



## ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) EXPOSTO AO DIFLUBENZURON

Mayara Schueroff Siqueira<sup>1</sup>, André Luiz do Nascimento Silva<sup>2</sup>, Alexandre Welzel da Silveira<sup>3</sup>, Bruna Karla Assad Bellinate<sup>3</sup>, Karine Nathiele Nogueira Farias<sup>3</sup>, Sandriely Fernanda Marcondes<sup>1</sup>, Taynara Ribeiro Farias Leão<sup>1</sup>, Carlos Eurico dos Santos Fernandes<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mestranda em Biologia Animal do Instituto de Biociências – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: mayara\_schueroff@hotmail.com, sandy.marcondes@outlook.com, trfleao@gmail.com.

<sup>2</sup> Doutorando/Mestrando(a) em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: andre.nascimento31@gmail.com, ale\_welzel@hotmail.com, bruna\_karla@hotmail.com, kanathiele@gmail.com.

<sup>4</sup> Professor do Instituto de Biociências – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: carlos.fernandes@ufms.br

**Resumo:** O presente estudo avaliou alterações histológicas no fígado de *Piaractus mesopotamicus* expostos ao pesticida Diflubenzuron (DFB), na concentração de 70 mg L<sup>-1</sup> por meio de banho de imersão, em diferentes períodos. Os *P. mesopotamicus* foram sujeitos a três períodos de exposição: 30, 60 e 120 minutos, com objetivo de verificar o efeito tóxico do produto em cada tratamento. Para avaliação dos achados histológicos foram identificadas as alterações patológicas presentes, classificadas conforme a gravidade e a intensidade das lesões. O estudo revelou alterações no tecido hepático dos animais expostos ao DFB, após os ensaios os peixes apresentaram alterações regressivas, circulatório e inflamatório, como vacuolização dos hepatócitos, degeneração hidrópica difusa, presença de infiltrado inflamatório, congestão e núcleos picnóticos em algumas amostras. Os resultados indicam que o xenobiótico é pouco tóxico para a espécie, porém as alterações subletais no tecido hepático podem afetar o desempenho dos peixes durante o período de exposição aguda ao diflubenzuron.

**Palavras-Chave:** efeitos tóxicos, toxicologia, xenobióticos.

## HISTOLOGICAL ANALYSIS OF LIVER OF PACU (*Piaractus mesopotamicus*) EXPOSED TO THE DIFLUBENZURON

**Abstract:** The present study evaluated histological alterations in the liver of *Piaractus mesopotamicus* exposed to the pesticide Diflubenzuron (DFB), at the concentration of 70 mg L<sup>-1</sup> through immersion bath, in different periods. The *P. mesopotamicus* were subjected to three exposure periods: 30, 60 and 120 minutes, aiming to check the toxic effect of the product in each treatment. For assessing the histological findings, the pathological changes present, classified according to the severity and intensity of the lesions were identified. The study revealed changes in the liver tissue of the animals exposed to the DFB, after the tests the fish showed regressive, circulatory and inflammatory changes, such as vacuolation of hepatocytes, diffuse hydropic degeneration, presence of inflammatory infiltrator, congestion and pyknotic nuclei in some samples. The results indicate that the xenobiotic is somewhat toxic to the species, but the sublethal alterations in the liver tissue may affect the performance of the fish during the acute exposure period to the Diflubenzuron.

**Keywords:** toxic effects, toxicology, xenobiotics.

### Introdução

No Brasil não existem regulamentações específicas para uso de inseticidas no tratamento de peixes cultivados, segundo Guimarães et al. (2007) o uso de produtos químicos representa uma alternativa para reduzir os prejuízos econômicos associados a epidemias frequentes nas pisciculturas continentais. Entretanto, as complexidades dos sistemas intensivos dificultam a avaliação dos efeitos causados pelo uso de pesticidas agrícolas, e quando usadas em tratamento de doenças de peixes são um risco para o homem e ao meio ambiente (Lopes et al., 2006).

O diflubenzuron (DFB) pertencente ao grupo químico benzoiluréia, sobre a fórmula de 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea, consiste em um praguicida derivado da ureia que atua como inibidor de enzimas responsáveis pela ecdise, impedindo a síntese de quitina do exoesqueleto dos artrópodes (Mulla&Darwazeth, 1979). Mesmo sendo um pesticida agrícola, o diflubenzuron tem sido



utilizado no controle de ectoparasitas nas pisciculturas continentais em diversas regiões do país (Mabília et al., 2008; Luvizotto-Santos et al., 2009).

O fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação de substâncias que são absorvidas pelos peixes, o tecido hepático tem um importante papel na fisiologia, controlando diversas funções vitais de organismo aquáticos. Durante detoxificação, o tecido hepático pode apresentar alterações morfológicas celulares, desde vacuolização à necrose dependente da concentração e o tempo de exposição ao agente tóxico (Bombonato et al., 2007).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos do tratamento químico utilizando diflubenzuron sobre o tecido hepático em *P. mesopotamicus* na concentração de 70 mg L<sup>-1</sup> em diferentes tempos de exposição, por meio de banhos de imersão.

### Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia Experimental (Lapex), no Instituto de Biociências (INBIO), na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Foram utilizados 60 pacus *Piaractus mesopotamicus*, provenientes da mesma desova, com comprimento total médio de 12,38±1,40 cm e peso médio de 34,57±8,74 g.

O experimento foi dividido em três ensaios distintos, nos quais os peixes foram expostos ao diflubenzuron na concentração de 70 mg L<sup>-1</sup>, por meio de banhos de imersão em intervalos de 24 horas. Em cada ensaio foram utilizados 20 peixes, sendo 10 expostos ao DFB e 10 não expostos ao inseticida. No tratamento I (TI) foram realizados três banhos de imersão com duração de 30 minutos. No segundo tratamento (TII) foram realizados seis banhos de imersão com duração de 60 minutos. E no último tratamento (TIII) foram realizados seis banhos com duração de 120 minutos. Foram aplicados intervalo de 24 horas entre os banhos durante os tratamentos e após o último banho. Posteriormente, os peixes foram eutanasiados por meio de aprofundamento do plano anestésico em solução eugenol na concentração de 450 mg L<sup>-1</sup>, para a retirada e análise histológica do fígado. Através dos dados biométricos foram determinados os índices hepatossomáticos (IHS% = peso do fígado (g)/ peso corporal (g) x 100; e os índices esplenossomático (IES%) = peso do baço (g)/ peso corporal (g) x 100, para cada peixe. Os tecidos foram fixados em formol tamponado 10% e transferidos posteriormente para um recipiente contendo álcool a 70%, até as confecções dos blocos de parafina e elaboração de lâminas para as análises.

Os fragmentos do fígado foram emblocados em parafina, cortados a 3 µm e corados com solução hematoxilina e eosina (H&E), seguindo os processos histológicos de rotina. Os cortes foram analisados em microscópio óptico, e as respostas histológicas foram avaliados de acordo com os protocolos proposto por Bernet et al. (1999). As alterações presentes foram avaliadas conforme o fator de importância das lesões e a possibilidade de recuperação do órgão afetado, como: 1 - Importância patológica mínima, as lesões são reversíveis após o término da exposição; 2 - Importância patológica moderada, as lesões são reversíveis na maioria dos casos após a neutralização do agente estressor; 3 - Importância patológica elevada, as lesões são irreversíveis com perda parcial ou total da função hepática. O cálculo dos índices de cada órgão (I<sub>org</sub>) foi proposto através da soma do número de lesões, multiplicados pelo coeficiente do respectivo fator de importância, utilizando a fórmula:  $I_{org} = \sum(\alpha \times \omega)$ , onde  $\alpha$  representa a frequência das lesões, e  $\omega$  são valores em escore dos fatores de importância das lesões distribuídas nas lâminas histológicas. Os valores dos índices de cada órgão foram usados para calcular a média para cada grupo, controle e tratados. Os resultados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney U, para comparação de pares de médias, considerando-se o nível de 5% de significância (P<0,05). Os dados foram expressos em médias e desvio padrão utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

### Resultados e Discussão

A análise histológica revelou alterações vacuolares no fígado dos peixes em todos os tratamentos, porém, essas foram mais evidentes e difusamente distribuídas nos peixes do tratamento II. Estas alterações caracterizaram-se por vacúolos citoplasmáticos de tamanho variável com ou sem deslocamento nuclear. Em algumas amostras foi possível evidenciar núcleos picnóticos, com deslocamento periférico. As alterações vacuolares foram as mais expressivas encontradas em todos os tratamentos, estas variaram desde uma simples tumefação até a esteatose. Ambos processos, porém, foram difusamente distribuídos nos peixes expostos por 60 min. Nestes, também foi observado pequenos nichos de hepatócitos necróticos caracterizados por intensa eosinofilia citoplasmática, cariólise nuclear com desarranjo cordonal. Estas



lesões constituem-se achados importantes, especialmente aquelas classificadas com fator de importância III, sugerem que o diflubenzuron interfira no metabolismo hepático de forma irreversível. Por outro lado, as alterações associadas à tumefação e o acúmulo de gordura sugerem estágios intermediários expressos por variações no equilíbrio das funções reguladoras celulares, uma resposta tipicamente observada na intoxicação por diversos grupamentos químicos (Schwaiger et al., 1997; Wolf & Wolfe, 2005). A quantificação dessas alterações resultou em valores mais elevados ( $P < 0,05$ ) de  $I_{org}$  nos peixes, independentemente do tempo de exposição quando comparados com grupo controle. Não houve diferença significativa nos índices esplenossomático e hepatossomático entre o grupo controle os tratamentos. Possivelmente baixa ocorrência de formação de gotículas de gorduras no tecido hepático também contribuiu para manutenção do peso do fígado nos animais tratados (Tavares-Dias et al., 2000).

De forma geral, nossos achados são consistentes com os previamente reportados por Maduenho & Martinez (2008) e Priya et al., (2016) suportando a hipótese de que a exposição ao diflubenzuron pode induzir alterações na morfologia e possivelmente na função hepática. Cabe ressaltar que a aplicação desse produto nas pisciculturas difere do ambiente experimental onde os peixes apresentam condições ambientais apropriadas e livres de parasitas. A presença de parasitas e amplas variações na qualidade da água podem potencializar os efeitos de um agente químico aumentando as chances de perdas na produção (Paixão et al., 2013).

### Conclusões

O diflubenzuron na concentração de  $70 \text{ mg L}^{-1}$ , em banhos de imersão causam alterações na morfologia hepática do pacu. O tratamento convencional representado neste trabalho foi considerado de baixa toxicidade para o *P. mesopotamicus*. Não foram registradas mortalidades nos peixes expostos ao diflubenzuron, e as alterações histológicas em sua maioria são reversíveis após o término da exposição. No entanto, podem afetar o desempenho e a eficiência dos peixes tratados nos sistemas intensivos empregados em pisciculturas comerciais.

### Literatura Citada

- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.
- BOMBONATO, M. T. S.; ROCHEL, S. S.; VICENTINI, C. A.; VICENTINI, I. B. F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n.1, p. 81-85, 2007.
- GUIMARÃES, A. T. B.; ASSIS, H. C. S.; BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.68, p.57-62, 2007.
- LOPES, R. B.; PARAIBA, L. C.; TORNISIELO, V. L. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere**, p. 56-62, 2006.
- LUVIZOTTO-SANTOS, R.; ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; VIEIRA, E. M. O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 343-358, 2009.
- MABILIA, R. G.; SOUZA, S. M. G.; OBERST, E. R. Efeito do banho de imersão de diflubenzuron no sêmen do jundiá *Rhamdia quelen* parasitado por *Lernaeacyprinae*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, p. 661-666, 2008.
- MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 148, p. 265-272, 2008.
- MULLA, M. S.; DARWAZEH, H. A. The IGR Dimilin® and its formulations against mosquitoes. **Journal Economic Entomology**, v. 69, p.309-312, 1976.
- PRIYA, R.; UMA, T.; SARAVANAN, N.; NARENDIRAN, N. J. Efficacy of detergent on hepatocyte morphological changes in fish, *Tilapia Mossambica*. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.4, n. 5, p. 655-658, 2016.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery** 6, 1997.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Relação hepatossomática e esplenossomática em peixes teleosteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 273-281, 2000.



WOLF, J. C.; WOLFE, M. J. A brief Overview of Non-neoplastic hepatic Toxicity in Fish. **Toxicologic Pathology**, vol. 33, p. 75-85. 2005.