



**LESÕES EM ÓRGÃOS-ALVO DE CURIMATÃ *Prochilodus lacustris*
(STEINDACHNER 1907) NA AVALIAÇÃO DE IMPACTOS NO LAGO AÇU, ÁREA
DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DA BAIXADA MARANHENSE**

MARIANNA D'MARCO ARAÚJO LARANJA PINTO; INGRID CAROLINE MOREIRA
LIMA; DENISE DA SILVA SOUSA; NATÁLIA JOVITA PEREIRA COUTO; DÉBORA
MARTINS SILVA SANTOS

RESUMO

O Lago Açu, localizado no município maranhense de Conceição do Lago Açu, apesar de estar inserido na Área de Proteção Ambiental (APA) da Baixada Maranhense, tem apresentado fragilidade ambiental. Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivo avaliar alterações histológicas em brânquias e fígados de curimatã em resposta à impactos ambientais no Lago Açu. As coletas de peixes foram realizadas em setembro/2022 e junho/2023, correspondendo ao período de estiagem e chuvoso, respectivamente. Um total de sessenta *Prochilodus lacustris* foram coletados no lago, sendo 30 em cada coleta, e retirados brânquias e fígados para fixação em formaldeído a 10%. Os fragmentos desses órgãos foram submetidos à técnica de inclusão em parafina. Os blocos em parafina foram seccionados em 5µm de espessura com auxílio de micrótomo e as lâminas histológicas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. As lesões branquiais e hepáticas foram avaliadas pelo cálculo do Índice de Alteração Histológicas (IAH). O IAH branquial não apresentou diferença estatística entre os períodos sazonais ($p>0,05$), e as principais alterações branquiais observadas foram: hiperplasia do epitélio lamelar, fusão completa de várias lamelas e congestão vascular. A análise hepática demonstrou diferença estatística entre as estações, com maiores valores de IAH para o período de estiagem ($p>0,05$). As principais alterações hepáticas observadas foram: deformação do contorno celular, hipertrofia nuclear, vacuolização e centro de melanomacrófagos. Os biomarcadores histológicos revelaram um comprometimento nas funções dos órgãos-alvo, devido a porcentagem de ocorrência e aos graus de severidade das lesões. Portanto, a histopatologia em peixes pode ser usada para avaliar efeitos de impactos nos ecossistemas e ser utilizada em estratégias de reestruturação e conservação desse sistema hidrológico Maranhense.

Palavras-chave: ecotoxicologia; biomarcador; histologia; brânquias; fígado.

1 INTRODUÇÃO

O município Conceição do Lago Açu do Maranhão, possui o segundo maior lago da América Latina, o Lago Açu (IMESC, 2018), que está inserido na Área de Proteção Ambiental (APA) da Baixada Maranhense, devido sua importância ecológica e ambiental. Mesmo com instrumentos normativos que estabelecem sua conservação, o Lago Açu vem sofrendo impactos ambientais que vulnerabilizam a região e geram consequências na biota (CARDOSO et al., 2018; SOARES et al., 2021).

Desde o início dos anos sessenta, o sistema aquático está sofrendo riscos, devido ao

carregamento de produtos químicos orgânicos (xenobióticos) liberados por comunidades urbanas e industriais (VAN DER OOST, 2003), esses compostos são considerados pouco perigosos quanto à sua persistência no ambiente, porém altamente perigosos para a biodiversidade aquática, devido à tendência do acúmulo de concentrações altas de produtos químicos na água (MACHADO, 1999; SANTOS et al., 2012).

Os biomarcadores são respostas biológicas capazes de indicar a exposição e efeitos biológicos dos poluentes, descrevendo a estrutura e funcionamento dos ecossistemas por meio de alterações para classificação da qualidade e identificação de potenciais riscos ambientais tóxicos (VAN DER OOST, 2003). É um procedimento que permite a detecção precoce das perturbações, e identifica como os efeitos tóxicos diretos e indiretos afetam os organismos à nível celular e tecidual (SCHWAIGER et al., 1997).

Os principais biomarcadores utilizados para identificação de estressores ambientais são as alterações histológicas em órgãos alvo específicos de peixe, que estão envolvidos em processos metabólicos importantes, como brânquias e fígado (LINS et al., 2010). Esses órgãos são os principais locais de respiração, excreção, acúmulo e biotransformação, e estão sujeitos a mudanças estruturais e metabólicas mediante a exposição aos contaminantes (MACHADO, 1999).

Portanto, é indispensável a realização de estudos ecotoxicológicos para avaliação e monitoramento da periculosidade que essas substâncias podem ocasionar na sanidade e biologia dos organismos aquáticos (CARDOSO et al., 2018). Assim, a pesquisa objetivou investigar o grau de contaminação, por meio dos biomarcadores histopatológicos em brânquias e fígados de *Prochilodus lacustris* para avaliação da qualidade ambiental no Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi executada com autorização da Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Naturais do Maranhão (Nº 46/2019) e do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO (Nº 69518-1)), em que foram aprovadas coletas de peixes no lago Açu. Todos os procedimentos foram realizados procurando seguir os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea, <http://www.cobea.org.br>) e do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Estadual do Maranhão (nº 13/2022).

O município Conceição do Lago Açu (Figura 1) está localizado na região central do estado do Maranhão, nas coordenadas geográficas 03°40'00" e 04°59'00"S e 44°39'00" a 45°03'00"W, e abriga o Lago Açu, um grande centro pesqueiro da região. O lago é formado pela inundação do rio Grajaú, um grande efluente da bacia do Mearim, e possui aproximadamente 52 km² durante o período chuvoso e 50 km² no período de estiagem (CARDOSO et al., 2019).

As coletas foram realizadas compreendendo os dois períodos sazonais característicos do estado do Maranhão, sendo uma no mês de setembro de 2022, que corresponde ao período de estiagem e uma em junho de 2023, correspondente ao período chuvoso. A espécie utilizada foi *Prochilodus lacustris*, conhecido popularmente como “curimatã”. Foi coletado um total de 60 exemplares dessa espécie por meio da pesca artesanal com rede de emalhar, sendo 30 para cada período sazonal.

Logo após a captura, os animais foram eutanasiados com administração do anestésico Eugenol para necropsia dos órgãos alvo. Foram removidos de cada espécime o arco branquial direito e o fígado por meio de incisão abdominal e fixados *in situ* em formol a 10% por 24 horas, de forma a impedir o processo de autólise das células e tecidos (CAPUTO et al., 2010).

Após esse tempo realizou-se a clivagem das amostras biológicas dos órgãos, em que se

reduziram as dimensões, em 3 a 5 mm de espessura, para facilitar a penetração do fixador e a difusão dos reagentes que foram usados nas demais etapas do processamento histológico (CAPUTO et al., 2010). Em laboratório, os arcos branquiais foram descalcificados em ácido nítrico a 10% por 6 horas, enquanto que o fígado, depois de retirado do formaldeído, foi submetido à solução de álcool 70%.

Em seguida, o procedimento seguiu as seguintes etapas: desidratação crescente em banho de álcoois (70%, 80%, 90%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo na espessura de 5µm e os cortes foram colocados em lâminas de vidro e corados por Hematoxilina e Eosina (LUNA, 1968). A leitura das lâminas e descrição das lesões dos órgãos foram realizadas com auxílio de microscópio de luz e registrada em fotomicroscópio.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz, utilizando-se as objetivas de 4x, 10x, 40x. Posteriormente foram classificadas as alterações estruturais das brânquias e fígados, em fases progressivas de danos nos tecidos em estágio I, II e III, sendo avaliadas semiquantitativamente pelo cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), adaptado de Poleksic e Mitrovic – Tutundzic (1994). Para cada peixe foi calculado o valor de IAH através da fórmula: $IAH = 1 \times \sum I + 10 \times \sum II + 100 \times \sum III$, sendo que I, II e III correspondem respectivamente ao número de alterações de estágio I, II e III. Posteriormente dividiu-se o valor médio de IAH em 5 categorias conforme o Quadro 1:

Quadro 1. Classificação da severidade das lesões por categoria do Índice de Alteração Histológica (IAH), segundo Poleksic e Mitrovic- Tutundzic (1994).

Valores	Categoria (Efeitos)
0 – 10	Funcionamento normal do tecido
11 – 20	Alteração leve a moderada do tecido
21 – 50	Alteração moderada a severa do tecido
51 – 100	Alteração severa do tecido
>100	Alteração irreversível do tecido

Fonte: Adaptado de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

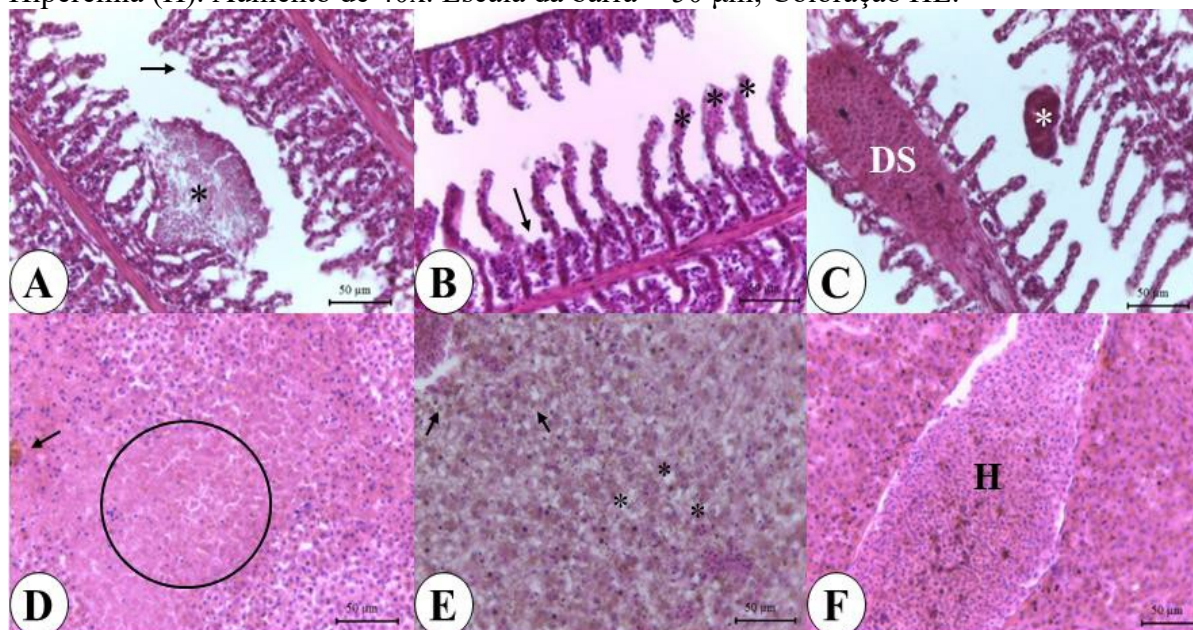
Os resultados do IAH dos peixes foram expressos através da média e desvio padrão. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e homogeneidade Levene, considerando $p > 0,05$. Para verificar se houve diferenças entre os dados IAH de brânquias e fígado de *P. lacustris* entre os períodos amostrados foi aplicada a análise de variância One-Way (ANOVA One-Way) e posteriori de Tukey ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises histológicas dos 60 peixes demonstraram alterações nas brânquias e fígados da espécie *P. lacustris*. As principais lesões branquiais foram: congestão de vasos sanguíneos, hiperplasia do epitélio lamelar, fusão incompleta de várias lamelas e fusão completa de várias lamelas (Figura 1 – A, B e C). As lesões hepáticas mais frequentes foram: deformação do contorno celular, hipertrofia nuclear, vacuolização citoplasmática e centro de melanomacrófagos (Figura 1 – D, E e F).

Figura 1. Fotomicrografia dos tecidos branquiais (A, B e C) e hepáticos (D, E e F) de *Prochilodus lacustris* coletados no Lago Açú, Área de Proteção Ambiental (APA) da Baixada Maranhense, Maranhão-Brasil. A: Necrose e degeneração celular (*) e fusão completa de várias

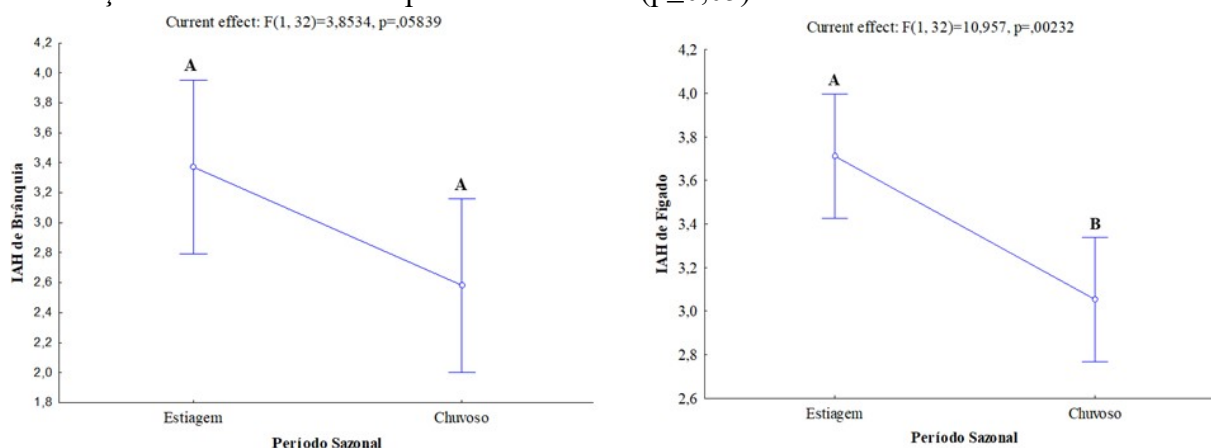
lamelas (seta); B: Congestão de vasos sanguíneos (*) e hiperplasia do epitélio lamelar (seta); C: Dilatação do seio sanguíneo (DS) e parasito (*); D: Necrose (círculo) e centro de melanomacrófagos (seta); E: Vacuolização citoplasmática (*) e estagnação biliar (setas); F: Hiperemia (H). Aumento de 40x. Escala da barra = 50 µm; Coloração HE.



As alterações branquiais e hepáticas corroboram com os resultados obtidos anteriormente por Cardoso et al. (2018) e Soares et al. (2021) nos peixes do Lago Açu, em que há a ocorrência de lesões do estágio I ao III, porém em maior frequência se destacam as de estágio I, que não comprometem as funções dos órgãos, seguidas das de estágio II, que sinalizam um alerta a impactos graduais, e de estágio III, que são irreversíveis.

As brânquias apresentaram alterações classificadas de moderadas a severas de acordo com o grau de severidade. Os valores de IAH não apresentaram diferenças estatísticas entre os períodos sazonais ($p \leq 0,05$). O fígado dos peixes apresentou diferença estatística entre os períodos sazonais, com maiores valores apontados para o período de estiagem ($p \leq 0,05$), e valores médios de IAH classificados com danificação moderada a severa (Figura 2).

Figura 2. Índices de Alteração Histológica por período sazonal em brânquias e fígados de *Prochilodus lacustris* coletados no Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. AB: Letras maiúsculas diferentes nas linhas apresentam diferenças estatísticas entre os períodos sazonais ($p \leq 0,05$).



Os dados estatísticos das brânquias se assemelham aos de Cardoso et al. (2018), em que o período chuvoso apresentou maiores valores de Índices de Alteração Histológica em brânquias de peixes, ocasionado pela ação intensa de contaminantes, devido a lixiviação de substâncias tóxicas para o meio aquático (PEREIRA et al., 2020). Entretanto, o resultado da estatística dos fígados se apresenta em discordância com os obtidos por Cardoso et al. (2018) e Soares et al. (2021) para a mesma região, em que o período chuvoso é o que expressa valores maiores de IAH.

Sendo assim, os fígados do período de estiagem apresentaram valores mais elevados, por ser um órgão que sofre efeitos acumulativos, com danos crônicos e agudos por ação dos estressores ambientais (OLIVEIRA et al., 2019), enquanto que as brânquias por estarem em contato direto com o meio externo e possuírem uma grande área de superfície, são altamente sensíveis a variação ambiental do período chuvoso (POLEKSIC E MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

4 CONCLUSÃO

As alterações branquiais e hepáticas em *Prochilodus lacustris* revelaram-se bons biomarcadores de contaminação aquática, por oferecer a possibilidade de avaliar os impactos ambientais. A análise histológica demonstrou comprometimento na função e estrutura dos órgãos, como resposta defensiva aos agentes estressores na água do lago.

Dessa forma, a análise histológica dos órgãos alvo de peixe gera uma resposta sobre a os impactos ambientais e corrobora com a política de monitoramento ambiental para restauração, proteção e conservação dos ecossistemas hídricos. Além disso, faz-se importante o conhecimento sobre gestão e uso sustentável dos ambientes aquáticos, visando aumento de pesquisas na área e ações de controle ambiental e sanitário para garantir a conservação da ictiofauna do Lago Açu (Zona Úmida de Interesse Internacional, Maranhão).

REFERÊNCIAS

- CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. **Técnicas histológicas** (Capítulo 3) in MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde. **Rio de Janeiro: EPSJV**, Vol. 2, 2010. 290p.
- CARDOSO, R. L.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; CASTRO, A. C. L. D.; FERREIRA, C. F. C.; FERREIRA, H. R. S.; SANTOS, D. M. S. Aspects of reproductive biology of curimba *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) in a tropical lake in Northeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 35, n. 2, p. 488-500, 2019.
- CARDOSO, R. L.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; DE CASTRO, A. C. L.; FERREIRA, C. F. C.; SILVA, M. H. L.; DE JESUS AZEVEDO, J. W.; SANTOS, D. M. S. Histological and genotoxic biomarkers in *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) for environmental assessment in a Protected area in the Northeast of Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 101, n. 5, p. 570-579, 2018.
- IMESC. Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos. **Boletim de Conjuntura Econômica Maranhense**. v. 6, n. 4, São Luís: IMESC, 2018.
- LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LUNA, L. G. **Manual dos métodos de coloração histológica do Instituto de Patologia das Forças Armadas**. 3ª ed. Nova York: McGraw Hill, 1968.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina**, v. 1, n. 1, p. 63-76, out. 1999.

OLIVEIRA, S. R. S.; BATISTA, W. S.; SOUSA, J. B. M.; NOLETO, K. S.; LIMA, I. M. A.; ANDRADE, T. S. O. M.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 6, p. 802-810, 2019.

PEREIRA, N. J.; DOS SANTOS, M. M.; DA SILVA MAIÃO, J. P. L.; DE PINHO CAMPOS, J. S.; DA SILVA, N. D.; DA SILVA MENDES, D. C.; SANTOS, D. M. S. Biomarcadores histológicos em brânquias de peixes na avaliação da contaminação ambiental do rio Mearim, nordeste brasileiro. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 68063-68079, 2020.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. Sblethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Oxford: Fishing News Books**, 1994. cap. 30, p. 339-352.

SANTOS, D. M. S.; CRUZ, C. F.; PEREIRA, D. P.; ALVES, L. M. C.; DE MORAES, F. R. Microbiological water quality and gill histopathology of fish from fish farming in Itapecuru-Mirim County, Maranhão State. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, p. 199-205, 2012.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, n. 6, p. 75-86, 1997.

SOARES, H. K. S. S.; OLIVEIRA, I. C. S.; SANTOS, M. M.; LIMA, I. C. M.; PEREIRA, N. J.; SOUSA, D. S.; OLIVEIRA, V. M.; SANTOS, D. M. S. Biomarcadores histopatológicos em *Prochilodus lacustris* (Steindachner 1907) para avaliação de impactos ambientais em área de proteção Maranhense. **Água e florestas: Desafios para conservação e utilização**, v. 1, n. 7, p. 100-113, 2021.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.