



ECOLOGIA

MARIANA FEDOCCI SILVA

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADO DE TILÁPIAS
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) EXPOSTAS AO HERBICIDA
2,4-D COMERCIAL**



**Rio Claro
2015**

MARIANA FEDOCCI SILVA

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADO DE TILÁPIAS
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) EXPOSTAS AO HERBICIDA
2,4-D COMERCIAL**

Orientadora: Prof^a Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti
Co-orientadora: Prof^a Ana Claudia de Castro Marcato

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Ecóloga.

Rio Claro

2015

574.5263 Silva, Mariana Fedocci Silva
S586a Análise histopatológica de fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas ao herbicida 2,4-D comercial / Mariana Fedocci Silva. - Rio Claro, 2015
31 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ecologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti
Coorientador: Ana Claudia de Castro Marcato

1. Ecologia aquática. 2. Substâncias tóxicas. 3. Poluição aquática. 4. Toxicidade aquática. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, e ao Instituto de Biociências e Laboratório de Histologia pelo acolhimento e apoio para o desenvolvimento deste trabalho. À todos os professores do curso de Ecologia, por toda competência, dedicação e esforço.

Ao técnico Gerson, à Annelize, e Jorge, pela ajuda ao longo desta pesquisa, e por toda paciência e carinho.

Meus agradecimentos carinhosos, sinceros e mais profundos à minha co-orientadora, Ana Claudia (Matraca), agradeço pela compreensão e toda ajuda fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço à minha orientadora Prof^a Carmem Silvia Fontanetti.

À todos os meus companheiros de sala, Marcella, Laila, Marcela, Jéssica, Lucas, Kaory, Flora, Isis, Felipe, Ana, Hugo, Gabilon, Cotia, por todos os momentos de felicidades e dificuldades compartilhadas.

À todas as minhas amigas de alma, que estiveram ao meu lado todo este período, Angel, Caroline, Camila, Aline, Gisele e Juliana.

Ao meu verdadeiro companheiro, parceiro de vida, Alan.

Gratidão à toda minha família pelo suporte e amor compartilhados.

RESUMO

Ao longo dos anos, a ação do homem tem provocado grande impacto no meio ambiente, principalmente em ecossistemas aquáticos, levando-o ao comprometimento da sua qualidade, uma vez que a água é considerada um dos fatores essenciais para a manutenção das funções vitais e, conseqüentemente, da vida do planeta. Entre as atividades consideradas de risco para o meio ambiente, estão as ligadas a poluição de muitos mananciais e até bacias hidrográficas inteiras, seja por resíduos industriais, esgoto doméstico, ou ainda, por substâncias utilizadas na agricultura, tais como pesticidas, herbicidas e fertilizantes. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é usado em larga escala no mundo todo, e pelo fato de ter uma longa persistência no solo, o que possibilita a lixiviação e a percolação do composto afetando corpos hídricos, estudos de sua toxicidade são relevantes e justificáveis. Desta maneira, este estudo procurou avaliar a toxicidade do herbicida 2,4-D por meio da análise de fígados de peixes *Oreochromis niloticus*, expostos a diferentes diluições. Porções dos fígados foram coletadas e fixadas para serem analisadas por meio de técnicas histológica e histoquímicas para detecção de proteínas totais, polissacarídeos e lipídios. O tratamento com o herbicida 2,4-D aparentemente não alterou o padrão lipídico, o acúmulo de polissacarídeos e a presença de proteínas totais. As concentrações 2,5 e 5,0% foram letais aos peixes. Tais mortalidades provavelmente são resultados do alto potencial tóxico e citotóxico do herbicida 2,4-D. Foram encontradas diversas alterações histopatológicas, sendo elas: perda da integridade citoplasmática, perda do limite celular, deformação nuclear, citoplasma vacuolizado, desorganização do tecido e degeneração hidrópica. As alterações estatisticamente significativas foram: degeneração hidrópica e citoplasma vacuolizado. Concluiu-se, portanto, que a análise morfológica qualitativa constitui uma importante metodologia para observação de alterações hepáticas em estudos de toxicologia. Sendo a espécie *O. niloticus* é um bioindicador eficiente de poluição aquática por 2,4-D.

Palavras-chave: Substâncias tóxicas. Poluição aquática. Toxicidade aquática.

ABSTRACT

The action of man has led, over the years, major impacts on the environment, especially in aquatic ecosystems, leading to an impairment of water quality, considered one of the essential factors for the maintenance of vital functions and consequently the life of the planet. Among the activities considered a risk for the environment are linked to pollution from many sources and even entire watersheds, whether by industrial waste, sewage, or for substances used in agriculture, such as pesticides, herbicides and fertilizers. The (2,4-D) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid is used worldwide, and the fact that its genotoxicity is proven by several studies and by its long persistence in soil, which enables the leaching and percolation of compounds affecting water bodies, toxicity studies are relevant and justifiable. Thus, this study aimed to evaluate the toxicity of 2,4-D by examining the liver of the fish *Oreochromis niloticus* exposed to different dilutions. Portions of liver were collected and fixed for histological and histochemical techniques to detect total proteins, polysaccharides and lipids. Treatment with 2,4-D herbicide apparently did not alter the lipid profiles, the accumulation of polysaccharides, and the presence of total proteins. The 2.5 and 5.0% were lethal to fish. These mortalities are probably of high toxic and cytotoxic potential of 2,4-D herbicide results. Several histopathological changes were found, such as: loss of cytoplasmic integrity, loss of cell limit, nuclear deformation, vacuolated cytoplasm, tissue disorganization and hydropic degeneration. Statistically significant changes were: hydropic degeneration and vacuolated cytoplasm. It is concluded, therefore, that the qualitative morphological analysis is an important method for observing changes in liver toxicology studies. As the *O. niloticus* species is an efficient biological indicator of water pollution by 2,4-D.

Keywords: Toxic substances. Water pollution. Aquatic toxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 2,4-D como contaminante	10
2.2 Peixes como bioindicadores	11
2.3 O fígado dos teleósteos e sua histopatologia como biomarcador.....	13
3 OBJETIVOS.	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Material biológico	17
4.2 Herbicida 2,4-diclorofenoxiacético como substância tóxica	17
4.3 Bioensaio.....	17
4.4 Técnica para análise histológica	18
4.5 Histoquímica	18
4.5.1 Polissacarídeos	18
4.5.2 Proteínas Totais	18
4.5.3 Lipídios	19
4.6 Documentação e interpretação dos resultados.....	19
5 RESULTADOS	21
5.1 Análise histológica	21
5.2 Análise histoquímica	22
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Com o mundo globalizado e capitalista em crescente ascensão, surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente. Nos dois últimos séculos, um modelo de civilização se impôs, trazendo a industrialização como forma de produção e organização de trabalho. Como consequência desta produção, tem-se a disponibilidade de uma grande diversidade de substâncias químicas e a geração de resíduos em quantidade significativamente prejudicial ao ambiente (LÓPEZ et al., 2006).

A contaminação de ambientes aquáticos por herbicidas tem sido uma preocupação, principalmente com aqueles que possuem alto poder de lixiviação. Desta forma, os organismos desses ambientes se tornam alvos destas moléculas através do contato com a água. Por consequência, eles sofrem efeitos adversos a curto, médio ou longo prazo, e ainda são capazes de transferir estes agentes químicos através da cadeia alimentar, podendo muitas vezes atingir o ser humano (SRIVASTAVA; SAHAI, 1987; SILVA et al., 2007).

Os agrotóxicos são biocidas por natureza, isto é, são venenos utilizados na agricultura para exterminar uma praga agrícola. Nesse grupo muito diversificado de compostos químicos, encontram-se fungicidas, inseticidas e herbicidas considerados extremamente agressivos ao meio ambiente e à saúde humana (GRISOLIA, 2005). Os pesticidas clorofenoxiácidos constituem importante classe de herbicidas, apresentando normalmente um longo tempo de atividade residual em solos e águas, persistindo por vários meses devido à baixa atividade microbiológica que sofre (SANCHEZ-BRUNETE, 1994), sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) um membro desta classe; tal composto é altamente seletivo, sistêmico e pré ou pós-emergente (TOMLIN, 1994).

O 2,4-D tem sido amplamente usado em todo o mundo há mais de 50 anos. Quando aplicado na plantação, é absorvido através das raízes e folhas, após, no máximo, 6 horas e é distribuído na planta através do floema (WHO, 1984). O 2,4-D é um dos herbicidas mais utilizados no controle de plantas daninhas de folhas largas (GRISOLIA, 2005).

Segundo alguns autores (KALE et al., 1995; TUKULA; JALAL, 1985; MUSTONEM et al., 1986), o 2,4-D induz aberrações cromossômicas, comprovando seu efeito mutagênico. Sulik et al. (1998), observaram que ratos recém-nascidos de fêmeas que receberam doses de 2,4-D durante a gestação apresentavam alterações histológicas e histoquímicas no fígado.

Segundo Kelly e Harwell (1989), os métodos mais relevantes do ponto de vista ecológico para avaliação da toxicidade de contaminantes são aqueles que determinam

alterações na estrutura e função dos ecossistemas. Entretanto, tais determinações são difíceis de serem elucidadas, de alto custo, exigem muito tempo e raramente são preditivas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Assim, segundo os mesmos autores, quando uma alteração significativa é evidenciada, o ecossistema já deve estar severamente danificado.

Os peixes têm sido amplamente utilizados como modelos experimentais, tanto em avaliações de saúde dos ecossistemas aquáticos como em estudos toxicológicos por diversos motivos; entre eles, podemos enumerar altas taxas de crescimento, fácil adaptação às dietas comerciais, resistência a doenças e lesões consequentes de manejo, boa reprodução em cativeiro e tolerância a várias condições ambientais (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2006; FONTANETTI et al., 2012).

De acordo com Hinton e Lauren (1990), existem muitas razões para selecionar o fígado como um importante órgão em estudos de toxicologia. Este é o primeiro órgão a atuar na biotransformação de xenobiontes e excreção de alguns metais pesados, atua na estocagem de carboidratos (glicogênio) e, especialmente em peixes, acumulam lipídios.

Assim, muitos dos danos hepáticos podem ser causados devido às toxinas acumuladas pelo fígado, consequência do processo de desintoxicação de xenobióticos, que ao causarem a degeneração dos hepatócitos acabam por limitar as funções vitais do fígado, prejudicando o organismo como um todo (SIMONATO et al., 2008; JIRAUNGKOOSKUL et al., 2002). Por isso, diversas alterações histológicas são comumente observadas em estudos de toxicidade (YILDIRIM et al., 2006; FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007a).

Segundo Simonato et al. (2008), peixes expostos a poluentes como petróleo, por exemplo, podem apresentar modificações nas células do fígado como hipertrofia e deslocamento lateral do núcleo, vacuolização e degeneração do citoplasma, entre outras. Simonato et al. (2011) demonstraram também que peixes expostos a gasolina apresentavam defesas antioxidantes ativadas em órgãos específicos, sendo o fígado, o órgão melhor adaptado para desempenhar esta função. O fígado dos peixes é predominantemente constituído por células hepáticas, que apresentam formas variáveis e se localizam concentricamente ao redor dos capilares sanguíneos, formando os cordões hepáticos.

Estas células possuem núcleos geralmente esféricos, um abundante retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, que lhes conferem uma alta atividade metabólica e biossintética (HEATH, 1995; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Nos peixes, as células hepáticas possuem diversas funções vitais, como a metabolização de proteínas, lipídios e carboidratos, processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no trato digestivo, atuam na

desintoxicação do organismo e na hematopoese durante a fase larval, além de estarem envolvidos na produção de anticorpos (VERLAG, 1982; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A resposta à toxicidade resulta também em uma rápida mobilização de reservas energéticas, como alterações nos níveis de proteínas plasmáticas e de glicogênio hepático, que permitem ao organismo atender ao aumento na demanda energética durante a exposição a fatores estressantes (MARTINEZ; CÓLUS, 2002). Essas alterações são consideradas respostas típicas ao estresse, como um mecanismo adaptativo que disponibiliza energia ao organismo para responder a esses fatores (WENDELAAR BONGA, 1997).

Segundo Junqueira e Carneiro (2004), o fígado dos vertebrados armazena lipídios e carboidratos na forma de triglicerídeos e glicogênio, respectivamente, sendo esta capacidade de armazenar metabólitos, importante porque supre o organismo de substratos energéticos no período entre refeições. Como observado em estudos recentes de histopatologia em peixes (PEREIRA et al., 2014), indivíduos expostos a ambientes poluídos podem apresentar uma diminuição na concentração do glicogênio hepático; isto revela o recrutamento deste nutriente para o combate contra a intoxicação. Além disso, com a deterioração dos hepatócitos, pode haver uma diminuição em sua capacidade de armazenamento de nutrientes.

Um aumento no tamanho dos hepatócitos também foi observado na histologia qualitativa de tilápias expostas ao cobre, devido ao alto teor de lipídios (FIGUEIREDO-FERNANDES, 2007a). Alterações nos níveis das proteínas do fígado também são observadas. Em situações de toxicidade, pode ocorrer uma concentração proteica no entorno dos vasos sanguíneos hepáticos, devido à alta atividade das células próximas a estes vasos, que acabam por entrar em contato com as toxinas mais rapidamente do que as células que se encontram no interior do tecido. Por isso, observa-se uma vacuolização mais rápida dos hepatócitos mais próximos aos grandes vasos, indicando toxicidade (PEREIRA et al., 2014).

A histopatologia aplicada em peixes como biomarcador de poluição aquática foi revista por Bernet et al. (1999), os quais criaram um método padronizado de avaliação histopatológica que permite a análise semiquantitativa de danos aos órgãos, incluindo a extensão, a significância e a importância patológica das alterações, estabelecendo danos em peixes como indicador de poluição das águas. Neste protocolo, divide-se as alterações histopatológicas em cinco grupos: distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamação e neoplasia.

Os distúrbios circulatórios incluem hemorragias e aneurismas. A neoplasia é caracterizada pela presença de tumores benignos e malignos; as alterações regressivas no tecido do fígado incluem edemas intercelulares, mudança na estrutura, no núcleo e no plasma,

atrofia, necrose, depósitos e degeneração do vacúolo; as que ocorrem no tecido intersticial incluem alteração no plasma e na estrutura, atrofia e necrose; as alterações no ducto biliar levam a alterações na estrutura e no plasma, depósitos, alteração no núcleo, atrofia e necrose. As alterações progressivas no tecido do fígado e no tecido intersticial levam a hiperplasia e hipertrofia; no ducto biliar além da hiperplasia e hipertrofia também ocorre proliferação da parede das vias biliares. A inflamação é caracterizada por exudados e infiltração (BERNET et al., 1999; MISHIRA; MOHANTY, 2008).

Neste protocolo, diferentes índices podem ser calculados, caracterizando a extensão dos danos observados na análise histológica realizada em tecidos, órgãos e padrões de reação.

A utilização de testes de toxicidade para avaliação de efeitos deletérios de agentes químicos em organismos aquáticos tem sido cada vez mais importante, pois permitem o reconhecimento dos produtos que apresentam menores riscos de impacto ambiental e toxicidade. O estudo de alterações fisiológicas, comportamentais, crescimento ou de sobrevivência em um organismo, ou em uma população, através destes testes, é de extrema importância já que fornecem informações sobre a qualidade do seu ambiente ou parte dele e ainda é capaz de mensurar qual a concentração utilizada de um determinado produto é letal.

O conhecimento de alvos biológicos de herbicidas poderá contribuir para o aprimoramento de instrumentos que possam minimizar os riscos ao ser humano e ao ambiente devido ao uso destes produtos, já que estes podem chegar aos seres humanos através da cadeia alimentar. Sendo assim, é de suma importância visualizar os efeitos de compostos em organismos aquáticos, pois somente através do conhecimento destes efeitos é que se irá adotar medidas de prevenção da utilização indiscriminada destes produtos (LEDY et al., 2003; SIMIONATO et al., 2007).

Levando em consideração a ampla utilização do 2,4-D na agricultura e a sua longa persistência no solo, que pode ser de vários meses, aumentando assim a possibilidade de lixiviação e/ou percolação do composto comprometendo corpos hídricos, o estudo de sua toxicidade é relevante e justificado. Assim, diante do exposto, este projeto teve como finalidade observar se a presença desta substância no ambiente aquático pode causar alguma reação adversa nos animais presentes neste ambiente. Para isso, foram utilizadas análises histológicas e histoquímicas de fígados de peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 2,4-D como contaminante

O 2,4-D, foi obtido pela primeira vez em 1941 por Pokorny pela reação do 2,4-diclorofenol com ácido monocloroacético na presença de hidróxido de sódio, em meio aquoso (BENLI et al., 2007). Esta substância possui o aspecto de um pó branco e odor levemente fenólico, pouco solúvel em água, dissolvendo-se porém, em solventes orgânicos e nas soluções básicas nas quais forma sais solúveis (ALMEIDA, 1962; WORTHING; HANCE, 1991).

Suas propriedades fito-hormônicas (hormônios naturais) foram descobertas em 1942, sendo verificado, posteriormente, tratar-se de um bom herbicida. Age por ação sistêmica afetando o crescimento das ervas daninhas de folhas largas (AYDIN et al., 2005).

O 2,4-D está entre os herbicidas mais utilizados do Brasil e encontra-se na classe 1 de toxicidade, ou seja, extremamente tóxico. Existem aproximadamente 1500 produtos registrados que contém o 2,4-D em sua composição (TRILLAS et al., 1994). O modo de ação do 2,4-D é através do aumento da plasticidade da parede celular e de aumentos anormais de biossíntese de proteínas e de etileno, resultando em uma descontrolada divisão celular e danos ao tecido vascular das plantas (USEPA, 2005). Portanto, o 2,4-D sendo quimicamente semelhante às auxinas, provoca um superestimulação do crescimento, culminando na morte da planta alvo (ORUÇ et al., 2004; BENLI et al., 2007).

Desta forma, este herbicida não é facilmente biodegradável, sendo frequentemente detectado em curso d'água (CHINGOMBE et al., 2006). É comumente utilizado para o controle de pós-emergência das ervas daninhas anuais e perenes de folhas largas em cereais, milho, pastagens, arroz, florestas e terras não agrícolas. Este composto emitido para o meio ambiente, principalmente a partir de fontes antropogênicas é caracterizado pela alta toxicidade, persistência e capacidade de bioacumulação (MICHALOWIC, 2005; AYDIN et al., 2005).

O uso de herbicidas nos campos agrícolas acarreta problemas de saúde devido à persistência ambiental e ao aumento na concentração dos agrotóxicos durante a passagem através da cadeia alimentar. O alimento é a principal via de exposição da população humana a estes produtos químicos e, alguns tipos de peixes e mariscos têm sido reconhecidos como principais vetores para a transferência destes contaminantes para seres humanos (ATEEC et al., 2006). O 2,4-D pode causar diversas alterações metabólicas e necrose tecidual em

organismos não alvos, incluindo membros importantes da cadeia alimentar (GALLAGHER; DI GIULIO, 1991).

Tayeb et al. (2010) utilizaram fígados de ratos para verificar a toxicidade do 2,4-D. Os animais intoxicados, pelo método de gavagem, apresentaram alterações acentuadas do tecido hepático. Após quatro semanas de tratamento, os animais submetidos à 15 mg/kg de 2,4-D, apresentaram os cordões hepáticos rompidos em muitos lugares, além de vacuolização de hepatócitos e vasodilatação. Estas alterações foram mais acentuadas após a exposição com uma dose de 75 mg/kg. A área de necrose foi especialmente mais frequente nesta concentração, além de se observarem o aumento da carga de glicogênio. O tratamento de 150 mg/kg de 2,4-D apresentou outras alterações histopatológicas como núcleos picnóticos, congestão dos hepatócitos, aumento significativo das células em necrose, vacuolização de alguns hepatócitos e perda da forma poliédrica habitual. Os cordões hepáticos também estavam interrompidos em muitas áreas, concluindo que o 2,4-D provoca hepatotoxicidade subaguda.

O herbicida 2,4-D, apesar de efetivo em plantas de folhas largas, é prejudicial quando presente nos ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo assim mesmo em doses baixas, esse agrotóxico possui ação mutagênica, genotóxica e citotóxica para as plantas que entraram em contato com essa substância, alterações comportamentais, fisiológicas e histológicas dos diferentes animais expostos a ela (MARCATO, 2014).

2.2 Peixes como bioindicadores

Embora estudos para verificação da presença de xenobióticos em coleções de água, como o realizado por Laabs et al. (2002), sejam muito importantes para alertar sobre o risco de contaminação de um grupo de contaminantes ou de um xenobiótico específico, analisar apenas as condições físico-químicas da água não é suficiente para afirmar se esta se apresenta adequada para os organismos ali presentes, pois tais análises fornecem uma resposta momentânea do que pode ser altamente dinâmico.

Handy et al. (2002) demonstraram a ocorrência de lesões branquiais e hepáticas em exemplares de *Gasterosteus aculeatus* ou peixe “esgana-gato” colhidos em vários rios do sul da Inglaterra, embora a análise da qualidade dessas águas não tenha revelado a presença de contaminantes orgânicos e metais tóxicos, sendo a mesma considerada de boa qualidade. Estes autores discutiram a possibilidade destes contaminantes estarem ausentes no momento

da análise, podendo, porém, estar presente antes desta, acarretando assim o efeito residual observado nessa espécie.

Assim, com o propósito de realizar uma avaliação mais ampla, estudos de toxicidade aguda têm se mostrado relevantes, pois através deles obtém-se um limiar do organismo em relação ao produto teste, informação essencial para estudos a longo prazo e de bioconcentração (SALAZAR et al., 1997; BERNTSSEN et al., 2008), como também para estudos que avaliam fatores que alteram a toxicidade de um composto ou substância, como pH, temperatura e salinidade (CAPKIN et al., 2006; THOMAS et al., 2008). Testes agudos subsidiam, ainda, a estimativa e/ou determinação de limites de concentração permissível, regulados por legislação, para um determinado grupo de organismos em diferentes tipos de ambientes aquáticos. Ainda, com os resultados desse tipo de teste, pode-se comparar a sensibilidade de diferentes espécies em relação a um mesmo xenobiótico, ou comparar a sensibilidade de uma única espécie a diferentes xenobióticos.

Assim, ensaios em ecotoxicologia aquática se propõem à verificação da ação dos xenobióticos através do emprego de bioindicadores, que correspondem a espécies escolhidas por sua sensibilidade ou tolerância a vários parâmetros, como poluição orgânica ou outros tipos de poluentes. Para avaliação da toxicidade nos bioindicadores, por sua vez, são empregados biomarcadores, os quais se traduzem como respostas biológicas que refletem uma medida de exposição do xenobiótico ou seu efeito tóxico, podendo ser este biomarcador de natureza bem variada como: alteração comportamental, bioquímica, histopatológica e, ainda, alterações reprodutivas e/ou do crescimento (TRIEBSKORN et al., 2002; TORRE et al., 2005).

A presença de poluentes na água pode induzir alterações morfológicas e consequentemente, estas alterações podem ser utilizadas como parâmetros para o monitoramento ambiental (PACHECO; SANTOS, 2002; MELETTI et al., 2003).

A importância dos peixes como bioindicadores de qualidade da água está centrada em dois fatores: ecológicos, uma vez que, na maturidade, certos peixes ocupam altos níveis na cadeia trófica (TONISSI, 1999; BERTOLETTI, 2000); e econômico, já que representam importantes fontes de alimentos para o ser humano (TONISSI, 1999). Os peixes apresentam numerosas vantagens como organismos indicadores, como a disponibilidade de informações sobre o ciclo de vida de grande número de espécies e por incluírem uma variedade de níveis tróficos (onívoros, herbívoros, insetívoros, planctívoros, carnívoros) (MINISSI et al., 1997).

Quando peixes e outros organismos são expostos a ambientes muito degradados, os efeitos dos poluentes podem ser dramáticos e no caso de poluição severa pode haver

mortalidade quase instantânea. Longos períodos de exposição a ambientes menos degradados podem resultar na morte de alguns indivíduos dentro de uma população, ou ainda em prejuízos bastante visíveis. Por outro lado, a curta exposição pode resultar em alterações que, mesmo não sendo letais, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (JOBLING, 1995; STREIT, 1998).

A tilápia do Nilo é explorada atualmente em 22 estados brasileiros, representando 80% da produção total de tilápias, sendo dentre as três espécies existentes de tilápia, a mais economicamente importante (MOUSA, 1999; AL-SHAMSI et al., 2000). Além do interesse para a aquicultura, as tilápias estão sendo cada vez mais utilizadas em pesquisas biológicas, em biosensaio toxicológicos ou em estudos de monitoramento ambiental, principalmente por seu pequeno porte e por serem facilmente manipuláveis (HATANAKA et al., 1982; HOOVER, 1984; FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007).

2.3 O fígado dos teleósteos e sua histopatologia como biomarcador

Segundo Hinton e Lauren (1990), o fígado é um órgão desintoxicador essencial para o metabolismo e para a excreção de substâncias tóxicas de dentro do corpo. A exposição a agentes químicos pode causar alterações no fígado e uma investigação histológica pode produzir resultados significativos. Brusle et al. (1999), afirmam que estudos com histologia de fígados de peixes poderiam servir como modelos para estudar as interações entre fatores ambientais e estruturas hepáticas e suas funções.

O fígado é um órgão chave quando se considera a ação de poluentes químicos sobre o peixe. É o primeiro órgão na biotransformação de produtos tóxicos e provavelmente também para excreção de metais. Assim, muitos metais e outros tóxicos se acumulam no fígado, de modo que as células hepáticas ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes, no ambiente ou em outros órgãos do peixe (HEATH, 1987).

O fígado de peixes teleósteos tem um considerável volume em relação ao corpo. É de cor marrom nas espécies carnívoras e marrom claro nas espécies herbívoras, mas em certos períodos do ano pode apresentar cor amarela e inclusive esbranquiçada. É composto por dois lobos: o lobo direito que está ao lado da vesícula biliar e o lobo esquerdo próximo ao baço (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Sua localização é na porção anterior da cavidade, ou está estreitamente unido a outras vísceras. É composto de células parenquimatosas (células hepáticas ou hepatócitos) e uma rede de fibras cuja função é de suportar os elementos

celulares. A superfície do fígado é envolvida por membrana serosa, e alguns septos do tecido conjuntivo desta cápsula se estendem para o interior do parênquima (GARTNER; HIATT, 2007).

O hepatócito tem forma poligonal contendo um núcleo central esférico claramente visível, embora células binucleadas possam ser observadas. O núcleo está localizado na região central ou no pólo celular voltado para o capilar sinusóide (ARANA, 1995) e usualmente possui um nucléolo bem evidente. Grande quantidade de materiais como lipídeos e glicogênio é armazenada no citoplasma das células hepáticas como produtos de reserva, sendo liberados para o sangue como fonte de energia, quando necessário.

As células hepáticas são responsáveis por diversas funções essenciais para a sobrevivência da espécie, além de realizarem importante papel no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Servem como sítios de armazenamento para muitos nutrientes, como a glicose e desintoxicam o organismo (GARTNER; HIATT, 2007).

Devido à sua função no metabolismo de poluentes e sua sensibilidade a estes, o fígado tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes, por agentes químicos orgânicos e inorgânicos. Assim, os efeitos hepatotóxicos dos diversos agentes químicos podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação aquática (HINTON et al., 1992).

Estudos histológicos são capazes de revelar-se uma ferramenta eficaz para a determinação da saúde de populações de peixes, podendo refletir até mesmo a condição de ecossistemas aquáticos como um todo. Além do mais, a análise histológica constitui um parâmetro muito sensível para o estudo patológico em peixes, sendo crucial para determinar as alterações celulares que podem ocorrer em órgãos-alvos, tais como brânquias, fígado e gônadas (DUTTA, 1996). Hinton et al. (1992), assumiram que os biomarcadores histopatológicos são valiosos como indicadores do estado geral de saúde do peixe, refletindo os efeitos da exposição a uma variedade de poluentes antropogênicos.

Os biomarcadores histológicos em peixes oferecem um número de vantagens práticas sobre outros tipos de biomarcadores, como a facilidade de colher e armazenar as amostras, a viabilidade de avaliar vários sistemas e tipos celulares de um mesmo peixe e a oportunidade de investigar peixes muito pequenos que individualmente resultariam em material insuficiente para uma avaliação bioquímica. Além dessas vantagens, nenhuma outra técnica permite a identificação do local específico do comprometimento celular (HANDY et al., 2002).

As respostas ultra-estruturais dos peixes são sensíveis o suficiente para indicar efeitos tóxicos em organismos expostos à baixa concentração de xenobióticos, o que torna este método muito útil na análise de biomarcadores de poluição aquática (PAWERT et al., 1998).

Particularmente, no caso de agrotóxicos, biomarcadores histológicos têm se mostrado bastante adequados para avaliação da ação dessas substâncias em peixes, uma vez que estas podem comprometer diferentes tecidos e órgãos, refletindo este comprometimento em alta taxa de mortalidade ou afetando a capacidade reprodutiva e a preservação da espécie, já que muitas dessas substâncias podem atuar como disruptores endócrinos (BAATRU; JUNGE, 2001; VERNONNEN et al., 2004).

Assim, as respostas prévias e as alterações pré-patológicas podem ser detectadas antes de distúrbios como a ocorrência de doença, mortalidade ou mudança na população. Consequentemente, a estratégia de biorremediação pode ser aplicada antecipadamente a fim de prevenir algum dano irreversível ao meio ambiente (KOUKOUZIKA; DIMITRIADIS, 2005).

A principal vantagem do uso de biomarcadores reside na capacidade de integrar os efeitos dos fatores abióticos, tais como substâncias químicas e temperatura, e de fatores bióticos, como agentes patogênicos que afetem a função de órgãos e a saúde do peixe (HANDY et al., 2002; ZIMMERLY, 2007).

O uso de ferramentas biológicas capazes de revelar o modo de ação de compostos potencialmente poluidores em ambientes aquáticos está em expansão, uma vez que a conservação da água e a prevenção dos efeitos deletérios decorrentes de sua contaminação são uma preocupação crescente. Por isso, o uso de biomarcadores morfológicos pode diminuir os riscos para a saúde humana e contribuir para o desenvolvimento de programas que visam preservar este ecossistema (FONTANETTI et al., 2012).

A exposição a agentes tóxicos pode causar alterações histológicas no fígado, que por este motivo pode ser utilizado como biomarcador para indicar contato prévio com tais substâncias. Embora o fígado tenha a capacidade de degradar compostos tóxicos, seus mecanismos de regulação podem ser sobrecarregados por concentrações elevadas destes produtos, resultando, consequentemente, em danos na estrutura do órgão (HINTON; LAUREN, 1990; VAN DICK, 2003).

A histologia de fígados de peixes pode, portanto, servir como um modelo para o estudo das interações entre fatores ambientais – como biotoxinas, parasitas, poluentes – e as estruturas hepáticas, bem como suas funções (BRUSLÉ; GONZALEZ, 1996).

3 OBJETIVOS.

Geral:

Auxiliar na avaliação dos impactos provocados pela presença do composto 2,4-D sobre a vida aquática, utilizando tilápias expostas a diferentes concentrações deste ácido.

Específicos:

1. Analisar possíveis alterações teciduais utilizando a histologia.
2. Avaliar a presença de polissacarídeos, proteínas totais e lipídeos utilizando testes histoquímicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Para esse estudo foram utilizados espécimes de *O. niloticus* (Perciformes, Cichlidae), com tamanho média de 7 cm, popularmente conhecidos como tilápia do Nilo, provenientes de piscicultura. Esses animais foram aclimatados em tanques com sistema de filtração, aeração adequada, por 15 dias, recebendo alimentação durante este período.

4.2 Herbicida 2,4-diclorofenoxiacético como substância tóxica

Neste estudo foi utilizado DMA 806 BR (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), da empresa Dow AgroSciences, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob nº 02108604.

4.3 Bioensaio

Para a montagem dos bioensaios o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP – Rio Claro, SP (CEUA – IB – UNESP – CRC), sob protocolo nº 6541 de 28.08.2010.

Após a aclimação, 15 tilápias foram divididas em três grupos de 5 indivíduos e cada grupo foi transferido para aquários de prova estática. O grupo controle (0 mg/l de 2,4-D) foi mantido em água limpa de poço artesiano, sem a adição de nenhum composto; o tratamento 1 foi mantido em água contaminada por 250 mg/L de 2,4-D; o tratamento 2 foi mantido em água contendo 2,4-D comercial na concentração de 500 mg/L.

O tempo de exposição dos animais ao referido composto teve duração de 96 horas, a fim de se obter a resposta aguda. Os animais permaneceram em local sem iluminação para que fosse evitada a possível fotodegradação do composto. Após este período, cinco espécimes de cada grupo foram anestesiados com benzocaína (0,1 g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e eutanasiados para a retirada do fígado.

Os fígados foram fixados em solução Bouin ou formol cálcio (de acordo com a técnica de coloração a ser empregada), permanecendo no fixador por pelo menos 2 horas.

4.4 Técnica para análise histológica

Após fixação, os fragmentos de fígado foram transferidos para solução tampão de fosfato de sódio, onde permaneceram por pelo menos 24 horas, e depois foram desidratados em solução de etanol a 70, 80, 90 e 95%. Em seguida, foram submetidos à resina de embebição (Leica Historesin – Embedding Kit), por 24 horas, em geladeira.

Posteriormente, o material foi transferido para moldes plásticos contendo resina de inclusão. Os blocos foram cortados com auxílio de micrótomo Leica. Os cortes foram então corados por Hematoxilina/Eosina ou submetidos a técnicas histoquímicas.

4.5 Histoquímica

Os testes histoquímicos foram realizados com o intuito de detectar os seguintes elementos:

4.5.1 Polissacarídeos

Para observação de polissacarídeos neutros e ácidos o material foi fixado em Bouin; foi utilizada a coloração simultânea por PAS + azul de Alcian. As lâminas foram submersas em uma solução de azul de Alcian dissolvido em ácido acético 3%, onde permaneceram por 30 minutos; em seguida foram submetidas ao reativo de Schiff por 1 hora. As lâminas foram lavadas em água sulfurosa por 9 minutos e em seguida, em água corrente, por 30 minutos. Depois de secas, as lâminas, foram montadas com bálsamo do Canadá (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

4.5.2 Proteínas Totais

O material foi fixado em Bouin e, posteriormente, foi utilizada a técnica de coloração pelo azul de bromofenol. As lâminas foram hidratadas por 5 minutos e imersas no respectivo corante, por 2 horas. Em seguida, foram lavadas em água corrente, secas e montadas com bálsamo do Canadá (PEARSE, 1985).

4.5.3 Lipídios

Para a detecção de lipídios o material foi fixado em formolcálcio; foram realizadas duas técnicas diferentes, sudan black B (lipídios totais) e azul do Nilo (lipídios ácidos). Na técnica de sudan black B, as lâminas foram imersas em solução de sudan black B a 1%, dissolvido em álcool 70%, por 30 minutos. Em seguida, lavadas em água destilada, secas e montadas com gelatina glicerizada (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Para a técnica de azul do Nilo, as lâminas foram imersas em solução de azul do Nilo, à 37°C, por 5 minutos, então lavadas em água corrente por 5 minutos e passadas no ácido acético 1%, por 1 minuto. Em seguida, foram secas e montadas com gelatina glicerizada (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

4.6 Documentação e interpretação dos resultados

Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 µm para cada peixe, sendo n=3 para cada um dos bioensaios. Assim foram analisados um total de 135 lâminas e um total de 1080 cortes histológicos para cada técnica realizada.

A descrição e a avaliação das alterações histopatológicas tiveram como base o protocolo padronizado de Bernet et al. (1999) e adaptado por Marinho et al. (2014). Um fator de importância (w) foi definido para cada lesão, de acordo com sua importância patológica, ou seja, como isso afeta a função do órgão e a capacidade de sobrevivência dos peixes.

As alterações foram previamente classificadas em três fatores de importância: (1) Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao irritante termina; (2) Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado; e (3) Importância patológica acentuada, a lesão é geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão.

Para melhor compreensão dos resultados, as anomalias histopatológicas descritas foram também classificadas em escores (a) que variaram de 0 a 6, dependendo do grau e da extensão da alteração, sendo: (0) nenhuma ocorrência; (2) pouca ou rara ocorrência; (4) ocorrência frequente; e (6) ocorrência muito frequente. Além disso, valores intermediários também foram considerados quando as alterações não foram encontradas em todos os indivíduos analisados. Ao multiplicar o fator de importância pelo escore, obtêm-se o índice da alteração. Para o cálculo do índice total de cada indivíduo, ou seja, o índice correspondente à

avaliação das alterações histopatológicas do fígado de cada animal avaliado, foi utilizado o seguinte cálculo: $\text{Índice}_{\text{ind}} = \Sigma (\text{fator de importância} \times \text{escore})$.

Foi desenvolvida, então, uma tabela própria para o presente estudo (Tabela 1), com as principais alterações encontradas nos fígados dos peixes expostos ao herbicida 2,4-D.

Tabela 1 - Principais alterações encontradas em fígado de *O. niloticus* expostos ao herbicida 2,4-D e seus respectivos fatores de importância.

	Características Analisadas	Fator de Importância (w)
Hepatócitos	Hipertrofia/ Degeneração hidrópica	2
	Perda de limite celular	3
	Citoplasma vacuolizado	1
	Citoplasma claro/lavado	3
	Deformação do núcleo	2
Parênquima Hepático	Desorganização do tecido	2

Fonte: Autora (2015)

A partir dos índices individuais foram obtidos os valores de média e desvio padrão para cada grupo – controle e tratamentos – os quais foram avaliados estatisticamente através do teste Kruskal-Wallis em níveis de 5% e 1% de significância, utilizando-se o programa Bioestat - versão 5.3.

Este procedimento foi realizado para avaliar estatisticamente o conjunto de lesões hepáticas entre os grupos. Assim, este método padronizado de avaliação permite a análise semiquantitativa de danos aos órgãos, incluindo a extensão, a significância e a importância patológica das alterações.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica

O grupo controle apresentou o padrão descrito para tecido hepático de peixes teleósteos, sendo a maioria das amostras com ausência de anormalidades patológicas (Fig. 1A). O parênquima hepático é constituído por hepatócitos que podem apresentar citoplasma homogêneo, bem corado pela hematoxilina/eosina, ou mais heterogêneo, com aspecto mais claro (Fig. 1A). Como descrito para a espécie, o órgão exibiu ácinos pancreáticos exócrinos espalhados ao longo de todo o tecido, associados a uma veia aferente. Os hepatócitos apresentaram um ou dois núcleos grandes e esféricos, podendo ser centrais ou excentricamente localizados, com nucléolos bem evidentes. Verificou-se, também, a presença de sinusóides permeando as células hepáticas, com eritrócitos nucleados típicos de peixes teleósteos.

Nos grupos tratamentos 2,5 e 5%, verificaram-se diversas alterações, as principais foram: degeneração hidrópica (Fig. 1B), citoplasma claro (Fig. 1B), citoplasma vacuolizado (Fig. 1C), desorganização do tecido (Fig. 1D), deformação do núcleo (Fig. 1E), perda de limite celular (Fig. 1F).

Quando se avaliou estatisticamente o conjunto de lesões observadas por grupo, verificou-se que as alterações “citoplasma vacuolizado” e “degeneração hidrópica” foram significativas pela análise estatística para $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle negativo. A alteração “citoplasma vacuolizado” foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo tratamento 1. As alterações encontram-se sintetizadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Frequência de ocorrência de alterações hepáticas significativas encontradas em *O. niloticus* expostos ao herbicida 2,4D.

	Controle	T 2,5%	T 5,0%
Citoplasma claro	1,33±2,64	5,11±3,01	6,44±2,60*
Perda do limite celular	0	1,33±2,64	2,66±3,16
Deformação nuclear	0	0,44±1,33	1,77±2,10
Citoplasma vacuolizado	0,66±1,41	0,44±0,88	3,55±2,60**
Desorganização tecidual	0	0	0,88±1,76
Degeneração hidrópica	2,22±2,10	7,55±5,07	9,33±3,46*

Fonte: Autora (2015)

Dados apresentados como média ± desvio padrão

T 2,5% : Tratamento 2,5%. T 5,0%: Tratamento 5%.

*Valor significativo para $p < 0,05$ pelo método de Kruskal-Wallis quando comparados ao grupo controle.

**Valor significativo para $p < 0,05$ pelo método de Kruskal-Wallis quando comparados ao tratamento 1.

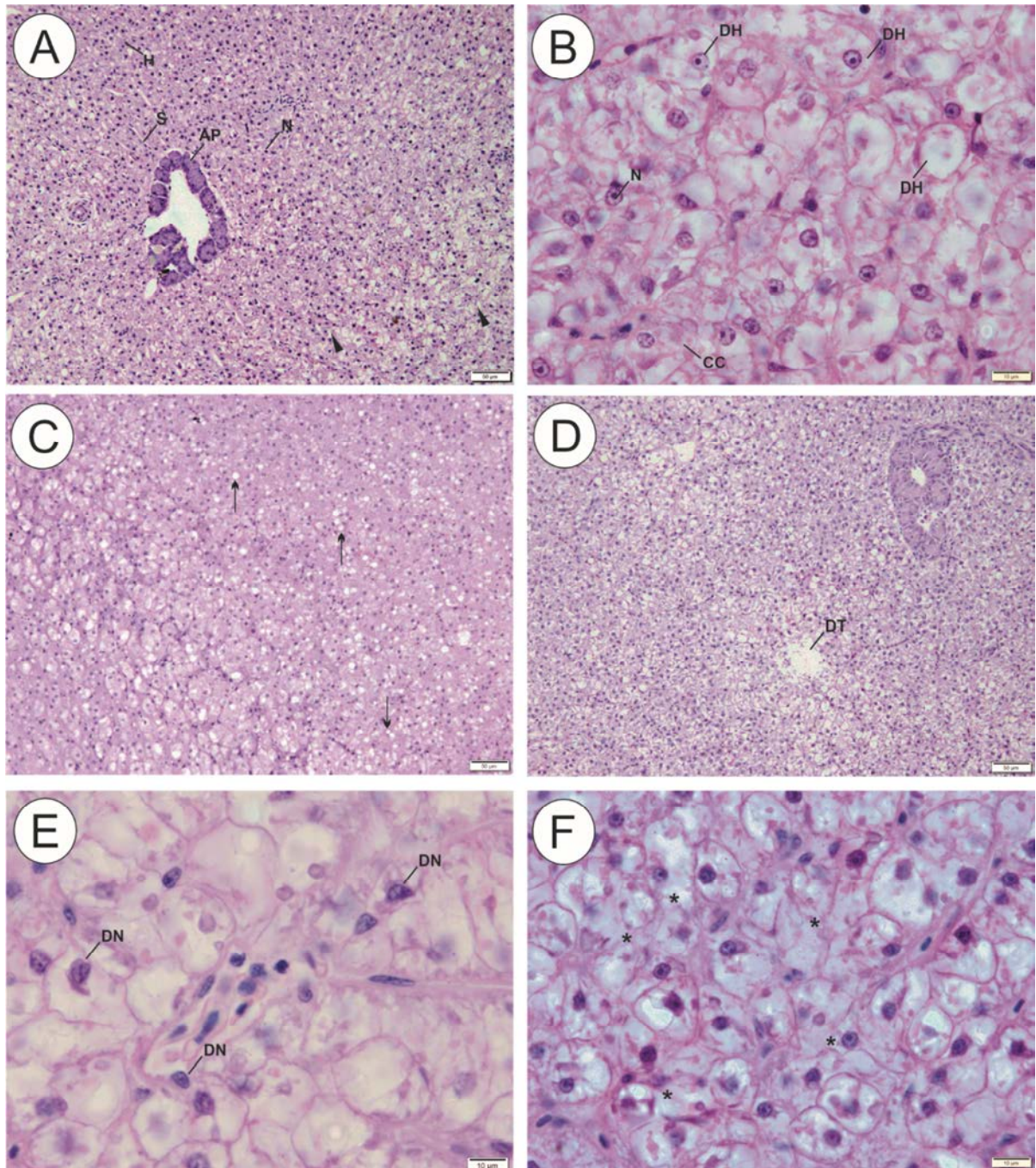


Figura 1 - Secções histológicas de fígados de *O. niloticus* submetidos ao teste hematoxilina-eosina. **Grupo Controle (A)** e **Grupo tratamento (B, C, D, E, F, G, H)**. AP: ácino pancreático, H: hepatócito homogêneo, S: sinusóide, N: núcleo, Cabeça de seta: hepatócito heterogêneo, DH: degeneração hidrópica, CC: citoplasma claro, Seta: vacúolo, DT: desorganização tecidual, DN: deformação nuclear, *: perda de limite celular.

5.2 Análise histoquímica

Assim como Marinho et al. (2014), os padrões histoquímicos para a detecção proteica e lipídica não sofreram alteração neste estudo. Ambos apresentaram o citoplasma de seus

hepatócitos moderadamente positivo aos testes, apresentando áreas menos coradas conforme o padrão da coloração histológica. O padrão histoquímico para a detecção de polissacarídeos também não sofreu alteração.

6 DISCUSSÃO

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de pesticidas para controlar as pragas que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. A aplicação de pesticidas gera, comumente, grandes problemas; os pesticidas muitas vezes são tóxicos, podendo ser cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios (COLBORN et al., 1997); são aplicados em grande quantidade, em áreas bastante extensas e, geralmente, possuem grande persistência no meio ambiente, além de gerar sérios problemas de qualidade das águas superficiais e subterrâneas (BAIRD, 2002).

O aporte de agrotóxicos e fertilizantes, ricos em compostos fosfatados e nitrogenados (ASARE et al., 2000; BAPTISTA et al., 2003), são produtos químicos sintéticos estranhos ao ambiente, de difícil assimilação e que interferem negativamente na estrutura e funcionamento do ambiente (FRACÁCIO et al., 2001).

O efeito e a magnitude decorrentes do uso de agrotóxicos no ambiente dependem basicamente dos processos de transferência e transformações que ocorrem em cada compartimento do sistema solo-água-planta-atmosfera (MARTINS; MÍDIO, 1998). As maiores rotas de dispersão de pesticidas para sistemas aquáticos são o escoamento superficial e a drenagem. Sendo assim, levando em consideração que a variedade e a quantidade de produtos aplicados na agricultura aumentaram drasticamente, torna-se necessário o monitoramento de eventuais resíduos no ambiente (BRITO et al., 2001).

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas recebem especial atenção em função da grande quantidade lançada anualmente nos campos agrícolas (SILVA, 1999). Neste grupo, vários produtos como a atrazina, o picloram, e o estudado no presente estudo, o herbicida 2,4-D, apresentam considerável risco de lixiviação podendo, muitas vezes atingir e contaminar o lençol freático.

O 2,4-D é considerado não tóxico para peixes em doses baixas (GALLEGHER; DI GIULIO, 1991), porém alguns autores afirmaram o contrário. Yalmaz e Sarikaya (2003) descreveram o herbicida como sendo altamente tóxico para os peixes, tendo efeitos muito nocivos para os seres humanos e animais, uma vez que se acumula nos tecidos e provoca envenenamento agudo (WHO, 1984).

Diversos trabalhos têm utilizado o fígado na avaliação de impactos de poluentes em peixes, como mostram Neskovic et al. (1996), que relataram a ocorrência de fibrose e

congestão de sinusóides em carpa comum (*Cyprinus carpio*) expostos ao herbicida glifosato. No trabalho de Jiraungkoorskul et al. (2002) no qual tilápias (*O. niloticus*) também foram expostas ao glifosato, foi observado infiltração de leucócitos, aumento do tamanho dos hepatócitos com núcleo picnótico e presença de vacúolos em tilápia nos peixes.

Fonseca et al. (2008), a partir dos resultados obtidos em suas pesquisas, indicaram que o 2,4-D afeta o cérebro e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) dos músculos e alguns parâmetros metabólicos do sangue e tecidos do peixe piapara (*Leporinus obtusidens*), provavelmente devido ao estresse gerado pela toxicidade do herbicida.

Alterações histológicas típicas de respostas agudas puderam ser encontradas, no presente estudo, nos indivíduos de todos os tratamentos, em especial os expostos às maiores concentrações do herbicida 2,4-D. Isso pode ser explicado pelo fato dos hepatócitos serem considerados o primeiro alvo da toxicidade de uma substância, o que caracteriza o fígado como um excelente biomarcador da poluição ambiental (ZELIKOFF, 1998).

Vale lembrar que para uma interpretação correta dos resultados em avaliações histopatológicas é importante perceber que uma condição de controle saudável não se caracteriza pela completa ausência de quaisquer características histopatológicas, de maneira que os indivíduos podem apresentar algumas alterações moderadas, como pequenas modificações estruturais ou leves reações inflamatórias (BERNET et al., 2004; ZIMMERLI, 2007).

A degeneração hidrópica foi observada em todos os tratamentos, com alta frequência, essa alteração é caracterizada pelo aumento do volume da célula devido ao acúmulo de água e eletrólitos em seu interior (ROBBINS et al., 1989). Em um estudo realizado em 2006 por Yildirim et al., em que tilápias foram expostas ao inseticida Deltametrin, também foi observada tal alteração nos hepatócitos nos fígados dos peixes.

As áreas com citoplasma mais claro se referem às áreas com perda de integridade citoplasmática e indicam um processo de degradação, e sua crescente frequência relacionada ao aumento da concentração do herbicida pode indicar a ocorrência de um processo tóxico no fígado.

A perda do limite celular e a deformação do núcleo foram características encontradas com frequência nos indivíduos expostos. A desorganização do tecido hepático foi observada apenas nos indivíduos expostos a 500 mg/L, ou seja, os indivíduos presentes no tratamento 2. Segundo Akaishi et al. (2004), essas características sugerem alterações drásticas na distribuição de organelas, o que pode trazer consequências graves para o funcionamento do

órgão. Os autores estudaram fígados de peixes contaminados com petróleo e puderam detectar as mesmas alterações.

Marinho et al. (2014) avaliou a toxicidade da vinhaça por meio da análise de fígados de peixes *O. niloticus*, expostos a diferentes diluições de vinhaça (1, 2,5, 5 e 10%) em dois bioensaios laboratoriais. Na análise histológica, também foram encontradas diversas alterações histopatológicas estatisticamente significativas, similares ao presente estudo, tais como: degeneração hidrópica, núcleo picnótico, perda da integridade citoplasmática, perda de limite celular e desorganização do tecido.

7 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos por meio da análise histopatológica de fígado de peixes da espécie *O. niloticus*, expostos a diferentes concentrações do herbicida 2,4-D, pode-se concluir que:

- As concentrações 2,5 e 5,0% foram letais aos peixes. Tais mortalidades provavelmente são resultados do alto potencial tóxico e citotóxico do herbicida 2,4-D.
- Foram encontradas diversas alterações histopatológicas, sendo elas: perda da integridade citoplasmática, perda do limite celular, deformação nuclear, citoplasma vacuolizado, desorganização do tecido e degeneração hidrópica. As alterações estatisticamente significativas foram: degeneração hidrópica e citoplasma vacuolizado.
- As análises histológicas nos fígados indicaram a ocorrência de lesões histopatológicas que podem prejudicar o funcionamento do órgão e assim interferir diretamente em processos fundamentais para a manutenção da homeostase dos peixes.
- O tratamento com o herbicida 2,4-D aparentemente não alterou o padrão lipídico, o acúmulo de polissacarídeos, e a presença de proteínas totais.
- A análise morfológica qualitativa constitui uma importante metodologia para observação de alterações hepáticas em estudos de toxicologia, sendo suas interpretações corroboradas pelas avaliações semiquantitativas.
- A espécie *O. niloticus* é um bioindicador eficiente de poluição aquática por 2,4-D.

REFERÊNCIAS

- AKAISHI, F.M. et al. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 46, p. 244–253, 2004.
- ALMEIDA, N. F. **Química dos Pesticidas**. Instituto Biológico de São Paulo, edição do Fundo de Pesquisa do Instituto de Biologia, 1962. p. 196-197.
- AL-SHAMSI, L.; HAMZA, W.; EL-SAYED, A.-F. Effects of food sources on growth rates and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 9, p. 447-455, 2006.
- ARANA, S. Estrutura histológica do fígado de peixes. Jaboticabal: 1995. **Semana sobre histologia de peixes**, p. 39-41. Resumo.
- ASARE, D.K. et al. Impact of irrigation scheduling practices on pesticides leaching at a regional level. **Agricultural Water Management**, v. 43, p. 311-325, 2000.
- ATEEQ, B. et al. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105-113, 2002.
- AYDIN, H.; ÖZDEMİR, N.; UZUNÖREN, N. Investigation of the accumulation of 2,4-dichlorophenxyacetic acid (2,4-D) in rat kidney. **Forensic Science International**, v. 153, p. 53-57, 2005.
- BAATRUP, E.; JUNGE, M. Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. **Environ. Health. Perspect**, v. 109, p. 1063–1070, 2001.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BAPTISTA, D.F.; BUSS, D.F.; EGLER, M. Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F. (Org). **E veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p.157-175.
- BENLI, A.Ç.K. et al. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 18230). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 296-299, 2007.
- BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish. Dis.**, v. 22, p. 25-34, 1999.
- BERNTSSEN, M.H.G. et al. Accumulation and elimination kinetics of dietary endosulfan in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquat. Toxicol**, v. 86, p. 104–111, 2008.
- BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio*** (Pisces, Cyprinidae). 2000. 118 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BRITO, L.T. Análise de brânquias de peixes expostos às águas de ambiente lântico. **Trabalho de conclusão de curso (TCC)**. UNESP- IB- Rio Claro/SP, 2009.

BRUSLE, J.; GONZALEZ, G.; ANADON, G. G. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. (Eds.). **Fish Morphology Science Publishers**, USA, p. 77–93, 1999.

CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, v. 64, p. 1793–1800, 2006.

CHIMGOMBE, P.; SAHA, B.; WAKEMAN, R. J. Effect of surface modification of activated carbon on the sorption of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and benazolin from water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, p.44- 442, 2006.

CLAUDIA, A.C.M. Investigação da toxicidade do herbicida 2,4-D comercial utilizando *O. niloticus* como biomarcador. **Dissertação (Mestrado)**. UNESP-IB- Rio Claro/SP, 2014.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **O Futuro Roubado**. Porto Alegre: L & PM Ed., 1997.

DUTTA, H.M. A composite approach for evaluation of the effects of pesticides on fish. In: (eds) MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. **Fish morphology**. Science Publishers Inc., 1996.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A. et al. Effects of the Fungicide Mancozeb on Liver Structure of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Assessment and Quantification of Induced Cytological Changes Using Qualitative Histopathology and the Stereological Point-Sampled Intercept Method. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 76, p. 249–255, 2006.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.M. et al. Spatial relationships of the intrahepatic vascular–biliary tracts and associated pancreatic acini of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae): A serial section study by light microscopy. **Annals of Anatomy**, v. 189, p. 17-30, 2007.

FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T.S.; CHRISTOFOLETTI, C.A. The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. In: Bilibio, C.; Hensel, O.; Selbach, J. (Org.). **Sustainable water management in the tropics and subtropics – and case studies in Brazil**. Vol. 3. Jaguarão/RS: Fundação Universidade Federal do Pampa, UNIKASSEL, 2012. p. 975–1006.

FRACÁCIO, R. Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) e análises limnológicas para avaliação ambiental dos reservatórios do médio e baixo tiete (SP). 2001. 233 f. **Dissertação (Mestrado)** – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

GALLAGHER, E.; DI GIULIO, R. Effects of 2,4-D dichlorophenoacetic acid and picloran on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Toxicology Letters**, v. 57, p. 65- 72, 1991.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005. 392p.

HANDY, R.D.; RUNNALLS, T.; RUSSELL, P.M. Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the Freshwater Fisheries Directive. **Ecotoxicology**, v. 11, p. 467–479, 2002.

HATANAKA, J. et al. Usefulness and rapidity of screening for the toxicity and carcinogenicity of chemicals in medaka, *Oryzias latipes*. **Jpn. J. Exp. Med.**, v. 52, p. 243–253, 1982.

HEALTH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2. ed. Boca Raton: FL, CRC Lewis Publishers, 1995. p. 125–140.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1987.

HINTON, D.E. et al. (Eds.). **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 1992. p. 155-210.

HINTON, D.E. et al. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. p. 155-208.

HINTON, D.E.; LAUREN, D.J. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. In: **AMERICAN FISHERIES SOCIETY**, v. 8, p. 51-66, 1990.

HOOVER, K. L. **Use of small fish species in carcinogenicity testing**. Proceedings of Symposium. National Cancer Institution Monographs No. 65, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1984. p. 409.

JIRAUNGKOOSKUL, W. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci. Ásia.**, v. 28, n. 2, p. 121-127, 2002.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. London: Chapman e Hall, 1995.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Guanabara Koogan S.A., 2004. p. 324-334.

KALE, P.G. et al. Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 25, p. 148-153, 1995.

KELLY, J.R.; HARWELL, M.A. Indicators of ecosystem response and recovery. In: LEVIN, S.A. et al. **Ecotoxicology: Problems and Approaches**. New York: Springer Verlag, 1989. p. 9-40.

- KOUKOUKIJIA, N.; DIMITRIADIS, V.K. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece Coast: “Lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress”. **Ecotoxicol**, v. 14, p. 449–463, 2005.
- LAABS, V. et al. Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. **J. Environ**, v. 31, p. 1636– 1648, 2002.
- LEDY, K.; GIABÉRINI, L.; PIHAN, J.C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta fario* in acidic, aluminium containing stream water. **Dis Aquat Org**, v. 56, p. 235-240, 2003.
- LÓPEZ, M.J. et al. Descolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganism isolated from composting environment. **Enzyme Microb Technol**, v. 401, p. 42-45, 2006.
- MARCATO, A.C.C.; YABUKI, A.T.; FONTANETTI, C.S. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. **Environ. Sci. Pollut. Res**, v. 21, p. 13095-13102, 2014.
- MARINHO, J.F.U. et al. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239-245, 2014.
- MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E. et al. (Eds.). **A Bacia do Rio Tibagi**. v. 29. Londrina: Edição dos Editores, 2002. p. 551-577.
- MARTINS, D.I.; MÍDIO, A.F. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.10, p. 11-13, 1998.
- MELETTI, P.C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C.B.R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (Eds.). **Limnologia Fluvial – um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, 2002. p. 149-180.
- MICHALOWICZ, J. The occurrence of chlorophenols, chlorocatechols and chlorinated methoxyphenols in drinking water of the largest cities in Poland. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 14, p. 327-333, 2005.
- MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, v. 393, p.1 7-21, 1997.
- MOUSA, M. A; MOUSA, S.A. Immunocytochemical Study on the Localization and Distribution of the Somatolactin Cells in the Pituitary Gland and the Brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, p. 197-211, 1999.
- MUSTONEM, R. et al. Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations *in vitro* and *in vivo*. **Mutagenesis**, v. 16, p. 37-48, 1996.
- NAKBI, A. et al. Hypolipidemic and antioxidant activities of virgin olive oil and its fraction in 2,4- dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. **Nutrition**, v. 28, p. 81-91, 2012.

NESKOVIC, N.K; POLEKZIC, V.; ELEZOVIC, I. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carp (*Cyprinus carpio* L). **Environmental contamination and toxicology**, v. 56, p. 295-302, 1996.

ORUÇ, E.O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 137, p. 43-51, 2004.

OTURAN, M.A. An ecologically effective water treatment technique using electrochemically generated hydroxyl radicals for *in situ* destruction of organic pollutants: Application to herbicide 2,4-D. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 30, n. 4, p. 475- 482, 2000.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 3, p. 331-347, 2002.

PAWERT, M.; MÜLLER, E.; TRIEBSKOM, R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. **Tissue e Cell**, v. 30, p. 617–626, 1998.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. 2. ed. Churchill: Livingstone, 1985. p. 449.

PELLER, J.; WIEST, O.; KAMAT, P. V. Hydroxyl radical's role in the remediation of a common herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). **Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 50, p. 10925-10933, 2004.

PEREIRA, B.F. et al. Effects of Biodegradable Detergents in Morphological Parameters of Liver in Two Neotropical Fish Species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). **Microscopy Research**, 2014. DOI: 10.4236/mr.2014.22006.

RIBEIRO, B.T.; LIMA, J.M.; JULIÃO, L.G.F. Influência da vinhaça na adsorção e dessorção de Cd e Pb em um cambissolo. **XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2007.

ROBBINS, S.L; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Robbins pathologic basis of disease**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1989. 1519p.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; GARCIA-VALCARCEL, A. I.; TADEO, J. L. Determination of residues of phenoxi acid herbicides in soil and cereals by gas chromatography-ion trap detection. **J. Chromatogr. A.**, v. 675, n. 1-2, p. 213- 218, 1994.

SILVA, S. C. Brasil é o quarto maior consumidor de agrotóxicos. **O Estado de São Paulo**, Geral Ambiente, 18.julho, p. A16, 1999.

SIMIONATO, J.D.; FERNANDES M.N.; MARTINEZ C.B.R. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicological and Enviromental Safety**. v. 20, p. 1400-1410, 2011.

SIMIONATO, J.D.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicological and Enviromental Safety**, v. 69, p. 112-120, 2008.

SRIVASTAVA, N.; SAHAI, R. Effects of distillery waste on the performance of *Cicer arietinum*. L. **Environmental Pollution**, v. 43, p. 91-102, 1987.

STREIT, B. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: BRAUNBECK, T.; HITON, D. E.; STREIT, B (Ed.). **Fish ecotoxicology**. Basel: Birkhauser, 1998. p. 353-387.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2. ed. 1995.

TAYEB, W. et al. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourde” **Journal of Hazardous Materials**, v. 180 p. 225-223, 2010.

THOMAS, C.R. et al. Effects of river water and salinity on the toxicity of deltamethrin to freshwater shrimp, cladoceran, and fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 55, p. 610–618, 2008.

TOMLIN, C. (Ed.). **The pesticide manual: incorporate the agrochemical handbook**. 10th ed. Cambridge: British Crop Protection Council. The Royal Society of Chemistry, 1994. p. 1341.

TONISSI, F.B. **Avaliação ecotoxicológica do reservatório de Salto Grande, Americana (SP), com subsídios para análise da qualidade ambiental do sistema**. 130 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1999.

TORRE, F.R. de la; FERRARI, L.; SALIBIÁN. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. **Chemosphere**, v. 59, p. 577–583, 2005.

TRIEBSKON, R. et al. Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. **Ecotoxicol.**, v. 11, p. 451–465, 2002.

TUKULA, T.E.; JALAL, S.M. Increase rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicide 2,4-D. **J. Heredity**, v. 76, p. 213-2144, 1985.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA), 2005. Registration Eligibility Decision for 2,4-D. EPA 738-R-05-002. June 2005.

VERLAG, G.F. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Tokyo: Kodansha Ltd., 1982.

VERSONNEN, B.J. et al. Estrogenic and toxic effects of methoxychlor on zebrafish (*Danio rerio*). **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 23, n. 9, p. 2194–2201, 2004.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591-625, 1997.

WHO (World Health Organization), Switzerland. Environmental Health Criteria 29: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D), 1984.

WORTHING, C.R.; HANCE, R.J. **The Pesticide Manual**, British Crop Protection Council, 9th, p. 218-219, 1991.

YLDIRIM, M.Z. et al. Acute Toxicity, Behavioral Changes, and Histopathological Effects of Deltamethrin on Tissues (Gills, Liver, Brain, Spleen, Kidney, Muscle, Skin) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Fingerlings. **Environmental Toxicology**, v. 21, p. 614-620, 2006.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

ZELIKOFF, J.T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology**, n.129, v.1, p. 63-71, 1998

ZIMMERLI, S. et al. Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. **Aquatic Sciences**, v. 69, p. 11–25, 2007.