

## Estudo de Alterações na Concentração dos Íons Plasmáticos e da Indução de Micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* Exposto ao Herbicida Atrazina

S. E. MORON,<sup>1\*</sup> V. L. P. POLEZ,<sup>2</sup> R. F. ARTONI,<sup>3</sup> J. L. C. RIBAS<sup>3</sup> & H. K. TAKAHASHI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Tocantins – UFT

<sup>2</sup>Universidade Brasília – UNB

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

<sup>4</sup>Universidade Oeste Paulista – UNOESTE

### RESUMO

A poluição dos ecossistemas aquáticos tem aumentado nos últimos anos, principalmente em razão do desenvolvimento industrial e agrícola. O agrotóxico atrazina é um importante agente poluente e pode prejudicar o desenvolvimento e reprodução de várias espécies de peixes devido a sua toxicidade. *Piaractus mesopotamicus* (pacu) é uma das espécies amplamente comercializadas e utilizadas em pisciculturas. O presente estudo analisou possíveis modificações na concentração dos íons plasmáticos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), no pH sanguíneo e na frequência de micronúcleos em eritrócitos de pacu ( $N = 10$  por grupo; Wt:  $160,0 \pm 5$  g) exposto ao herbicida atrazina ( $0,1$  mg/L) durante 96 horas em sistema semi-estático. Amostras de sangue foram coletadas, com auxílio de seringas heparinizadas, sendo posteriormente centrifugadas e/ou feitos esfregaços para posterior análise dos micronúcleos. O plasma obtido foi usado para as determinações dos íons plasmáticos. Análises citológicas mostraram diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) na frequência de micronúcleo entre o grupo controle e exposto ao herbicida atrazina. O pH sanguíneo permaneceu constante, mas a concentração plasmática dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  reduziu-se significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. A concentração testada do herbicida provavelmente provocou distúrbios no balanço iônico e equilíbrio ácido-base e também pode ser considerado como um produto tóxico e clastogênico.

*Palavras-chave:* micronúcleos, herbicida, íons plasmáticos, *Piaractus mesopotamicus*.

### ABSTRACT

#### Study of alterations in the concentration of ions in the plasma and of the induction of micronucleus in *Piaractus mesopotamicus* exposed to the herbicide atrazine

The pollution of the aquatic ecosystem has been increasing in the last years, mainly due to the industrial and agricultural development. The Atrazine pesticide is an important agent pollutant and it can harm the development and reproduction of several species of fish due to its toxicity. *Piaractus mesopotamicus* (pacu) is one of the species thoroughly commercialized and used in fish farms. The present study analyzed possible modifications in the concentration of ions in the plasma ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), in the blood pH and in the micronucleus frequency in pacu erythrocytes ( $N = 10$  for group; Wt:  $160.0 \pm 5$  g) exposed to the Atrazine herbicide ( $0.1$  mg/L) during 96 hours in semi-static system. Samples of blood were collected, with aid of syringes heparinized, being centrifuged later and/or made smears for subsequent analysis of the micronucleus. The obtained plasma was used for the determinations of ions in the plasma. Cytological analyses showed significant differences ( $p < 0.0001$ ) in the micronucleus frequency among the control group which was exposed to the atrazine herbicide. The blood pH stayed constant, but the ions concentration in the plasma  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  was, in relation to the control, significantly reduced ( $p < 0.05$ ). The tested concentration of the herbicide probably provoked disturbances in the acid-base ionic balance and it can also be considered a clastogenic and poisonous product.

*Key words:* micronucleus, herbicide, plasma ions, *Piaractus mesopotamicus*.

\*Corresponding author: Sandro Estevan Moron, e-mail: sandromoron@uol.com.br.

## INTRODUÇÃO

Desde a evolução industrial, o homem está contaminando o ambiente com produtos químicos, considerados tóxicos para a maioria dos organismos que habitam tanto ecossistemas terrestres como aquáticos. Com o desenvolvimento da tecnologia, diferentes grupos de substâncias passaram a ter efeitos sobre o equilíbrio natural dos ecossistemas aquáticos: nutrientes em excesso, aromáticos policíclicos, material radioativo, metais pesados e agrotóxicos. As atividades agrícolas também estão sendo reconhecidas como causadoras de alterações ambientais, e os agrotóxicos são importantes agentes impactantes do ambiente. No ecossistema, a presença desses poluentes pode provocar danos irreversíveis, como, por exemplo, a extinção de espécies em rios e lagos (Cairns, 1980; Van Der Werf, 1996). No caso das pisciculturas que utilizam águas contaminadas, as espécies também estão suscetíveis aos efeitos desses xenobióticos. O atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamina-s-triazina) é um herbicida triazínico seletivo amplamente utilizado no controle de ervas daninhas, gramíneas em áreas agrícolas e industriais e vegetação submersa em águas estagnadas ou pouco correntes, como em tanques de pisciculturas (Solomon *et al.*, 1996). No Brasil, esse herbicida é muito utilizado nas culturas de cana-de-açúcar e milho, sendo considerado um contaminante potencial em virtude de apresentar hidrólise lenta e baixa solubilidade em água (Eiler, 1989; Lanchote *et al.*, 2001).

Efeitos tóxicos resultam em alterações bioquímicas e fisiológicas no sangue dos peixes, podendo ser indicadoras do seu estado fisiológico (Heath, 1995; Nussey *et al.*, 1995). Nos últimos anos tem aumentado o interesse na área da genotoxicidade causada pela poluição ambiental. Os peixes se constituem em um dos modelos para monitoramento genotóxico aquático pela habilidade de metabolizar xenobióticos e, em alguns casos, apresentarem acúmulo de poluentes. O teste de micronúcleo tem sido utilizado para análise de toxicidade genética em várias espécies de peixes (De Flora *et al.*, 1993; Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Grisolia & Cordeiro, 2000), entretanto, é pouco explorado em peixes neotropicais (Ferraro *et al.*, 2003).

*Piaractus mesopotamicus* possui grande interesse comercial, sendo uma das espécies mais exploradas na piscicultura. Neste caso, considerando o aumento da contaminação por agrotóxicos, particularmente os herbicidas, no ambiente aquático, o presente trabalho se propôs a analisar a ação do herbicida atrazina no equilíbrio iônico e o seu possível potencial clastogênico em *Piaractus mesopotamicus*.

## MATERIAL E MÉTODO

### Animais

*Piaractus mesopotamicus* (Wt:  $160,0 \pm 5$  g) provenientes da estação de piscicultura da Universidade Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, foram mantidos a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  em tanques (1.000 L) com aeração e fluxo de água contínuo durante 30 dias para aclimação às condições do laboratório. O fotoperíodo foi de 12 horas luz. Alimentação foi suspensa 24 horas antes da realização dos experimentos.

### Protocolo experimental

Os espécimes foram separados em 2 grupos (controle e exposto ao herbicida atrazina 0,01 mg/L), contendo 10 exemplares em cada aquário de 170 L, durante 96 horas, em sistema semi-estático. O número de espécimes não ultrapassou o máximo de 1 g peixe  $\text{L}^{-1}$  de água, e durante o experimento os animais (controle e exposto ao herbicida) permaneceram em jejum. Os aquários foram revestidos para que não houvesse contato visual dos animais com o meio externo durante o período experimental. Após o período de exposição, os animais foram anestesiados com 0,01% de benzocaína, e amostras de sangue foram coletadas com auxílio de seringas heparinizadas. O teste do micronúcleo seguiu basicamente a metodologia descrita por Grisolia & Cordeiro (2000). O sangue obtido foi utilizado para a distensão sangüínea em lâmina. Após secas, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e coradas com Giemsa 5% por 5 minutos. Foi realizada análise em teste cego, ao microscópio de luz transmitida, com 1.000 células por animal para a contagem de micronúcleos em eritrócitos. Foram consideradas apenas hemácias nucleadas com membranas nucleares e citoplasmáticas intactas. Os micronúcleos foram considerados os corpúsculos que em relação ao núcleo apresentaram aproximadamente 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refração.

Imediatamente após a coleta de sangue, o pH sangüíneo foi mensurado em pHmetro QUIMIS. Amostras de plasma foram obtidas por centrifugação (3.000 rpm, durante 3 minutos) do sangue para análise dos íons plasmáticos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) em um aparelho Omni Modular System AVL.

### Análises estatísticas

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média. Diferença estatisticamente significativa entre os valores dos animais expostos ao herbicida em relação ao controle foi detectada por meio de análise de variância one-way ANOVA seguida pelo teste t-teste de comparações múltiplas

de Bonferroni. Diferença significativa foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alterações comportamentais foram observadas nos espécimes expostos ao herbicida, como excitabilidade e perda de equilíbrio.

Métodos citogenéticos estão entre os mais sensitivos e eficientes para detecção de efeitos genotóxicos (Belpaeme *et al.*, 1996). Em peixes, a técnica de micronúcleos é usualmente baseada nos eritrócitos, que nesses organismos são nucleados (Al-Sabi & Metcalfe, 1995). Análises citológicas mostraram diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) na frequência de micronúcleo entre o grupo controle e o exposto ao herbicida atrazina (0,01 mg/L; Tabela 1). O número de micronúcleos nas células de peixes pode ser variável, e alguns trabalhos relatam diferenças naturais no número de micronúcleos em algumas espécies (Gustavino *et al.*, 2001). Muito provavelmente essas variações sejam um reflexo direto da sensibilidade, do comportamento e do nicho de cada espécie. Embora alguns autores sugiram variações no modelo, o teste de micronúcleos em peixes pode representar uma alternativa para detecção da genotoxicidade (Hose *et al.*, 1987; Ayllon & Garcia-Vazquez, 2000).

A exposição ao herbicida induziu ao distúrbio iônico em *P. mesopotamicus*, mas não provocou alteração no pH sanguíneo (média = 7,7) nas condições experimentadas. A concentração plasmática dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  reduziu-se significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (Tabela 2). Muitos agentes

estressores podem causar distúrbios hidromineral e ácido-base (Barton *et al.*, 1991).

Em peixes de água doce, o aumento na perfusão das lamelas secundárias das brânquias favorece a tomada de oxigênio e é acompanhado por aumento na permeabilidade das membranas, favorecendo o ganho de água a partir do ambiente e a perda de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  para o ambiente (McDonald & Milligan, 1997). Vários estudos relacionam a redução dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  plasmático nos peixes à redução da atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  e a modificações bioquímicas relacionadas com potenciais transepiteliais (Laurent & Hebibi, 1989; Bury *et al.*, 1998; Pinheiro, 2004). Alterações no epitélio branquial podem induzir a um aumento no efluxo passivo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  do meio extracelular para o meio aquático devido ao aumento da permeabilidade das membranas (Lauren & McDonald, 1985). As células-cloreto, localizadas no epitélio branquial, estão envolvidas na absorção ativa de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em peixes de água doce. A hipotrofia dessas células e a diminuição de sua superfície apical podem prejudicar a manutenção do equilíbrio iônico (Perry *et al.*, 1992).

Em conclusão, as alterações nas frequências dos micronúcleos mostraram que esse herbicida apresenta características clastogênicas, podendo induzir a eventos mutagênicos nessa espécie. Distúrbio na regulação iônica pode estar relacionado com o efeito direto do atrazina no tecido branquial e provavelmente com a permeabilidade das membranas celulares.

*Agradecimentos* — Os autores agradecem a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – UNOESTE, pelo suporte financeiro.

**Tabela 1** — Comparação entre a contagem de micronúcleos em *P. mesopotamicus*.

	Total	Média	S.E.M.
<b>Controle</b>	10	1,1	0,27
<b>Herbicida (0,01 mg/L)</b>	10	11,7*	0,53

S.E.M. =  $\pm$  erro-padrão da média. \* = diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 2** — Concentração de íons plasmáticos em *P. mesopotamicus*.

Íons	Controle	Exposição herbicida
$\text{Na}^+$	150,6 $\pm$ 3,13	143,2 $\pm$ 2,16*
$\text{Cl}^-$	134,5 $\pm$ 0,87	123,8 $\pm$ 1,32*
$\text{K}^+$	4,2 $\pm$ 0,13	4,1 $\pm$ 0,17
$\text{Ca}^{2+}$	1,2 $\pm$ 0,13	1,0 $\pm$ 0,01

Média  $\pm$  erro-padrão da média. \* = diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SABTI, K. & METACALFE, C. D., 1995, Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mut. Res.*, 323: 121-135.
- AYLLON, F. & GARCIA-VAZQUEZ, E., 2000, Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.*, 467: 177-186.
- BARTON, B. A. & IWAMA, G. K., 1991, Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.
- BELPAEME, K., DELBEKE, K., ZHU, L. & KIRSCH-VOLDERS, M., 1996, Cytogenetic studies of PCB 77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 11: 485-492.
- BURY, N. R., LI, J., LOCK, R. A. C. & WENDELAAR BONGA, S. E., 1998, Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. *Aquat. Toxicol.*, 40: 193-202.
- CAIRNS, Jr. J., 1980, Estimating hazard. *Bioscience*, 30(2): 101-107.
- De FLORA, S., VIGARIO, L., D'AGOSTINI, F., CAMOIRANO, A., BAGNASCO, M., BENNECELLI, C., MELODIA, F. & ARILLO, A., 1993, Multiple biomarkers in fish exposed in situ polluted river water. *Mutat. Res.*, 319: 167-177.
- EILER, R., 1989, Atrazina hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *Contam. Hazard Review*, 18: 1-55.
- FERRARO, M. V. M., FENOCCHIO, A. S., MANTOVANI, M. S., RIBEIRO, C. O. & CESTARI, M. M., 2004, Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay, and the piscine micronucleus and chromosome aberrations tests. *Genetics and Mol. Biol.*, 27: 103-107.
- GRISOLIA, C. K. & CORDEIRO, C. M. T., 2000, Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet. Mol. Biol.*, 23(1): 235-239.
- GUSTAVINO, B., SCORNAJENGI, K. A., MINISSI, S. & CICCOTTI, E., 2001, Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-ray and colchicines. *Mutat. Res.*, 494: 151-159.
- HEATH, A. G., 1995, *Water pollution and fish physiology*. London CRC Press, New York, 359 p.
- HOSE, J. E., CROSS, J. N., SMITH, S. G. & DIEHL, D., 1987, Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated of southern California. *Mar. Environ Res.*, 22: 167-176.
- LANCHOTE, V. L., SPADOTTO, C. A. & GOMES, M. A. F., 2001, Ocorrência do herbicida tebuthiuron na água subterrânea da microbacia do córrego Espreado, Ribeirão Preto, SP. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. Meio Ambiente*, 11: 66-76.
- LAUREN, D. J. & McDONALD, D. G., 1985, Effects of copper on branquial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Comp. Physiol.*, 13: 635-644.
- LAURENT, P. & HEBIBI, N., 1989, Gill morphometry and fish osmoregulation. *Can. J. Zool.*, 67: 3055-3063.
- McDONALD, D. G. & MILLIGAN, L., 1997, Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter & C. B. Scheck (eds.), *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 119-144.
- PERRY, S. F., GOSS, G. G. & LAURENT, P., 1992, The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. *Can. J. Zool.*, 70: 1775-1786.
- PINHEIRO, G. H. D., 2004, *Respostas fisiológicas ao estresse em Prochilodus scrofa durante a exposição ao cobre e subsequente recuperação em água sem cobre*. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- NUSSEY, G., VAN VUREN, J. H. J. & DU PREEZ, H. H., 1995, Effect of copper on haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 111(C): 369-380.
- SOLOMON, K. R., BAKER, D. B., RICHARDS, R. P., DIXON, K. R., KLAINE, S. J., LA POINT, T. W., KENDALL, J., WEISSKOPF, C. P., GIDDINGS, J. M., GIESY, J. P., MAY, L. W. & WILLIAMS, W. M., 1996, Ecological risk assesment to atrazine in North American surface water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 31-76.
- VAN der WERF, M. G., 1996, Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agricul. Ecosy. Environ.*, 60: 81-96.