



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NOS RINS DE TAMBAQUI
(*Collossoma macropomum*) SOB AÇÃO DO NITRITO

Bolsista: Violeta Bastos de Mattos Areosa, CNPq.

MANAUS

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



RELATÓRIO FINAL
PIBIC: PIB-B/0086/2012

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NOS RINS DE TAMBAQUI
(*Collossoma macropomum*) SOB AÇÃO DO NITRITO

Bolsista: Violeta Bastos de Mattos Areosa, CNPq.

Orientador: Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa

MANAUS

2013

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.

RESUMO

A utilização de tanques de piscicultura vêm aumentando no Brasil, e na região norte, o peixe mais cultivado é o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) devido à sua fácil adaptação ao cativeiro. Os rins constituem a principal rota de excreção de metabólitos aos quais os peixes tenham sido eventualmente expostos. É formado por duas regiões distintas: a excretora (contendo a cápsula de Bowman, túbulos proximais, distais e coletores), e a hematopoiética (contendo células hematopoiéticas, vasos sanguíneos e os melanomacrófagos). Animais juvenis (massa≈50g) foram separados em dois tratamentos (controle e nitrito) com cinco animais cada e mantidos em caçapas supridas com fluxo contínuo de água. Adicionou-se 0,04 mg/L de nitrito de sódio (NaNO_2) no tratamento nitrito por um período de 96 horas. Concluiu-se que o nitrito não causou mudanças nas densidades volumétricas dos componentes renais nos animais expostos ao nitrito, contudo a proporção do estado patológico foi aumentada.

Palavras-chave: Rim, teleósteos, estereologia, nitrito, tambaqui.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 06 |
| 2. OBJETIVOS | 09 |
| 2.1 Objetivo geral | 09 |
| 2.2 Objetivos específicos | 09 |
| 3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS | 09 |
| 3.1 Experimentação | 09 |
| 3.2 Protocolo experimental | 10 |
| 3.3 Coleta das amostras de tecido..... | 10 |
| 3.4 Estereologia | 11 |
| 3.4.1 Densidade de volume dos componentes renais | 11 |
| 3.4.2 Determinação do volume do rim de acordo com Cavalieri ... | 11 |
| 3.5 Análise estatística | 11 |
| 4. RESULTADOS | 12 |
| 4.1 Morfologia Renal..... | 12 |
| 4.2 Estereologia | 17 |
| 5. DISCUSSÃO | 22 |
| 6. REFERÊNCIAS | 25 |
| 7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES..... | 29 |

1. INTRODUÇÃO

Os peixes ocupam os mais diversos ambientes aquáticos (VAZZOLER, 1996; LOWE-MCCONNELL, 1999) e são de grande importância comercial, já que fazem parte da dieta em muitos países e, em vários outros, são a principal fonte de proteína animal, sais minerais e ácidos graxos, principalmente do ômega3 (SILVA FILHO et al., 2000). A demanda por esse alimento vem crescendo nas últimas décadas, mas uma combinação entre o desmatamento e a sobrepesca ameaçam os estoques naturais a longo prazo. Como tentativa de contornar esse problema, a piscicultura vem sendo bastante disseminada, principalmente pelas regiões de clima quente do Brasil.

Na criação em cativeiro, estão em contato direto com agentes estressores, substâncias cujos efeitos ameaçam ou perturbam o equilíbrio homeostático do organismo, desencadeando um conjunto de respostas fisiológicas. A habilidade de reagir à presença de um agente estressor é de extrema importância pois as respostas geradas a eles são fundamentais para a sobrevivência do animal, permitindo assim uma melhor adaptação às variações ambientais (LAPPIVAARA & OIKARI, 1999). A curta exposição a qualquer agente estressor ambiental pode resultar em alterações que, mesmo não sendo letais, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (RAND & PETROCELLI, 1985; JOBLING, 1995). Vários trabalhos vêm sendo publicados fazendo uso destes animais para avaliar o efeito do estresse causado por variações no ambiente aquático (OVERSTREET, 1988; TEH et al., 1997; GUNDERSEN et al., 2000; SCHWAIGER, 2001).

O nitrito (NO_2^-) é um dos principais agentes estressores encontrados no meio em cultivo intensivo, e dependendo de sua concentração, pode resultar em elevada mortalidade dos peixes. Os níveis de NO_2^- podem ser elevados em tanques de piscicultura devido a desequilíbrios nos processos de nitrificação e desnitrificação da amônia (LEWIS & MORRIS, 1986; JENSEN, 2003; KROUPOVA, 2005). Dentre os fatores que favorecem a acumulação de nitrito na água estão o pH, a temperatura, os níveis de O_2 dissolvido, a quantidade de bactérias nitrificantes e a contaminação por excretas nitrogenadas (RUSSO & THURSTON, 1991; AGGERGAARD & JENSEN, 2001). Desse modo, o NO_2^- torna-se tóxico aos peixes e seus efeitos sobre a fisiologia desses animais já se encontra bem documentado (JENSEN, 1995; 2003; KROUPOVA et al., 2005; SVOBODOVA et al., 2005). Além da formação de

elevados níveis de metahemoglobina, o NO_2^- se acumula nos tecidos alterando vários processos fisiológicos (MARGIOCCO et al., 1983).

Por receber grande fluxo sanguíneo, o rim pode ser considerado, tal como as brânquias, órgão alvo de agentes estressores (HINTON et al., 1992; EVANS, 1993), sendo de extrema importância nos peixes teleósteos por estarem diretamente envolvidos na resposta do organismo a essas substâncias.

O sistema excretor dos peixes, como dos outros vertebrados, regula o conteúdo de água do corpo, mantém o equilíbrio salino adequado e elimina os resíduos nitrogenados resultantes do metabolismo proteico no caso a amônia (NH_3). O rim funcional dos peixes é do tipo mesonéfrico, formado por uma série de túbulos renais. Cada túbulo é enrolado, tanto na porção proximal como na distal, e dirige-se para um ducto coletor longitudinal comum, o ducto arquinéfrico, que se comunica com o meio exterior pela cloaca. A porção proximal de cada túbulo termina na cápsula de Bowman que contém um enovelamento vascular do sistema circulatório, chamado de glomérulo. A cápsula e o glomérulo juntos formam o corpúsculo renal por onde passam a água os sais e produtos de excreção, da corrente sanguínea para fora do corpo.

Os rins constituem a principal rota de excreção de metabólitos aos quais o peixe tenha sido eventualmente exposto (HINTON et al., 1992). O rim elimina produtos químicos durante o curso de formação da urina, alguns através da filtração glomerular, outros por reabsorção ou ainda pelos processos de secreção tubular (JOBBLING, 1995; EVANS, 1993).

O rim dos peixes teleósteos localiza-se dorsalmente, acompanhando a coluna vertebral, e é dividido em duas porções: anterior ou rim cefálico e a posterior ou rim caudal. A porção anterior do rim é homóloga a adrenal de mamíferos e apresenta dois tipos especiais de células: as células interrenais e as células cromafins. A porção posterior do rim dos teleósteos, em associação com as brânquias e intestino, realiza a excreção e a manutenção da homeostase dos fluídos corporais (EVANS, 1993).

Em peixes dulcícolas a principal função do rim é a excreção de uma grande quantidade de urina diluída. Assim, a urina dos peixes de água doce é abundante e com baixa concentração de eletrólitos (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995). Por receber grande fluxo sanguíneo o rim pode ser considerado, tal como as brânquias, órgão alvo para os poluentes (HINTON et al., 1992; EVANS, 1993).

Cada estrutura do rim dos teleósteos realiza uma função específica na produção de urina, regulação osmótica e hormonal no animal. Nos teleósteos dulcícolas, os glomérulos, responsáveis pela ultrafiltração do sangue, estão mais concentrados na porção posterior do rim, onde ocorre extensa reposição de íons durante o fluxo do filtrado ao longo dos túbulos renais, produzindo fluido filtrado que dará origem à urina (JOBILING, 1995; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995; EVANS, 1993).

Pouca importância tem sido dada ao estudo da ação de substâncias nocivas aos quais os peixes já estão em contato num meio de cultura intensivo, como por exemplo o NO_2^- . A determinação de como os rins são afetados por essa substância e como ela irá afetar a fisiologia do animal é fundamental para a implantação de medidas preventivas em sistema de cultivo intensivo.

Conhecer a ação responsiva dos rins de peixe em exposição ao NO_2^- é uma das metas deste estudo. Altas concentrações de NO_2^- fazem com que o ferro ligado ao grupo Heme da hemoglobina (Hb) seja oxidado de ferroso para férrico, formando assim a metahemoglobina (MetHb), incapaz de transportar oxigênio (COSTA et al 2004). Estudos sobre os efeitos de agentes poluentes encontrados no meio demonstraram que os rins foram os mais sensíveis, apresentando glomerulonefrite, hiperemia, degeneração hidrópica e congestão glomerular (BENLI et al. 2008).

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é de longe uma das espécies mais conhecidas da bacia Amazônica, e vem sendo bastante difundida em sistemas intensivos de cultivo não apenas por ser uma das mais conhecidas da região amazônica, mas também por sua rusticidade, o que possibilita uma rápida adaptação a alimentação por ração e elevada capacidade de digerir proteína animal e vegetal.

O rim é um órgão chave em estudos toxicológicos e seu estudo têm sido voltado principalmente para alterações causadas por agentes xenofóbicos. Nesses estudos notou-se diversas mudanças patológicas na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal, além do rompimento de vasos no espaço de Bowman. Essas lesões podem vir a prejudicar a filtração glomerular e refletem condições anômalas do corpúsculo renal. Sendo assim constatou-se que, comparado com as brânquias e o fígado, as alterações renais são as mais severas, causando danos irreparáveis ao tecido,

comprovando que o órgão é o mais sensível a ação dos poluentes. Apesar disso, sua utilização como sítio bioindicador tem sido pouco aproveitada.

Sendo assim, o presente projeto se propõe em investigar os efeitos causados pela exposição ao NO_2^- sobre a morfologia dos rins do tambaqui após uma exposição aguda.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar um estudo histopatológico dos rins do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) em condições normais de cativeiro e após exposição ao NO_2^- .

2.2 Objetivos Específicos

- i) Descrever as alterações histopatológicas nos componentes renais causadas pela exposição aguda ao NO_2^- ;
- ii) Aplicar técnicas estereológicas para a quantificação dos componentes renais alterados;
- iii) Comparar os resultados entre o grupo controle e o exposto ao nitrito.

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Experimentação

Exemplares juvenis de tambaqui, oriundos da Estação de Piscicultura de Balbina (Presidente Figueiredo – AM) vinculada a Secretaria de Produção Rural (SEPROR) foram utilizados neste estudo (massa aprox. 100 g). Após a coleta, os peixes foram mantidos por, no mínimo, 4 semanas antes do início dos experimentos em caçapas supridas com fluxo contínuo de água fresca e aerada (tensão de oxigênio, $\text{pO}_2 > 130$ mmHg) no laboratório de Aquicultura, na Universidade Federal do Amazonas - UFAM. A composição química da água foi determinada durante este período. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial, porém, a mesma foi suspensa dois dias antes do início dos experimentos. Verificações diárias no estado de saúde dos animais foram realizadas (condição das

nadadeiras, brânquias e pele quanto à presença de erosões, parasitas e sintomas de infestação por bactérias) e somente animais aparentemente saudáveis foram utilizados nos experimentos.

3.2 Protocolo experimental

Os experimentos foram conduzidos em caçapas de 80 Litros com fluxo contínuo de água aerada e com a mesma composição química utilizada na aclimatação. O seguinte protocolo experimental foi adotado:

1. Tratamento 1: grupo controle (N=5), água isenta de NO_2^- .
2. Tratamento 2: grupo exposto ao NO_2^- (N=5), adição de nitrito de sódio (NaNO_2 ; MERCK) até a concentração de 0,04 mM NO_2^- . Essa concentração representa 31% da LC_{50} 96 h NO_2^- estimada para o tambaqui (0,13 mM) no estudo de COSTA et al., (2000). A concentração de NO_2^- será ajustada segundo o método colorimétrico da sulfanilamida-naftalenodiamino (STRICKLAND & PARSONS, 1972).

Em cada tratamento as condições foram mantidas por 96 horas com monitoramento constante das condições físico-químicas.

3.3 Coleta dos tecidos

Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados por imersão em um banho gelado (MITTAL & WHITEAR, 1978). Os animais foram pesados e medidos (comprimento total e relativo) antes da coleta dos tecidos e, em seguida, sacrificados através de contusão na região cefálica. Os rins foram coletados e fixados *in situ* por imersão em solução de formol aldeído tamponado (pH 7,8; osmolaridade, aproximadamente 300mOsmol). Seções de historesina foram cortadas à espessura de 3 μm por meio de um micrótomo Leica (RM 2145) e coradas com fucsina e azul de toluidina (para o estudo da organização renal geral). As lâminas foram examinadas através de um microscópio Olympus BX-41 equipado com uma câmera digital Nikon Coolpix-5400 (Japão).

3.4 Estereologia

3.4.1 Densidade de volume dos componentes renais

Um sistema teste de contagem de pontos será sobreposto sobre as seções histológicas segundo HOWARD & REED (2005). pontos serão computados ao coincidirem com: vasos, células hematopoiéticas, túbulos renais, corpúsculo renal e melanomacrófagos. O volume relativo de cada componente será determinado como:

$$V_v = \frac{\sum P_{comp\ renal}}{\sum P_{total\ rim}}$$

onde: $\sum P_{comp\ renal}$ equivale a soma dos pontos sobre determinado componente renal e $\sum P_{total\ rim}$ equivale a soma de pontos sobre o rim em sua totalidade.

3.4.2 Determinação do volume absoluto do rim de acordo com Cavalieri

A imagem dos fragmentos do rim vista através do bloco de resina foi medida (comprimento total) com a ajuda de uma lupa Leica EZ4D e o valor aferido foi dividido por seis (número de seções pretendidas). A primeira posição de corte foi determinada ao acaso e as seguintes acrescidas do correspondente valor de espessura entre cada seção.

O volume do tecido renal foi determinado usando uma lupa Leica EZ4D. Fotos foram tiradas no menor aumento (8x) e sistemas teste de contagem contendo pontos serviram como parâmetros de determinação (PERRY, 1978). O volume de referência (V_t) do rim foi calculado por contagem de pontos (HOWARD & REED, 1998) de acordo com a seguinte fórmula: $\sum p \times a / p \times t$, onde $\sum p$ é o número total de pontos sobre o tecido renal, a/p é a área representada por cada ponto e t é a distância entre as seções sequenciais (HOWARD & REED, 1998). Um coeficiente de erro de 5% e desvio de 15% serão considerados aceitáveis (GUNDERSEN & JENSEN, 1987).

3.5 Análise estatística

O coeficiente de erro (C.E) será usado para avaliar a variância do volume relativo dos componentes e foi baseado de acordo com GUNDERSEN et al. (1987), sendo calculado de

acordo com $C.E. = \frac{\sqrt{Var\ noise \sum (P) + Var\ SURS \sum (a)}}{\sum P}$, onde: $Var_{Noise}(\sum P)$, a inexatidão

do sistema teste é descrita por: $0,0724 \times (b/\sqrt{a}) \times \sqrt{n \times \sum P}$, onde (b/\sqrt{a}) é a forma do perfil médio, n é o número de seções e $\sum P$ é a soma de todos os pontos contados;

$Var SURS \sum(a)$ é a variância das somas das áreas através de uma amostragem aleatória sistemática uniforme (HOWARD & REED, 2005).

Os resultados serão apresentados como média \pm erro padrão da média, E. P. M. Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos será detectada por meio de t-teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Diferença significativa será considerada quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Morfologia Renal

O rim de peixes teleósteos é um órgão misto que compreende elementos hematopoiéticos, fagocitários, endócrinos e excretores. Nos adultos ele é do tipo mesonéfrico, contendo estruturas citológicas distintas como glomérulos e túbulos, além da presença de vasos sanguíneos (Fig. 1).

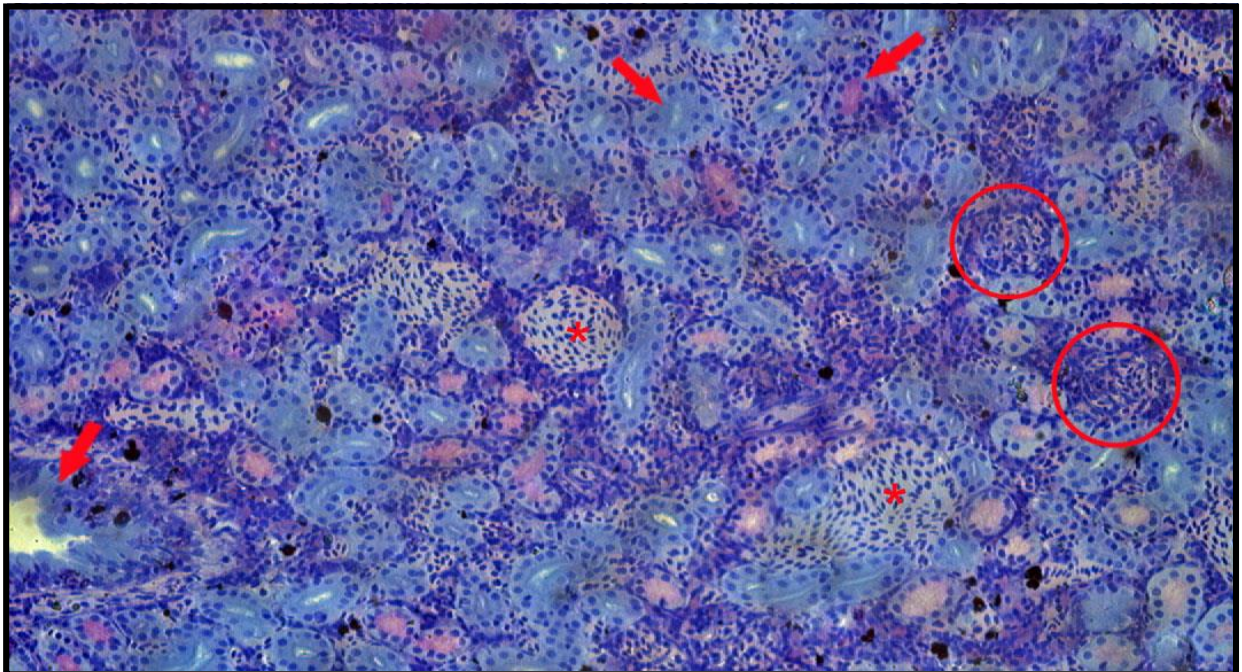


Fig. 1 Imagem de seção transversal do rim mostrando sua organização geral. Nota-se a presença de túbulos renais (setas), corpúsculos (círculos) e vasos sanguíneos (asterisco). Fucsina e Azul de toluidina em aumento de 200X.

Nos teleósteos de água doce as cápsulas de Bowman tendem a ser maiores das encontradas no peixes marinhos pelo fato de seus organismos serem hiperbáricos em relação ao ambiente, levando a uma maior entrada de água. Essa estrutura contém um enovelamento vascular do sistema circulatório, chamado de glomérulo. A cápsula e o glomérulo juntos formam o corpúsculo renal (Fig. 2) por onde passam a água os sais e produtos de excreção, da corrente sanguínea para fora do corpo.

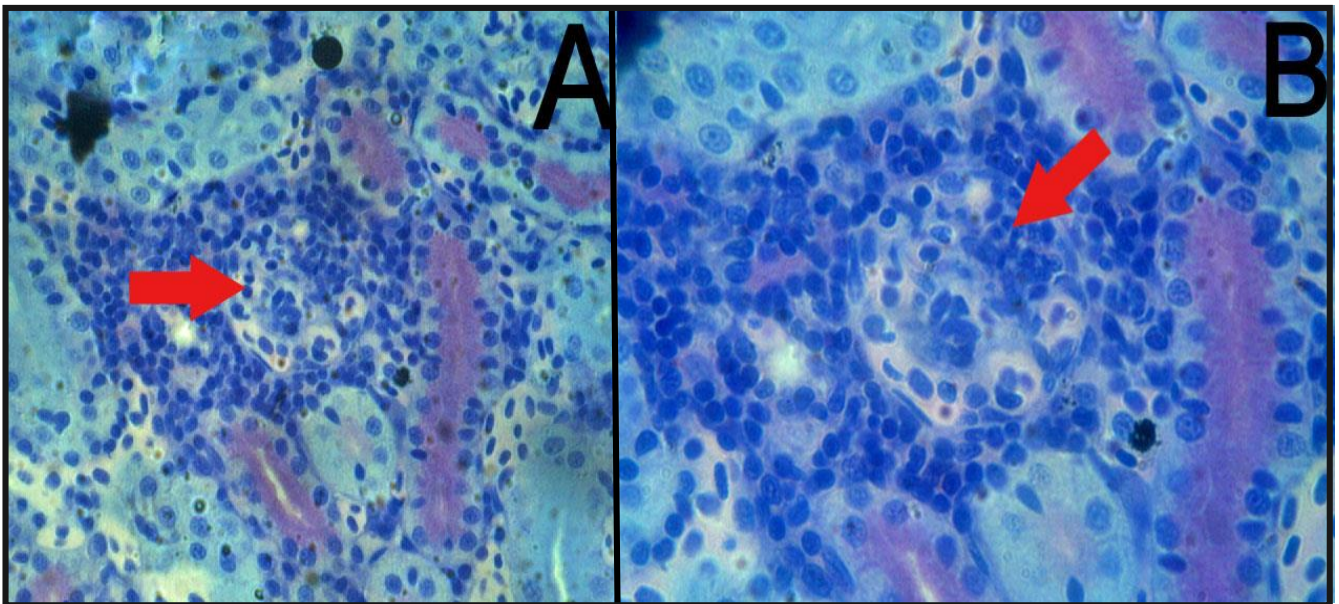


Fig. 2 Corpúsculos no rim de *C. macropomum* sob microscopia ótica. A - fucsina e azul de toluidina 400X; B - fucsina e azul de toluidina 1000X.

Os túbulos proximais (Fig. 3) contêm células epiteliais do tipo cubóide/colunar, apresentando uma borda em escova proeminente (microvilosidades), abundantes vacúolos apicais, mitocôndrias e um núcleo basal. Já os túbulos distais (Fig. 3) são caracterizados por células epiteliais do tipo colunar, com um citoplasma sem vacúolos ou borda em escova, apresentando assim um lúmen mais definido.

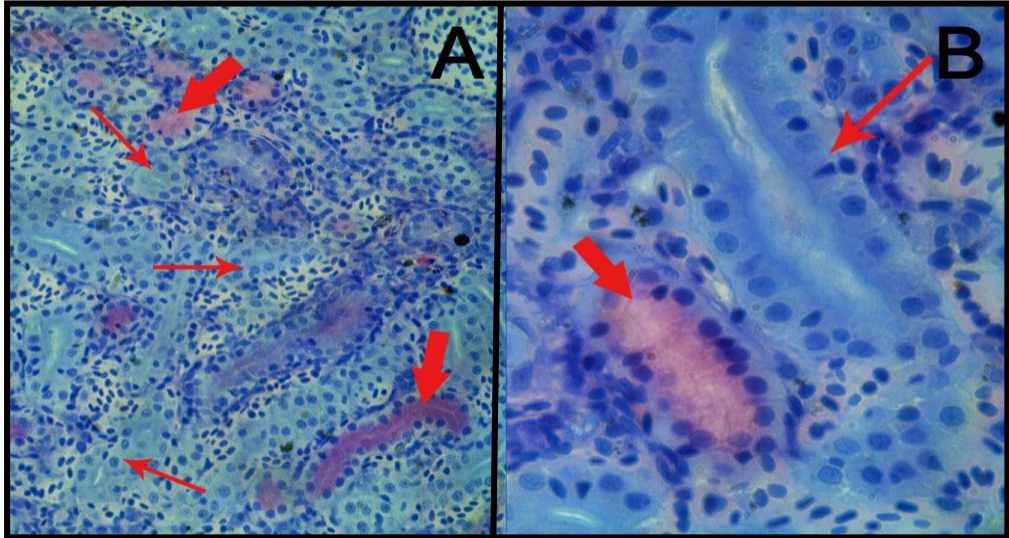


Fig. 3 Túbulos proximais (seta larga) e túbulos distais (seta fina) no rim de *C. macropomum* sob microscopia ótica. A - fucsina e azul de toluidina 400X; B - fucsina e azul de toluidina 1000X.

Os ductos coletores (Fig. 4) são histologicamente distintos dos outros túbulos por conterem células epiteliais colunares cercado um lúmen amplo, além de serem cercados por espessos feixes de tecido conjuntivo.

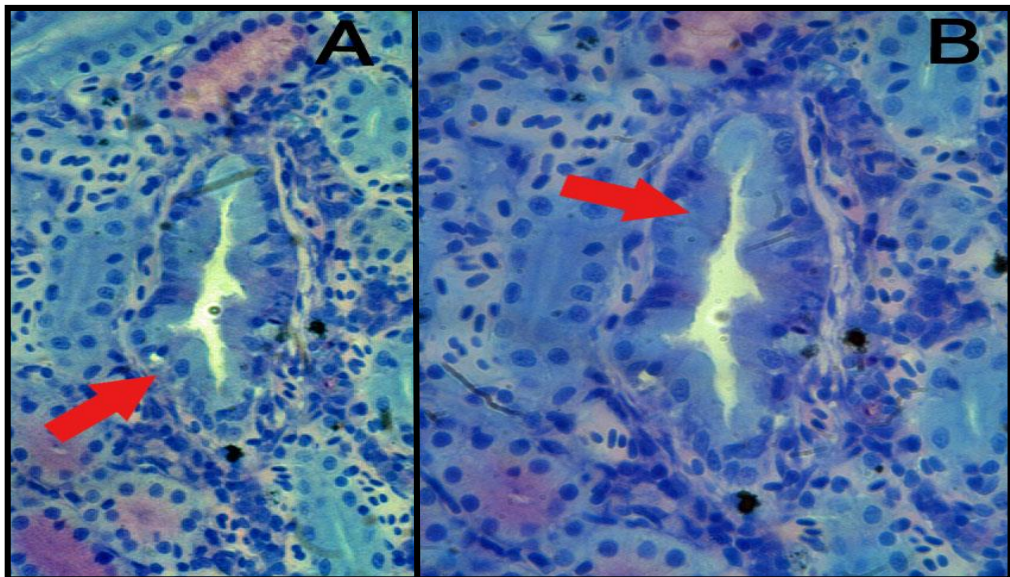


Fig. 4 Ductos coletores (seta) no rim de *C. macropomum* sob microscopia ótica. A - fucsina e azul de toluidina 400X; B - fucsina e azul de toluidina 1000X.

Apesar da sua função excretora e osmorreguladora, os túbulos são envolvidos por um tecido intersticial hematopoiético

Os vasos (Fig. 5A) encontrados nos teleósteos são similares àqueles encontrados no vertebrados superiores. Nos peixes, como em qualquer outro vertebrado não mamífero, os eritrócitos tem forma oval e sempre contêm um núcleo e o citoplasma é saturado de hemoglobina. O número de eritrócitos varia de acordo com a espécie como também de acordo com a idade do indivíduo, a estação e a condição ambiental.

Os melanomacrófagos (Fig. 5B) são unidades características do sistema imune dos teleósteos. Os centros de melanomacrófagos são estruturas de vigilância imunitária nos vertebrados inferiores, equivalentes às células assassinas (killers cells, NK) dos mamíferos. Exames histológicos revelação que esses tipos celulares são compostos de macrófagos e pigmento (principalmente melanina).

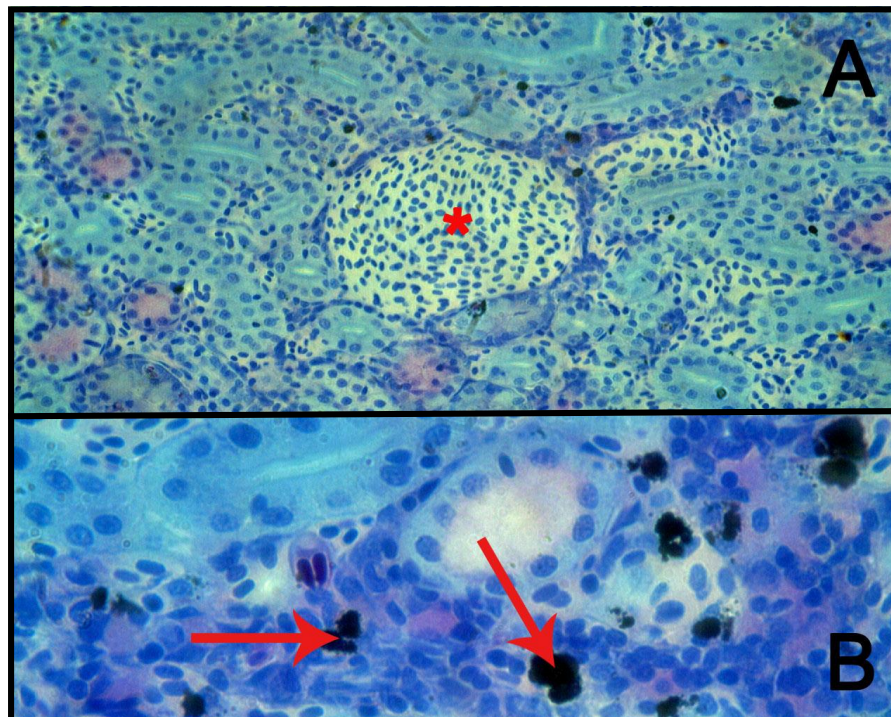


Fig. 5 Vasos sanguíneos (asterisco) e melanomacrófagos (setas) no rim de *C. macropomum* sob microscopia ótica. A - fucsina e azul de toluidina 400X; B - fucsina e azul de toluidina 1000X.

Neste trabalho serão considerados estado patológico aqueles representados na Fig. 6.

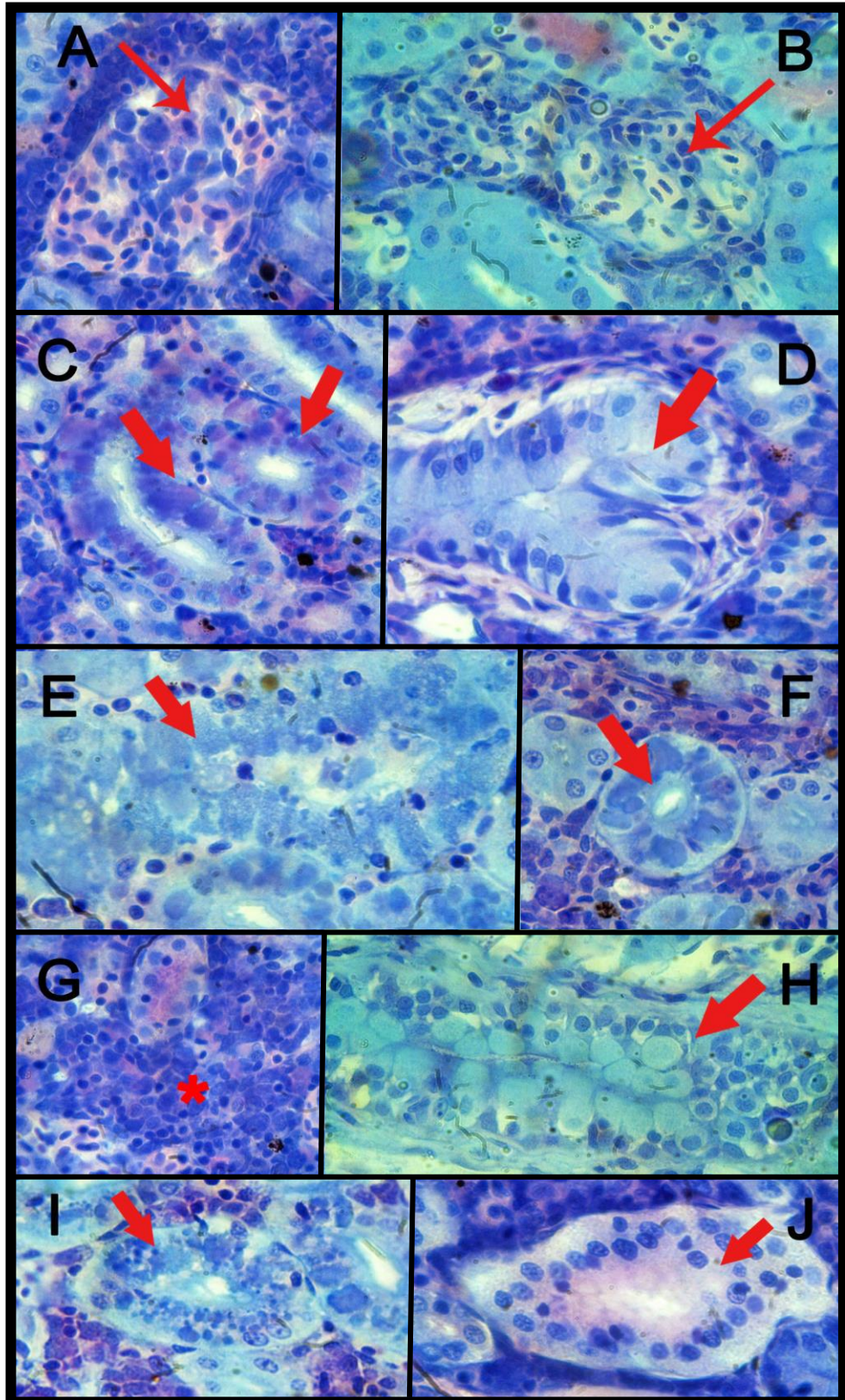


Fig. 6 Patologias encontradas no rim de *C. macropomum* sob microscopia ótica. A e B - Corpúsculos renais (seta fina); C, D, E, F, H, I e J - Túbulos e ductos renais (seta larga); G - Células cefálicas (asterisco); A-J Fucsina e azul de toluidina 1000X.

4.2 Estereologia

O volume total do rim determinado pelo princípio de Cavalieri está apresentado na Fig. 7. Embora haja uma tendência de aumento no volume renal nos animais do nitrito, não houve diferença estatística. Contudo, quando os valores são vistos de forma alométrica (volume/massa), os animais expostos ao nitrito apresentaram maior volume renal.

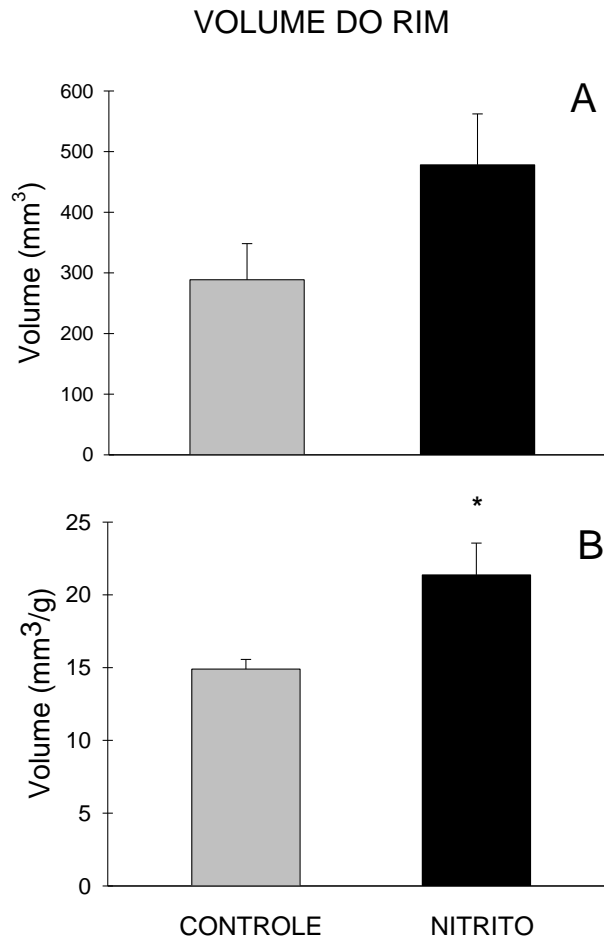


Fig. 7 Densidade de volume do rim de *C. macropomum* do grupo controle e exposto ao NO_2^- . A - Volume absoluto; B - Volume massa-específico. (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

Nesse projeto consideramos que o rim é formado por duas regiões distintas: a excretora e a hematopoiética. Não houve diferença na densidade de volume dessas regiões em ambos os tratamentos. (Fig. 8).

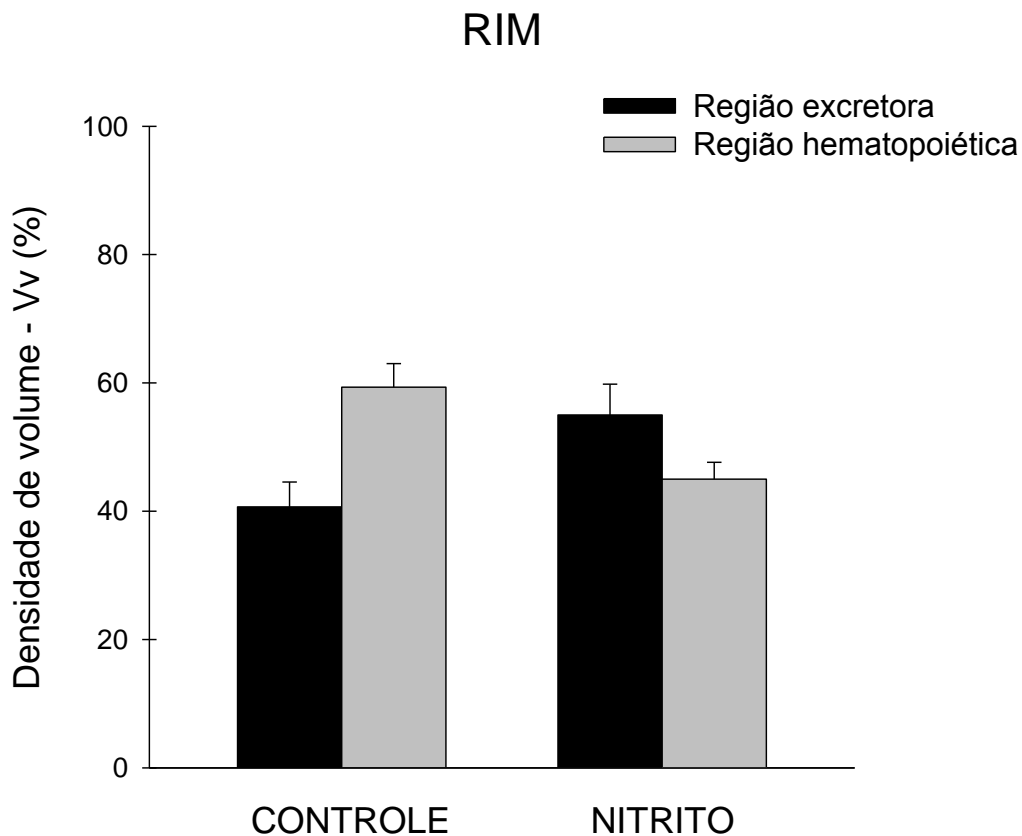


Fig. 8 Densidade de volume das regiões excretora e hematopoiética do rim de *C. macropomum* do grupo controle e exposto ao NO_2^- . (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

Considerou-se como componentes da região excretora os corpúsculos e túbulos renais, classificando-os em estado normal ou patológico de acordo com o dano celular identificado. Como visto na Fig. 9, comparamos os valores total (normal+patológico), estado normal e estado patológico dos dois componentes acima citados de acordo com o tratamento. Em relação aos corpúsculos renais (Fig. A) houve uma diminuição dos corpúsculos normais no grupo nitrito. Já nos túbulos renais (Fig. B) encontramos diferença significativa tanto no estado normal quanto no patológico.

COMPONENTES DA REGIÃO EXCRETORA

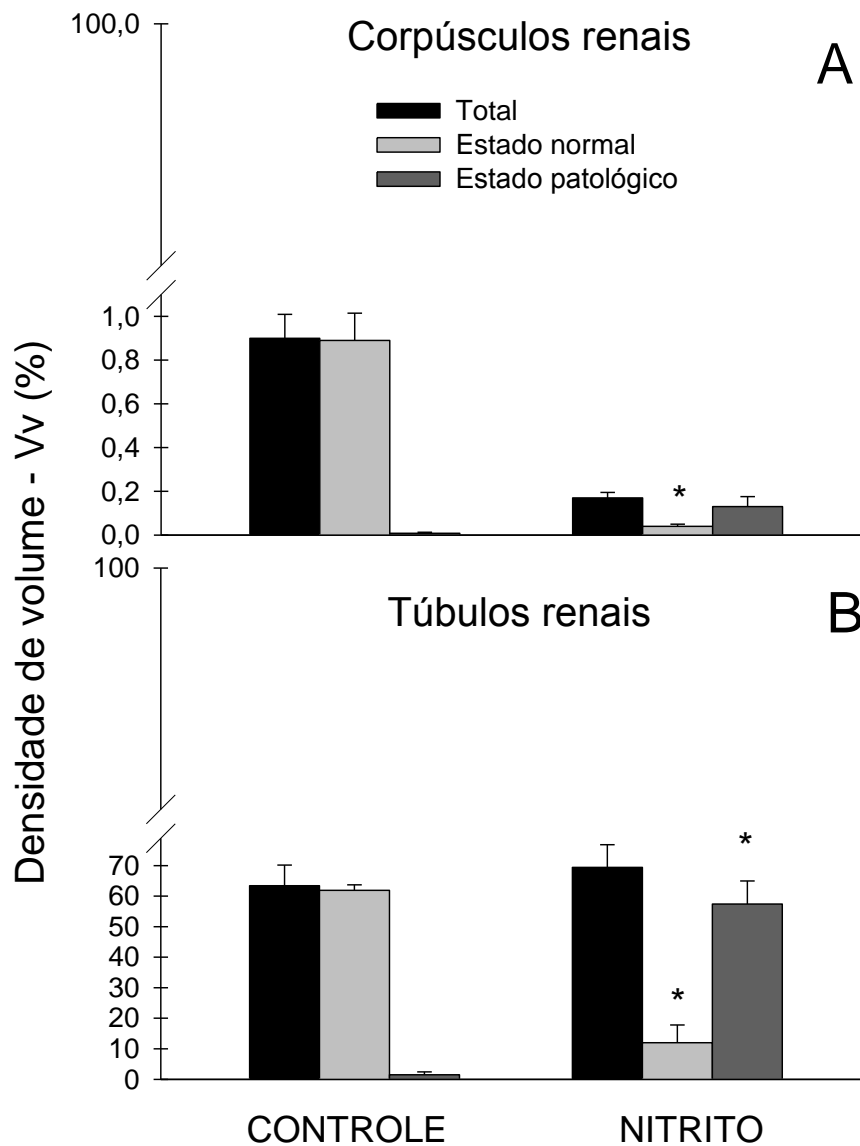


Fig. 9 Densidade de volume dos componentes da região excretora do rim de *C. macropomum* do grupo controle e exposto ao NO_2^- . A - Corpúsculos renais; B - Túbulos renais. (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

Na região hematopoiética os componentes considerados foram as células hematopoiéticas, os vasos sanguíneos e os melanomacrófagos. As células hematopoiéticas, assim como os componentes da região excretora, foram classificadas em estado normal ou patológico de acordo com o dano celular identificado, enquanto que as duas outras categorias tiveram apenas a classificação de estado normal.

Comparando-se os dois tratamentos quanto à densidade de volume das células hematopoiéticas (Fig. A), houve uma diminuição das cél. hematopoiéticas normais e um aumento das cél. hematopoiéticas patológicas (consideradas assim devido a um aumento considerável em seu volume celular) nos animais expostos ao nitrito. Quanto às categorias vasos (Fig. B) e melanomacrófagos (Fig. C) não houve diferença.

COMPONENTES DA REGIÃO HEMATOPOIÉTICA

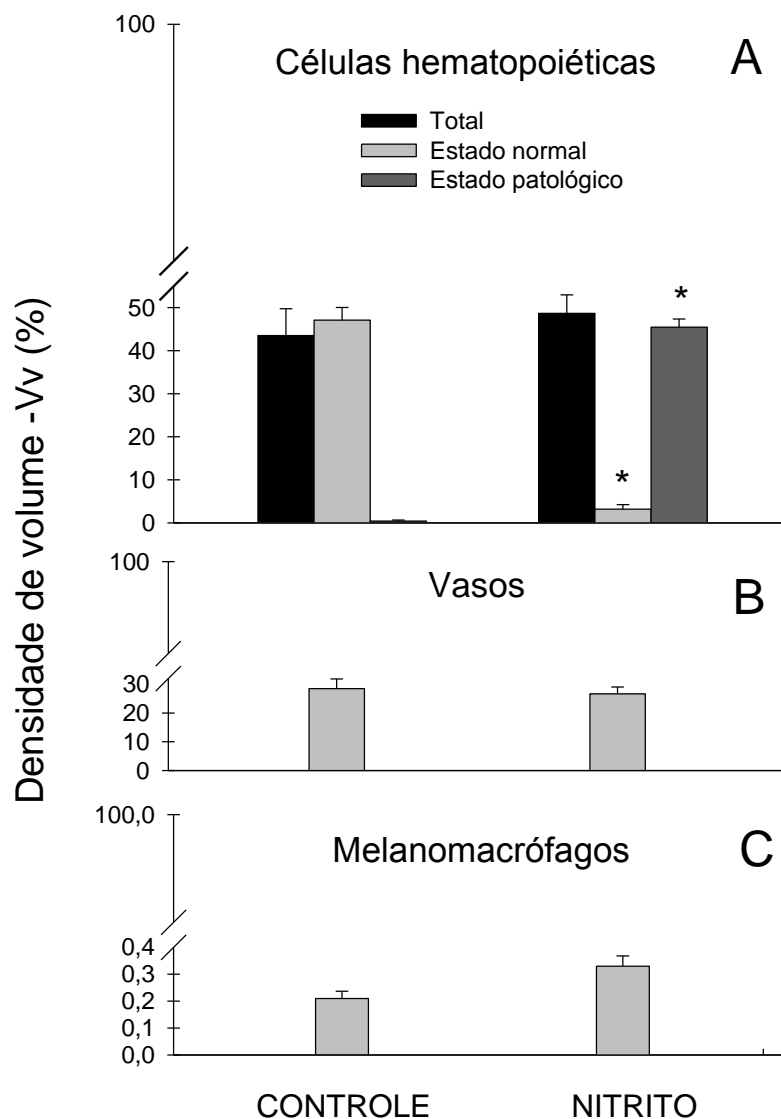


Fig. 10 Densidade de volume dos componentes da região excretora do rim de *C. macropomum* do grupo controle e exposto ao NO_2^- . A - Células hematopoiéticas; B - Vasos sanguíneos; C- Melanomacrófagos. (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

Quanto à patologia, foi comparado somente o estado patológico dos seguintes componentes: células hematopoiéticas, corpúsculos e túbulos renais. Dentre estes ocorreu um aumento das cél. hematopoiéticas e dos túbulos com danos no grupo exposto ao nitrito.

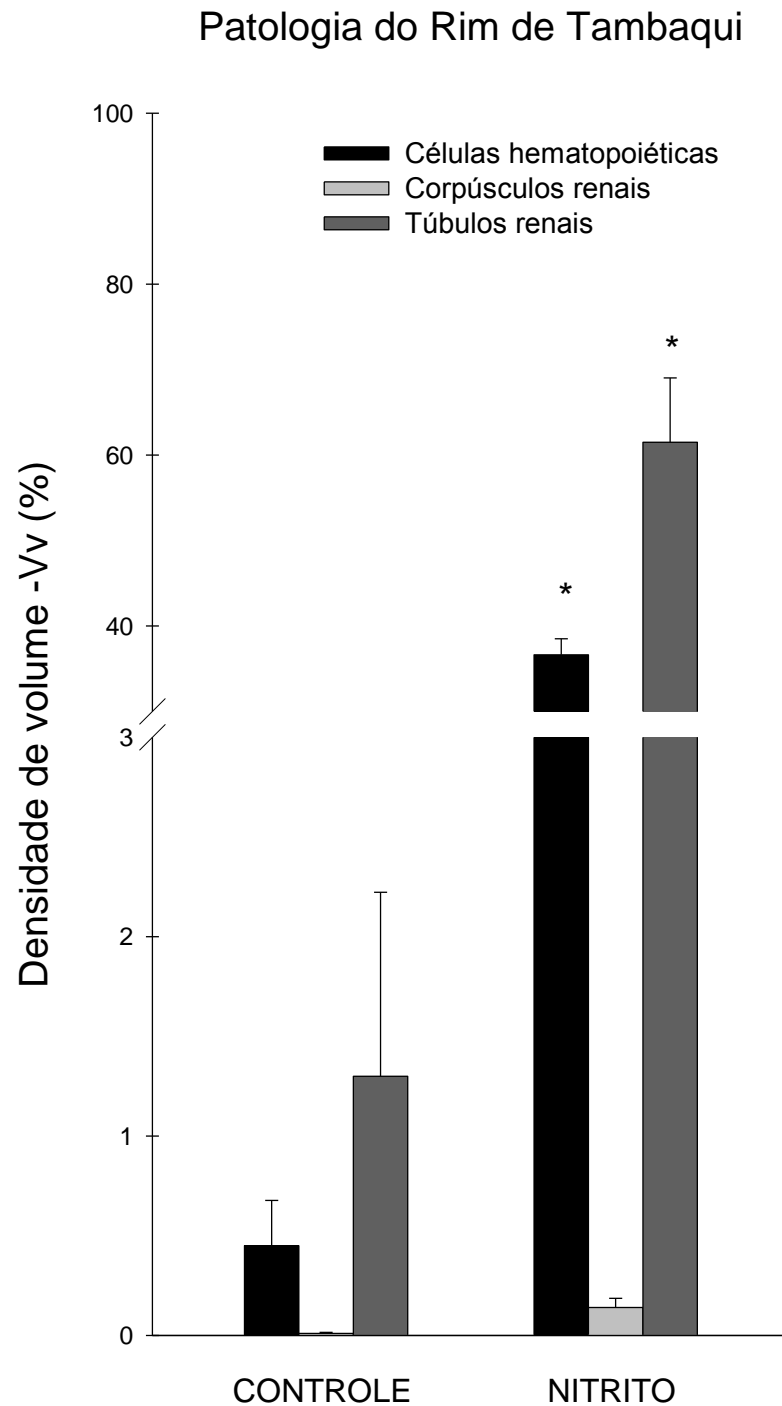


Fig. 11 Densidade de volume dos componentes patológicos do rim de *C. macropomum* do grupo controle e exposto ao NO_2^- . (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

O nitrito afeta a morfologia do sistema renal. O volume renal é afetado em função das alterações (aumento) na porcentagem de células hematopoiéticas e túbulos renais. Não há alteração no sistema de filtração renal (corpúsculos), contudo, é no componente relacionado a reabsorção (túbulos) onde as alterações são detectáveis e podem contribuir para os efeitos tóxicos e letais do nitrito.

Em sistemas aquáticos a amônia é produzida como resíduo do metabolismo de proteínas DOS animais ou pelo despejo de grandes quantidades de produtos de processos industriais. O nitrato presente em fertilizantes agrícolas também é uma potencial fonte de amônia e nitrito. A amônia é oxidada a nitrato via nitrito por meio de bactérias e quando o segundo estágio da nitrificação é inibido por qualquer motivo, os níveis de nitrito tendem a se acumular até se tornar tóxico para os peixes. Atualmente sabe-se que a entrada do nitrito dá-se por tomada ativa por meio das células cloreto presente nas brânquias dos peixes. Dentre os efeitos fisiológicos e toxicológicos do nitrito encontram-se uma rápida conversão de hemoglobina em metahemoglobina no sangue, que a longo prazo reage com certas aminas para formar um potencial composto carcinogênico. A curto prazo, a formação da metahemoglobina leva a uma reestruturação espacial do eritrócito, causando uma perda da flexibilidade de sua membrana plasmática, tornando-a mais frágil. Isso dificulta sua passagem por pequenos capilares (como os sinusoides e elipsoides presentes no fígado e no baço, respectivamente), o que causa a lise de suas membranas, levando à diminuição do número de eritrócitos circulantes e, conseqüentemente, anemia hemolítica. O rompimento dos eritrócitos leva à liberação de ferro na corrente sanguínea, metal esse que costuma reagir com "espécies reativas de oxigênio" (EROs), como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), levando ao chamado estresse oxidativo que sabe-se estar relacionado à falência renal (SILVA, 2013). Outros efeitos fisiológicos são: a vaso dilatação e a indução de hipóxia em diversos órgãos vitais podendo resultar em morte.

Os tipos de lesões histopatológicas observadas neste projeto (Fig.6.) indicam que o peixe responde morfologicamente à agentes toxicológicos presentes na água, estando assim de acordo com a literatura (SCHWAIGER et al, 1997; VEIGA et al, 2002). Dentre as lesões observadas notou-se um alargamento do espaço intercapsular com presença de atrofia

glomerular, além da hipertrofia das células dos túbulos renais que apresentaram pequenos grânulos em seu citoplasma e alguma alteração em seu núcleo. Também notou-se um extravasamento de sangue dos capilares, o que em muitos casos dificultou a visualização da delimitação dos mesmos. Outro tipo de lesão foi a presença de áreas necrosadas com núcleos picnóticos e vacúolos no citoplasma. Em alguns casos houve uma expansão glomerular, o que impossibilitou a visualização do espaço intercapsular assim como o limite citoplasmático de várias células.

Apesar de haver um aumento no volume renal dos animais do grupo nitrito (Fig. 7B), não envolve o aumento de suas regiões (excretora e hematopoiética - Fig. 8) ou de seus componentes (Fig. 9 e 10) já que não houve mudanças na densidade total dos corpúsculos, túbulos e células hematopoiéticas, nem mesmo nos componentes restantes (vasos e melanomacrófagos). Ainda nas figuras 9 e 10 constatamos que apesar de não haver um aumento nas densidades totais de seus componentes, o nitrito causou um rearranjo de suas regiões através da alteração dos estados das mesmas. Isso se deve à diminuição da população de corpúsculos normais e dos túbulos normais devido ao aumento das populações de túbulos patológicos (Fig. 9), além da diminuição da população de células hematopoiéticas normais e do aumento nas patogênicas (Fig. 10).

Se nos direcionarmos apenas aos danos celulares causados pelo nitrito, a Fig. 11 reafirma o que já foi visto nas Figuras 9 e 10, demonstrando que o nitrito aumentou a densidade de volume dos estados patológicos das células hematopoiéticas e dos túbulos renais. Como já mencionado anteriormente, o ferro liberado pela lise da membrana dos eritrócitos é extremamente danosa aos rins. A sua associação com os EROs permite se difundir pelos tecidos, danificando as estruturas presentes nas duas regiões renais como células hematopoiéticas e túbulos renais. No caso das células hematopoiéticas, o aumento da patologia pode estar relacionado à anemia hemolítica já que, em condições anêmicas, os peixes se valem de duas estratégias morfológicas para aumentar o número de eritrócitos circulante: contração esplênica (curto prazo) e hematopoeise *de novo* (longo prazo). Outra possível justificativa para esse aumento de dano seja a utilização da hematopoeise como ação direta do ferro ou o resultado da super regulação dessa região em uma tentativa do animal em repor os eritrócitos previamente perdidos ou danificados à circulação numa tentativa de contrabalancear a anemia hemolítica típica desses quadros. O aumento dos estado patológico

dos túbulos renais está relacionado com a propriedade nefron-tóxica do ferro e também pela hipóxia ocasionada pela deficiência do transporte de oxigênio para os tecidos devido à queda do número de eritrócitos no sangue.

Os dados discutidos acima estão de acordo com o conhecimento de que o tecido renal tem a capacidade de sofrer uma grande variação em sua estrutura quando exposto a situações específicas como o contato com agentes tóxicos (SCHWAIGER et al, 1997) ou mudanças sazonais (CASOTTI, 2001). E por ser um importante órgão na elaboração da resposta imunológica (ZAPATA & COOPER, 1990) mudanças morfológicas nesse órgão podem induzir alterações no sistema de defesa que lesam a homeostase do animal e, conseqüentemente, sua saúde.

Diversos estudos com peixes tem se voltado para a determinação de alterações morfológicas em diferentes órgãos-chave causadas por agentes estressores presentes no meio. Em trabalhos onde se comparou as alterações causadas por poluentes nas brânquia, no fígado e nos rim (SANTOS, 2010; SILVA, 2002), o rim foi o que apresentou a maior quantidade de alterações e as mais severas.

Sendo assim, concluí-se neste estudo que o nitrito não causa um aumento volumétrico dos componentes renais, contudo a proporção dos estados patológicos foram aumentadas. E por ser uma importante fonte de alimento humano o peixe interfere na qualidade de vida do homem, por isso torna-se necessário um estudo mais amplo de como o seu organismo pode ser afetado por substâncias nocivas presentes em seu meio ambiente afim de se determinar medidas a serem utilizadas para que se evite qualquer tipo de dano que possa ocorrer nesses indivíduos.

6. REFERÊNCIAS

AGGERGARD, S. & JENSEN, F. B. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *Journal Fish Biology*. v.59, p.13-27, 2001.

BENLI, A. K., KOKSAL, G., OZKUL, A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. Elsevier, *Chemosphere* 72, 1355–1358, 2008.

CASOTTI, GIOVANNI. Effects of season on kidney morphology in house sparrows. *Journal of Experimental Biology*, v. 204, n. 6, p. 1201-1206, 2001.

COSTA, O. T. F., FERREIRA, D. J. S., MENDONÇA, F. L. P., AND FERNANDES, M. N. Acute toxicity of nitrite to freshwater teleost tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei, Serrasalminidae). *Comp. Biochem. Physiol. Supplement* 126B, 26, 2000.

COSTA, O. T. F., FERREIRA, D. J. S., MENDONÇA, F. L. P., AND FERNANDES, M. N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture* 232, 627 – 636, 2004

EVANS, D. H. *The Physiology of Fishes*. Boca Raton: CRC Press, 1993.

GUNDERSEN, H.J.G. & JENSEN, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. ***Journal of Microscopy***. n. 147, p. 229-263, 1987.

GUNDERSEN, D. T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S. D.; MILLAR, J. G. BLAZER, V. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordane- contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 19 (9), p. 2275-2285, 2000.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers

biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 –196.

HOWARD, C.V.; REED, M.G. Unbiased stereology - Three-dimensional measurement in microscopy. Microscopy Handbook Series, 41. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1998.

HOWARD, C.V. & REED, M.G. Unbiased stereology: three-dimensional measurements in microscopy. Berlin: Springer Verlag & Bios Scientific Publishers, 2ª edição, 2005.

JENSEN, F.B. Uptake and effects of nitrite and nitrate in animals. In: Walsh P.J., Wright P. (eds.): Nitrogen Metabolism and Excretion. CRC Press, Boca Raton. 289–303, 1995.

JENSEN F.B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 135, 9–24, 2003.

JOBLING, M. Environmental biology of fishes. London: Chapman & Hall, 1995. p. 455.

KROUPOVA, H., MACHOVA, J., SVOBODOVA, Z. Nitrite influence on fish: a review. Vet. Med. – Czech, 50, (11): 461–471 Review Article, 2005.

LAPPIVAARA, J.; OIKARI, A. Altered challenge response in whitefish subchronically exposed um areas polluted by bleached kraft mill effluents. Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 43, p. 212-222, 1999.

LEWIS, W. M. AND MORRIS, D. P. Toxicity of nitrite to fish: A review. Trans. Am. Fish. Soc. 115, 183-195, 1986.

LOWE – Mc CONNELL, R. H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. (Tradutores: VAZZOLER, A. E. A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; CUNNINGHAM, P. T. M.) São Paulo: Editora USP. 1999.

MARGIOCCO, C., ARRILO, A., MENSI, P., AND SCHENONE, G. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and hematological consequences. Aquatic Toxicol. 3, 261-270, 1983.

MITTAL, A.K. AND WHITEAR, M.. A note on cold anaesthesia of poikilotherms. *J. Fish. Biol.* 13: 519–520. 1978

OVERSTREET, R. M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. *Aquatic Toxicology*, v. 11, p. 213 – 239, 1988.

PERRY, D.R.. A method of access into the crowns of emergent and canopy trees. *Biotropica* 10:155-157. 1978.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.

RUSSO R.C., THURSTON R.V. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. In: Brune D.E., Tomasso J.R. (eds.): *Aquaculture and Water Quality*. World Aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana. 58–89, 1991.

SANTOS, Debora Martins Silva. qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de itapecuru mirim, maranhão. 2010.

SCHWAIGER, Julia et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. ***Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery***, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997

SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, v.8, p. 231 – 240, 2001.

SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA, M. N. CUNHA BASTOS, V. L. F.; ALVES, M.V.; CUNHA BASTOS, J. Validação de espécies sentinelas par biomarcação com colinesterase em peixes. In: ESPINDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A. L. (Eds). *Ecotoxicologia: perspectiva para o séc. XXI*. São Carlos: RIMA, p.147 – 164. 2000.

SILVA, A. G. Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas –Área de Concentração Zoologia). Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2004.

SILVA, Ana Carolina Almeida da. Estresse oxidativo em rins de ratas reprodutoras e não reprodutoras ao longo do envelhecimento. 2013.

STRICKLAND, J. D. H. AND PARSONS, T. R. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Bd. Canada Bulletin 167, 1972.

SVOBODOVA Z., MACHOVA J., POLESZCZUK G., HUDA J., HAMACKOVA J., KROUPOVA H. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: three case studies. Acta Veterinaria Brno, 74, 129–137, 2005.

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

TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. Aquatic Toxicology, v. 37, p. 51 – 70, 1997.

VAZZOLER, A. E. A. de M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: EdUEM, 196p. 1996.

VEIGA, Marcelo Leite da et al. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 171-175, 2002.

ZAPATA, A. G. and COOPER, E. L. *The immunesystem: comparative histophysiology*. John Wiley,Chichester. 1990.

