeito de sistemas de preparo do solo no uso da água e na produtividade de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária brasileira** 35, 835-841.

Szarek, J., Siwicki, A., Andrejewska, A., Terch-Majeswska, E., Banaszkiecz, T., 2000. Effects of the herbicide RoundupTM on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research** 50, 263-266.

Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**. 52, 1189-1197.

Van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., Van Vuren, J.H.J., 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 66, 432-440.

Veiga, M.M., 2007. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciências & Saúde Coletiva** 12, 145-152.

Vicentini, C. A., Franceschini-Vicentini, I. B., Bombonato, M. T. S., Bertolucci, B., Lima, S. G., Santos, A. S., 2005. Morphological Study of the Liver in the Teleost *Oreochromis niloticus*. **Internacional Journal of Morphology** 23, 211-216.

Winkaler, E.U, Silva A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R., 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientarium** 23, 507-514.

Zelikoff, J.T., 1998. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value form mammals? **Toxicology** 129, 63-71.

Tabela 1: Concentração letal média de Roundup® para *Poecilia vivipara*

Concentração µl/L Roundup®	Número animais expostos	Mortalidade 96 horas
00.00	6	0
15.00	6	1
25.00	6	2
35.00	6	5
45.00	6	6

Quadro 1: Resultado das alterações celulares e teciduais observadas nos grupos tratados.

Concentrações experimentais	15µl/L	25µl/L	35µl/L
Alterações celulares			
Vacuolização	+	++	+++
Inclusões lipídicas	+	++	+++
Vascularização intensa	+	++	+++
Focos hemorrágicos	+	++	+++
Melano-macrófago	+	++	+++
Foco eosinofílico	+	++	++
Núcleos picnóticos	+	++	+++
Fibrose	-	+	+
Infiltrado leucocitário	-	+	+
Necrose	-	++	+++

Legenda: (-) ausente; (+) leve, < 25% das secções; (++) moderado, 25-50% das secções; (+++) severo, > 50% das secções.

Fig.1

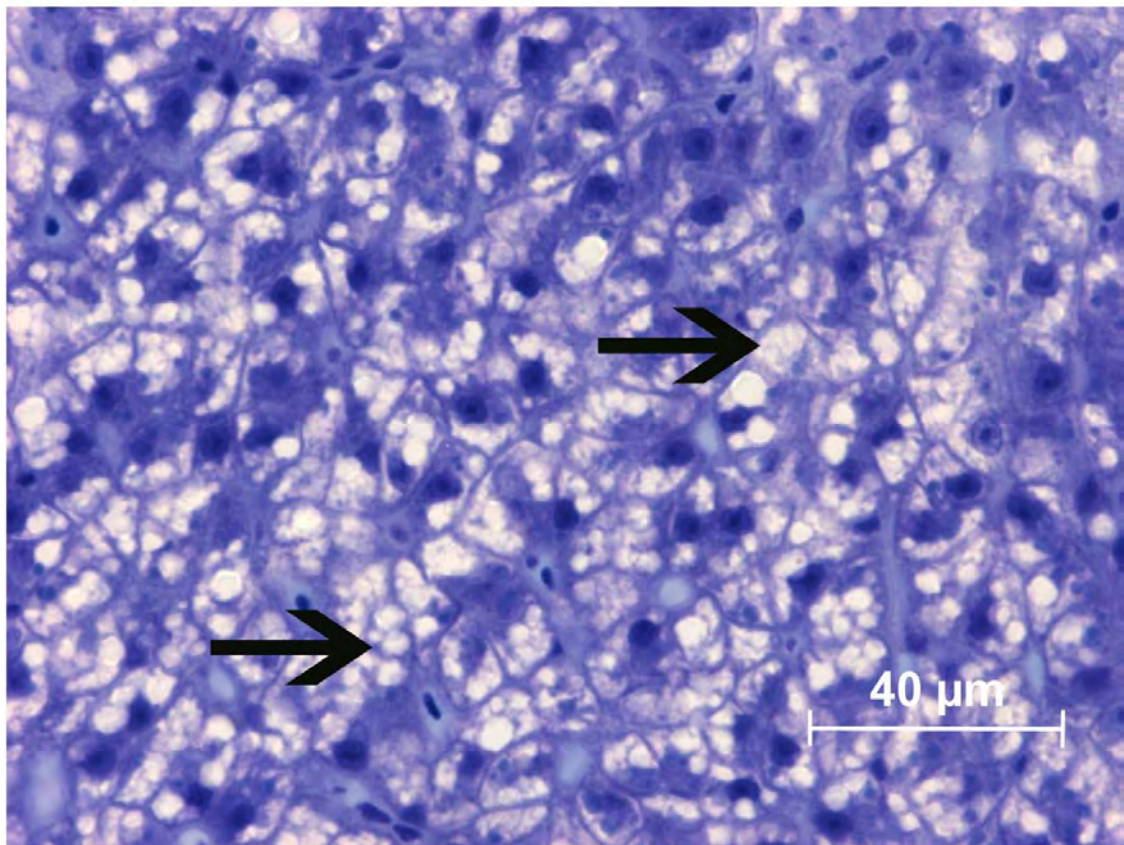
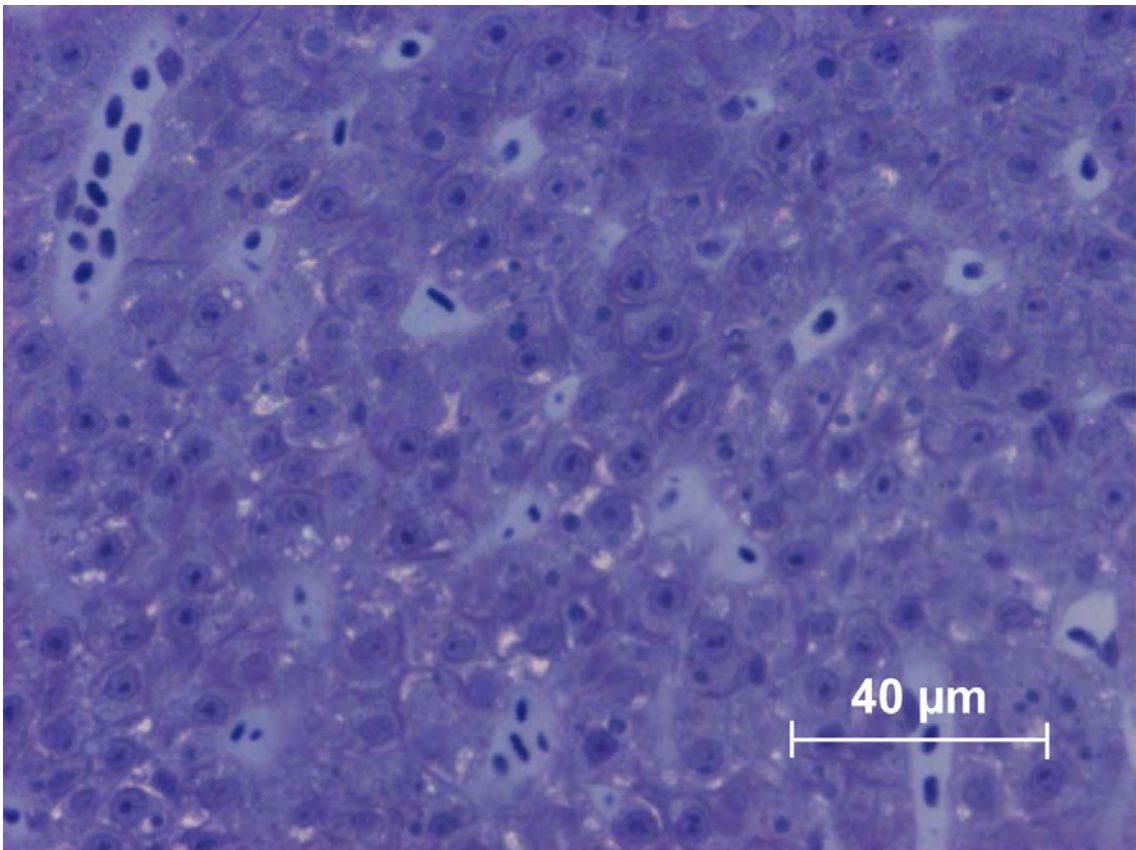


Fig.2

Fig.3

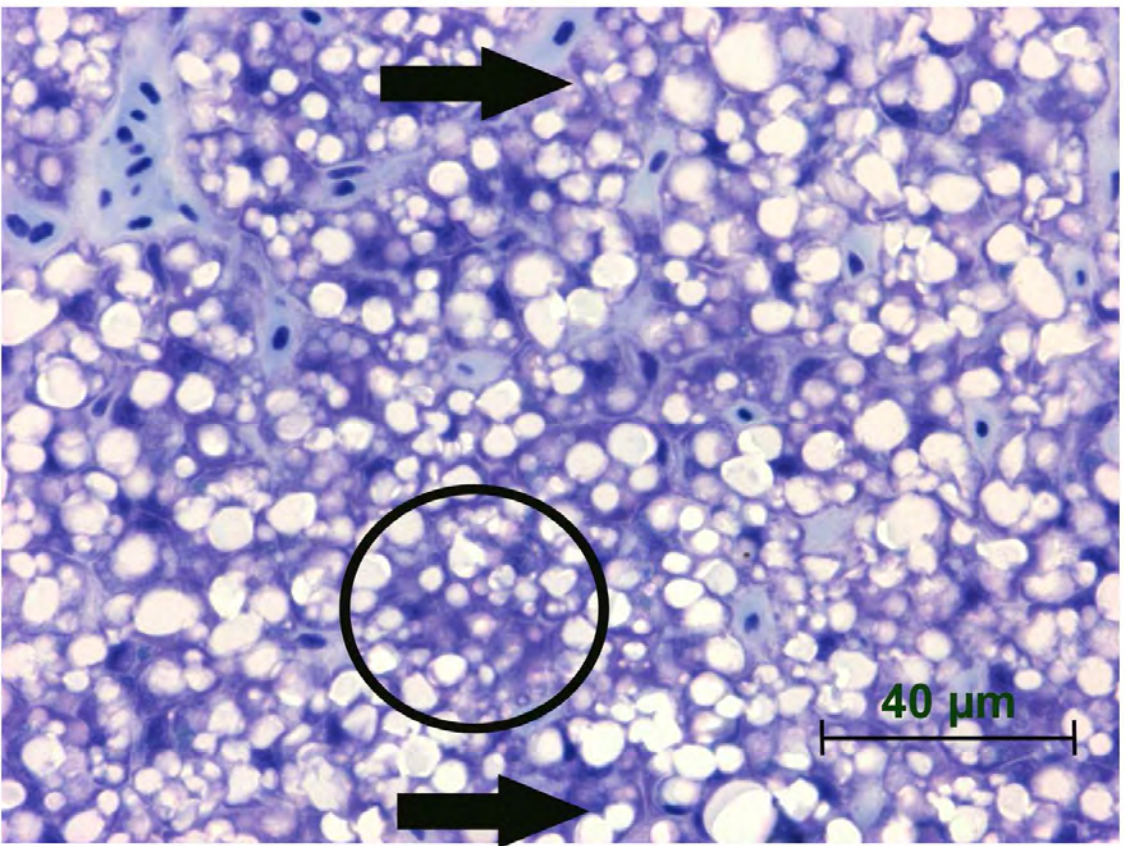
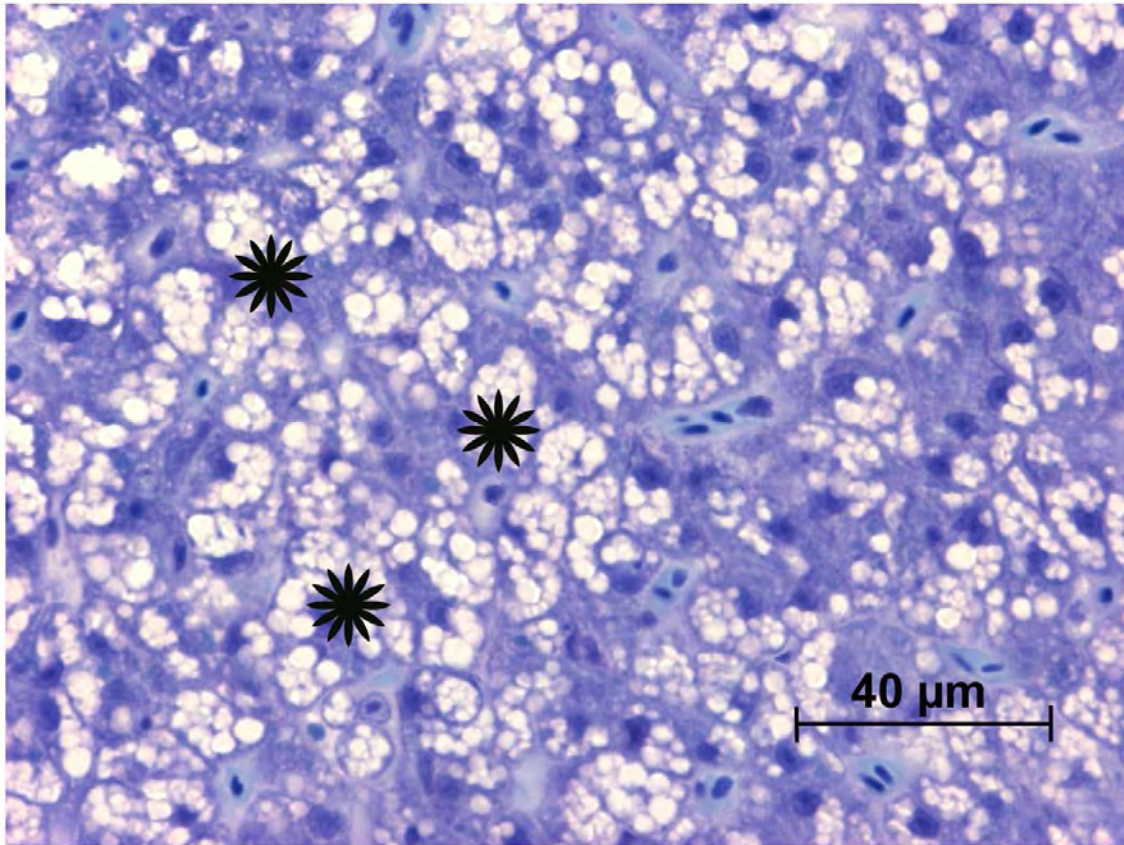


Fig.4

Fig.5

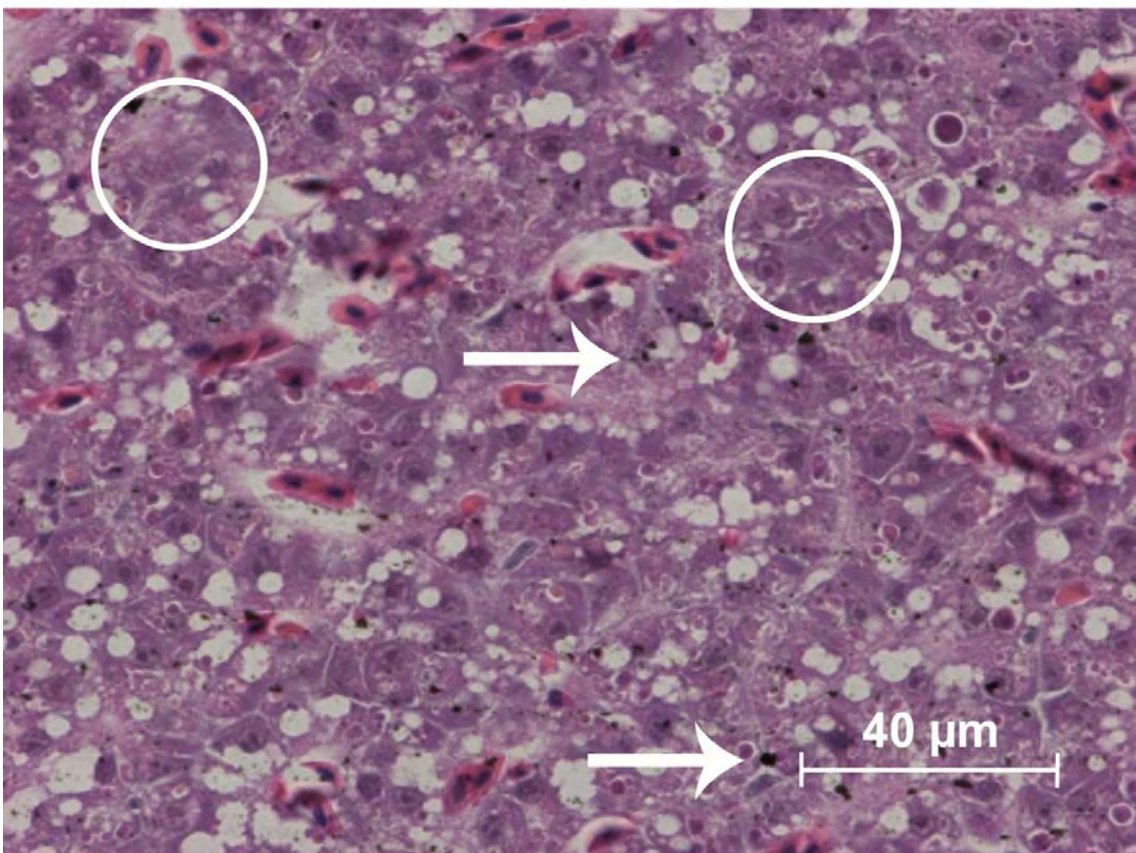
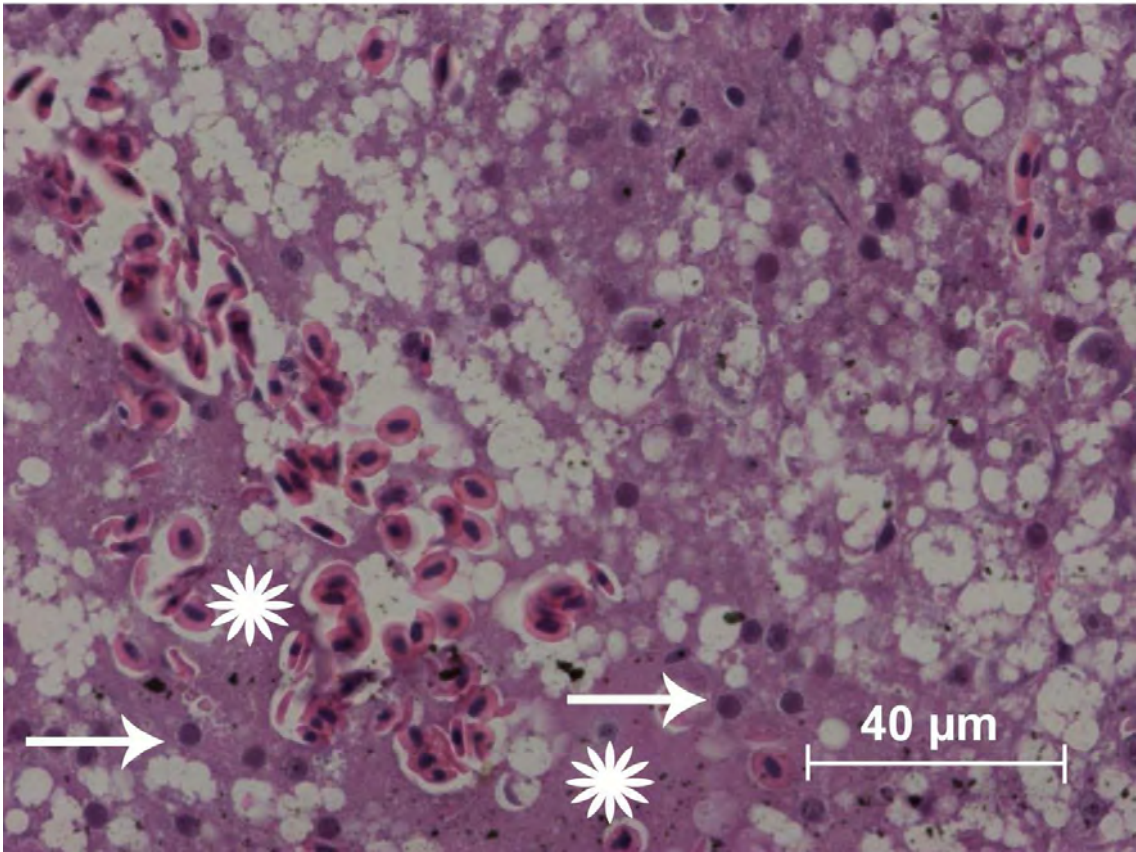


Fig.6

Fig.7

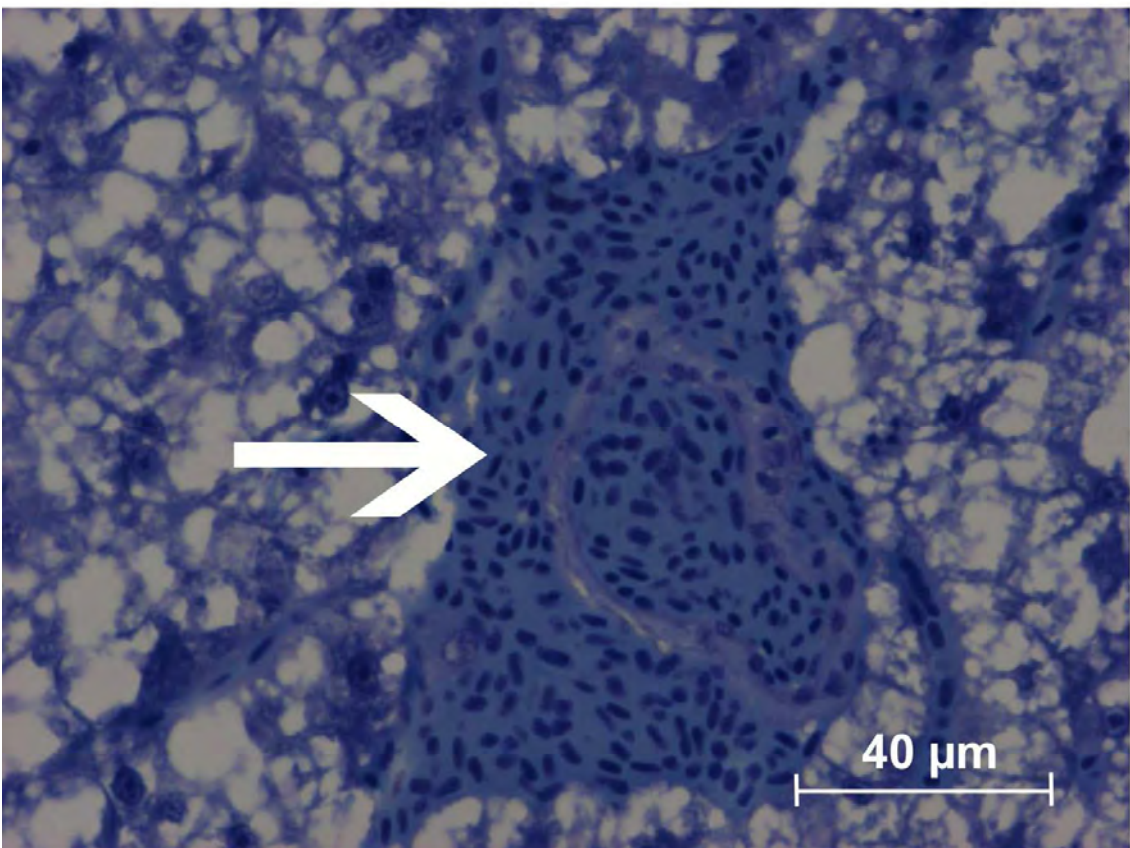
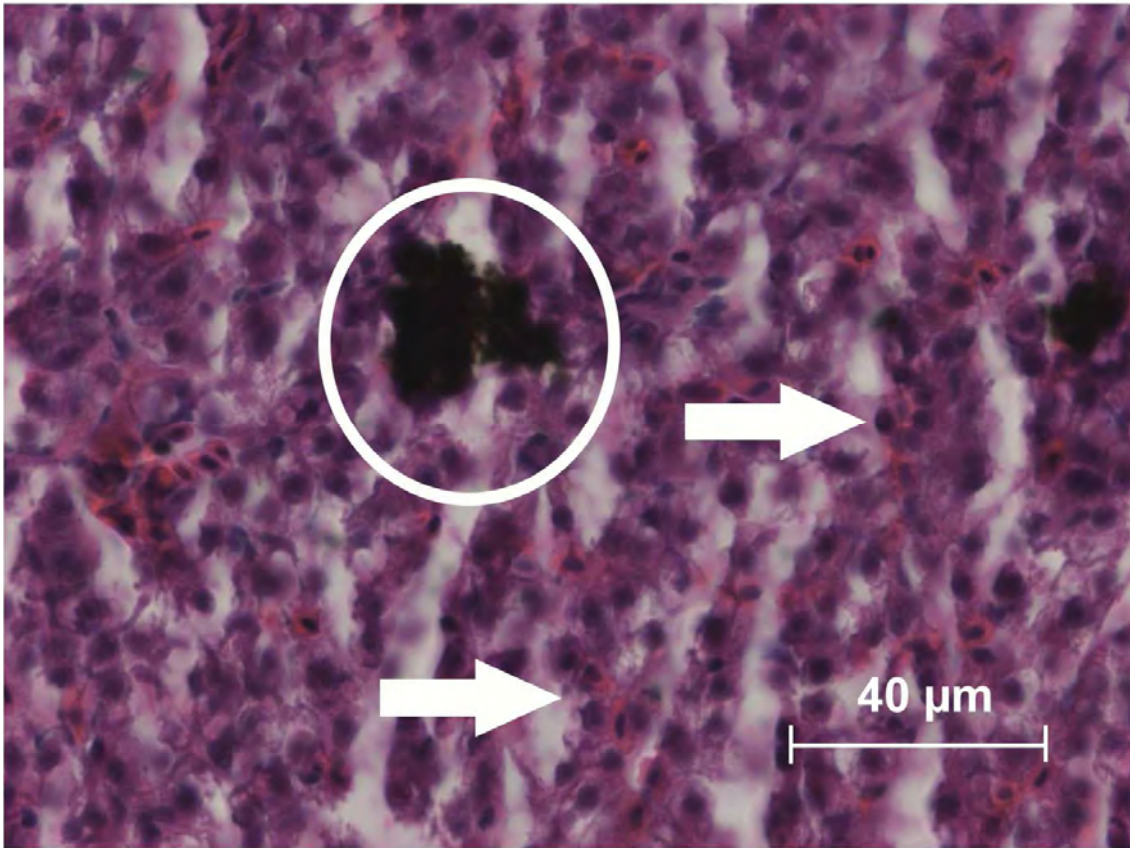


Fig.8

Fig. 1 – Fotomicrografia do grupo controle, mostrando a disposição geral dos hepatócitos (Azul de Toluidina pH 8,5; Barra = 40 μ m).

Fig. 2 – Secção do fígado com hepatócitos parcialmente vacuolizados (setas finas) quando tratados por 15 μ l/L de Roundup[®] (Azul de Toluidina pH 8,5; Barra = 40 μ m).

Fig. 3 – Parênquima hepático exposto à concentração de 25 μ l/L de Roundup[®] com intensa vacuolização celular (estrelas) (Azul de Toluidina pH 8,5; Barra = 40 μ m).

Fig. 4 - Região intermediária do fígado com hepatócitos extremamente vacuolizados (setas largas) e presença de vesículas lipídicas (círculo) que são volumosas e por vezes ocupam todo o citoplasma celular expostos em 35 μ l/L de Roundup[®] (Azul de Toluidina pH 8,5; Barra = 40 μ m).

Fig. 5 – A fibrose (estrelas) é uma reação observada em várias regiões do fígado de animais expostos a 25 μ l/L de Roundup[®], além da presença de hepatócitos com núcleos picnóticos bem evidentes (setas finas brancas) como demonstrado na fotomicrografia (HE; Barra = 40 μ m).

Fig. 6 - A necrose extensa envolvendo vários grupos de hepatócitos (círculos brancos) em material exposto a 25 μ l/L de Roundup[®] apresentando hemosiderina (setas finas brancas) distribuída no fígado (HE; Barra = 40 μ m).

Fig. 7 – Nas proximidades de vasos são encontrados melano-macrófagos (círculo) em animais expostos a 15µl/L de Roundup® e evidentes focos hemorrágicos observados (setas largas brancas) (HE; Barra = 40 µm).

Fig. 8 – Nota-se na fotomicrografia aumento da distribuição de hemácias no interior dos vasos, por isso estes estão congestionados de sangue (seta) nos grupos 15µl/L de Roundup® (Azul de Toluidina pH 8,5; Barra = 40 µm).