

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR ARSÊNIO EM PEIXE AMAZÔNICO *Colossoma macropomum* EXPOSTO AGUDAMENTE.

PALHETA, D. da C.1* ; OLIVEIRA, W.P.²; PALHETA, P.S.³; PEREIRA, S.S.⁴; YAMADA, E.S.⁵.

RESUMO

Tendo em vista a contaminação ambiental por metais pesados na Amazônia, em especial de resíduos metálicos oriundos de áreas de mineração, investigou-se a ação tóxica do As_2O_3 (Trióxido de Arsênio) sobre a espécie *Colossoma macropomum* (Tambaqui) exposta à concentração de 0,2 mg de As_2O_3/L H_2O_2 em sistema de aquário fechado durante um período de 96hs. Foram utilizados espécimes de tambaquis jovens, que foram previamente acondicionados e expostos ao metalóide em sistema de aquário fechado, tendo sido coletadas amostras de tecido retiniano e órgãos periféricos como fígado e rins para análises morfológicas. A determinação da bioacumulação por arsênio foi realizada no tecido hepático através de Espectroscopia de Absorção Atômica com Plasma Induzido (ICP). O tecido retiniano apresentou células da camada ganglionar com características de degeneração e necrose; os tecidos hepático e renal apresentaram células parenquimatosas com seus contornos irregulares, núcleos reativos e em alguns casos fragmentação da cromatina. Os níveis de arsênio total no tecido hepático dos animais tratado e controle foram de $0,175 \pm 0,019 \mu g/g$ e $0,019 \pm 0,008 \mu g/g$, respectivamente. A ação neurotóxica do trióxido de arsênio sobre o tecido retiniano mostra que a contaminação ambiental do meio aquático por este metalóide pode levar a serias conseqüências na homeostasia desta espécie uma vez que pode comprometer o sistema visual e assim, mecanismos de percepção como captura de presas e reações de luta ou fuga.

Palavras-Chave: arsênio, *Colossoma macropomum*, camada de células ganglionares, neurônios ganglionares

1. INTRODUÇÃO

Na Amazônia Brasileira, a exploração mineral tem ocasionado danos severos ao meio ambiente, como a contaminação por diversos tipos de metais pesados, destacando-se entre eles o mercúrio dos garimpos (Palheta, 1995; Lebel, 2000) e o arsênio a partir da exploração do manganês no Estado do Amapá (Casara, 2003). A implementação da empresa ICOMI - Indústria e Comércio de Minérios S.A iniciada nos anos 50, no então Território Federal do Amapá, ao longo de 40 anos ocasionou danos ambientais sérios, como a formação de imensas crateras na Serra do Navio e a descarga de resíduos contaminados com metais pesados, como o próprio manganês, ferro e arsênio no Município de Santana – AP (Casara, 2003; BRASIL, 2007). Apesar do conhecimento da gravidade da situação ambiental na região norte do Brasil, principalmente por conta da liberação gradual do arsênio como elemento contaminante do minério de manganês, pouco se conhece a respeito do impacto desta liberação e de outros metais pesados no meio amazônico. Para fins de estudos toxicológicos, os peixes são as espécies aquáticas mais estudadas; por estarem em contato direto com os xenobióticos dissolvidos ou incorporados à cadeia biológica do meio contaminado (Ahmad, 1995). Para esta investigação adotou-se a espécie *Colossoma macropomum*, localmente conhecido como Tambaqui e cuja fisiologia tem sido investigada por pesquisadores da região

1*. Laboratório de Análises de Minerais - Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA); 2. Laboratório de Neuropatologia Experimental – Universidade Federal do Pará (UFPA); 3. Laboratório de Zoologia - Museu Paraense Emílio Goeldi; 4. Laboratório de Química Ambiental (UFPa); 5. Laboratório de Neuropatologia Experimental – UFPa.

(Marcon, 1999). Apesar de sua conhecida toxicidade, o arsênio é utilizado em diferentes setores da agropecuária, na produção de ração animal, como antiparasitário, estimulante do apetite, na formulação de pesticidas e herbicidas (PUC, 2006). O arsênio causa lesões no trato gastrointestinal, edema e ruptura dos vasos sanguíneos, congestão pulmonar, endocardite, além de hepatite e nefrite, esperados em casos de exposição aguda. As lesões histopatológicas são necrose epitelial intestinal, necrose tubular renal e degeneração gordurosa hepática, sempre encontrada em mamíferos. No sistema nervoso de mamíferos, o arsênio inorgânico pode causar bloqueio no desenvolvimento dos neuritos da raiz dos gânglios dorsais em ratos (Windebank, 1986). A ausência de estudos relacionados à ação biológica do arsênio em organismos aquáticos da Amazônia nos propõe à busca da experimentação a fim de que os mecanismos de interação deste xenobiótico X organismo vivo seja elucidada visando aplicações com fins de diagnóstico ambiental.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Espécie animal – peixes jovens da espécie *Colossoma macropomum*, obtidos na estação experimental da Universidade Federal da Amazônia (UFRA) - Castanhal, foram mantidos em aquários de vidro durante 15 dias para adaptação antes do período experimental.

2.2. Experimentação – Os animais foram expostos por um período de 96 horas ao As_2O_3 (trióxido de arsênio) na concentração de 0,2 mg/L (ppm), e não foram alimentados durante os ensaios. Foram utilizados 10 indivíduos, sendo 05 espécimens expostos ao arsênio e 05 espécimens não-expostos. As condutas de experimentação obedeceram as normas do comitê de ética animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPA.

2.3. Caracterização do Modelo Biológico – os animais foram mantidos em um aquário de vidro com capacidade para 30 litros de água, sendo que este recebeu 19 litros e 980 ml de água (torneira) sendo adicionado em seguida, 0.004g de trióxido de arsênio (As_2O_3), mais 0.3g de hidróxido de sódio (NaOH) em 20ml de água (torneira); totalizando um total de 20 litros no aquário. A concentração final de trióxido de arsênio dissolvido na água foi de 0.2ppm. O aquário foi alimentado com bomba aeradora durante todo o período do experimento e o pH da água ajustado para aproximadamente 7,0. O mesmo procedimento foi adotado para os animais do grupo controle.

2.4. Coleta e análise de tecidos neurais – ao final das 96 horas, os peixes foram dessensibilizados com água fria, tendo em seguida a coluna cervical seccionada. O globo ocular foi enucleado, o segmento anterior removido e a porção posterior fixada em paraformaldeído (PFA) a 4%, por 24 horas em temperatura ambiente. Um corte radial foi realizado nas margens nasal e inferior da retina, a fim de se manter a orientação espacial. Após fixação em PFA, as retinas foram gentilmente dissecadas e desconectadas do nervo óptico e da camada de fotorreceptores, sendo em seguida imersas em solução de tampão fosfato (PBS) a 0,1 M, pH 7,2 – 7,4 até a coloração pelo método de Nissl. Todas as retinas foram coradas com violeta de cresila a 0,1%. O tecido retiniano era desidratado em álcool, clareado com xilol e montado em lâminas de vidro previamente gelatinizadas.

Análise qualitativa da camada de células ganglionares - A fim de se diferenciar as células gliais dos neurônios, foi estabelecido um critério citológico de acordo com estudos prévios em mamíferos e empregados em peixes (Fukuda, 1977; Hughes, 1981; Wakakuwa, 1985). Os neurônios são classificados pela aparência de seus

pericários que é irregular em sua superfície de membrana; apresenta numerosos grânulos de Nissl no citoplasma e um grande núcleo com nucléolo proeminente. As células gliais apresentam tamanho menor e forma de microtúbulos e mostram cromatina visivelmente fragmentada (Hughes, 1975).

Fotomicrografia- foi utilizada uma câmara digital (Nikon Coopix 900), adaptada ao microscópio Nikon Labophot 2 triocular. Uma escala de 50 µm foi usada para assegurar o tamanho de cada campo estudado.

Análise Química de Arsênio Total – a fim de se avaliar a bioacumulação hepática, amostras de fígado de cada animal foram colhidas e mantidas sob congelamento até análise química. Para a determinação do arsênio em fígado, foi pesado 0,3g de cada amostra e efetuado a digestão em sistema de microondas fechado para evitar perdas por evaporação. Foi utilizado 4mL de HNO₃ e 0,3 mL H₂O₂. Foram inseridos os padrões dos metais para a curva de calibração e a leitura foi efetuada por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP – OES).

Análise Estatística – O teste *t* de Student foi empregado para análises quantitativas pareadas, adotando-se um nível de significância de 0,05.

2.5. Coleta e análise de tecidos não-neurais - outros tecidos como fígado e rins foram retirados e mantidos em solução de Bouin por 12 horas e posteriormente incluídas em parafina e coradas por hematoxilina e eosina.

3. RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

3.1. ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS DE NEURÔNIOS DA CAMADA GANGLIONAR EM RETINAS DE PEIXES DA AMAZÔNIA – *Colossoma macropomum* (Tambaqui) EXPOSTOS A 0,2 ppm DE TRIÓXIDO DE ARSÊNICO IN VIVO DURANTE 96 HORAS.

Os achados revelaram citoplasma neuronal denso e vesiculoso, característicos de tumefação celular, núcleo com coloração mais densa e presença de grumos de material protéico, formando estruturas tipo contas de rosário em diferentes pontos da retina. As retinas do grupo controle apresentaram aspecto poligonal preservado, citoplasma abundante, contorno nítido e presença de material nuclear homogêneo.

A utilização do tecido retiniano na avaliação da exposição animal a xenobióticos tem sido aplicada a partir de estudos em mamíferos (Palheta, 2003). Os mecanismos neurais tem sido amplamente investigados quando na presença de xenobióticos (WARFVINGE & BRUUN, 199); observa-se alterações nos mecanismos de neurotransmissão de células de despolarização rápida, como a atividade das células ganglionares, o que pode modificar as respostas centrais de mecanismos de luta ou fuga, assim como a percepção ambiental da presença de presas naturais (Palheta, 2003).

Neste estudo, a exposição aguda de *Colossoma macropomum* a concentrações de 0,2 ppm de arsênico ocasionou alterações morfológicas nos neurônios da camada ganglionar. A modificação estrutural de neurônios desta camada pode comprometer mecanismo de transmissão de sinais no circuito visual e, a longo prazo, a sobrevivência da referida espécie em ambiente natural, uma vez que as células de grande calibre são as responsáveis pela condução dos

impulsos rápidos responsáveis pelas reações de captura de presas, luta ou fuga (HUGHES, 1975).

3.2. EFEITOS DO TRIÓXIDO DE ARSÊNICO EM FÍGADO E RIM DA ESPÉCIE *Colossoma macropomum* – Tambaqui, EXPOSTA AGUDAMENTE.

A avaliação histopatológica pela coloração tradicional hematoxilina-eosina, revelou o tecido hepático com focos de necrose lítica, tumefação celular e células colunares apresentando núcleos reativos. As amostras dos animais do grupo controle não apresentaram alterações morfológicas dignas de nota (FIGURA IVB). O parênquima renal apresentou as membranas celulares dos túbulos proximais e distais com seus núcleos reativos e presença de tumefação celular.

3.3. CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO TOTAL EM FÍGADO DE *Colossoma macropomum* EXPOSTO AO TRIÓXIDO DE ARSÊNIO

Os níveis observados na Tabela 1 indicam a quantidade absorvida e armazenada no fígado pelos peixes tratados após 96 horas de exposição ao Trióxido de Arsênio. Comparando as concentrações observadas no grupo tratado com aquelas do grupo controle, verifica-se diferença de até 10 vezes na bioacumulação apresentada pelo grupo tratado. O test – t de Student foi < 0,05, apresentando uma diferença estatística significativa entre os dois grupos.

TABELA I – Concentrações de Arsênio Total em *Colossoma macropomum* após 96 horas de experimento.

Concentrações de Arsênio Total ($\mu\text{g g}^{-1}$) em Fígado de *Colossoma macropomum*

Peixe Tratado	Conc. ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Peixe controle	Conc. ($\mu\text{g g}^{-1}$)
t1	0,202	c1	0,009
t2	0,185	c2	0,009
t3	0,144	c3	0,016
t4	0,179	c4	0,026
t5	0,169	c5	0,026
Média (DP)	0,175 \pm 0,019	Média (DP)	0,019 \pm 0,008

A maior parte dos dados sobre os efeitos do arsênio em peixes está baseado em testes de toxicidade aguda por 96 horas, e alguns poucos têm avaliado os efeitos sub-letais no crescimento, comportamento, fertilização e eclosão de ovos (Nichols et al, 1984). A toxicidade letal do arsênio trivalente (As_2O_3 - 96h LC_{50}) para peixe de água doce, varia na ordem de 10,8 a 91,0 mg/litro (WHO, 2001), sendo que para o salmão juvenil *Oncorhynchus tshawytscha*, esta concentração foi estimada experimentalmente em 25,1, mg/litro, variando entre 19.3–32.7 mg/litro seguindo exposição em modelo estático (Hamilton & Buhl, 1990). O mesmo autor cita concentrações letais de arsenito de sódio variando de 42.1–57.9 mg/litro para experimentos com alevinos de salmão *Oncorhynchus kisutch*. No presente estudo o objetivo não foi a determinação de concentração letal, mas sim a avaliação da toxicidade a partir de baixas concentrações quando comparadas com dados de toxicidade aguda em outras espécies aquática. Verificou-se que em baixas concentrações de 0,2 mg Trióxido de Arsênio /L, durante 96 hs, o tecido retiniano da espécie *Colossoma macropomum*, em especial os neurônios da camada ganglionar são afetados pela presença desse metalóide, o que pode ocasionar importantes alterações na homeostasia neural desta espécie, como a captura de presas, mecanismos de luta e fuga, e bioacumulação hepática do As_2O_3 .

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmad, S. (1995). Oxidative Stress from Environmental Pollutants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29(2):135-57.
2. BRASIL. Rede Brasileira da Justiça Ambiental. Mapa de conflitos causados por racismo ambiental no Brasil – levantamento inicial Junho de 2007: Amapá, 2007.
3. CASARA, M. Mineração predatória da Amazônia Brasileira – Cinco décadas de irresponsabilidade social e ambiental no Estado do Amapá. Observatório Social, Maio de 2003. Florianópolis – Santa Catarina, 2003.
4. FUKUDA, Y. A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies. *Brain Research*, 119:3327-344, 1977.
5. Hamilton SJ & Buhl KJ (1990) Safety assessment of selected inorganic elements to fry of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 20(3): 307–324.
6. HUGHES, A. A quantitative analysis of the cat retinal ganglion cell topography. *The Journal of Comparative Neurology* 163: 106 -128, 1975.
7. HUGHES, A. Population magnitudes and distribution of the major modal classes of cat retinal ganglion cell as estimated from HRP filling and a systematic survey of the soma diameter spectra for classical neurons. *The Journal of Comparative Neurology* 197 (2):303-339, 1981.
8. LEBEL, J. Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajós river, Brazilian Amazon. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 73(3):195-203, 2000.
9. Nichols, J.W.; Wedemeyer. G.A.; Mayer, F.L.; Dickhoff, W.W.; Gregory, S.V.; Yasutake, W.T.; Smith, S.D. Effects of freshwater exposure to arsenic trioxide on the parr-smolt transformation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Environ Toxicol Chem*, 3: 142-149, 1984.
10. PALHETA, D. da C., TAYLOR, A. Mercury in environmental and biological samples from a gold mining area in the Amazon region of Brazil. *The Science of the Total Environment* 168:63-69. 1995.
11. PALHETA, D. da C. Intoxicação Experimental por Metilmercúrio em Ratos Wistar – Efeitos Sobre a Retina. Tese de Doutorado apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da UFPA para a obtenção do grau de Doutor em Ciências. Abril de 2003. 174pp Belém-PA-Brasil.
12. Marcon, J.L. e Filho, D.W. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (osteichthyes, Serrasalminidae), from the Amazon. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. Jul.* 123(3):257-263, 1999.2006.
13. PUC – Rio. Projeto de Especiação. Laboratório de Espectrometria de Massas. Rio de Janeiro,
14. WAKAKUWA, K., WASHIDA, A., FUKUDA, Y. Distribution and soma size of ganglion cells in the retina of the eastern chipmunk (*Tamias sibiricus asiaticus*). *Vision Research* 25 (7): 877-885, 1985.
15. Windebank, A.J. Specific inhibition of myelination by lead in vitro; comparison with arsenic, thallium, and mercury. *Exp Neurol*, 94: 203–212, 1986.
16. WARFVINGE, K., BRUUN, A.. Mercury accumulation in the squirrel monkey eye after mercury vapour exposure. *Toxicology* 107: 189-200. 1996.
17. WHO. IPCS - Environmental Health Criteria 224 . ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDS. Geneva 2001.