Efeitos combinados da exposição à microplástico (polietileno) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs): Alterações histológicas na espécie neotropical *Astyanax lacustris*

Larissa Tais Traldi Wintruff [1], Juan Martins de Campos e Silva[1], Giorgi Dal Pont [2], Luciana R. de Souza-Bastos[3]; Gisela G. Castilho-Westphal[2], Helen Sadauskas-Henrique[1].

[1]Universidade Santa Cecilia (UNISANTA), Santos-SP, Brasil. [2]Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba-PR, Brasil. [3]Institutos Lactec – Curitiba-PR, Brasil

E-mail: lariwintruff@gmail.com

Resumo: Materiais de origem plástica são utilizados em escala global há décadas e a consequente presença de seus resíduos em ambientes aquáticos pode causar efeitos adversos para os organismos. Análises histológicas são uma excelente ferramenta para se avaliar esses efeitos. O bioindicador *Astyanax lacustris* é amplamente utilizado para se avaliar contaminação ambiental, como por exemplo através da avaliação dos danos histológicos em tecidos alvo como brânquias e fígado. Elevação das células do epitélio e congestão vascular foram as histopatologias mais frequentes encontradas nos tecidos branquiais, enquanto deformação do contorno celular, desarranjo dos cordões hepáticos e vacuolização nuclear foram as mais frequentes no fígado. Essas histopatologias foram encontradas nos animais expostos aos tratamentos com HPA, HPA+MP e MP contaminado. Esses resultados indicam que exemplares de *A. lacustres* ao serem expostos ao microplástico e aos HPAs, sozinhos ou em conjunto, apresentam alterações histopatológicas nos tecidos branquial e hepático que basicamente ocorrem como sendo resultado de respostas de defesa ou mecanismos compensatórios.

Palavras-chave: Lambari-do-rabo-amarelo; polietileno; brânquias; fígado; histopatologia.

Combined effects of exposure to polyethylene microplastic and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Histological changes in the neotropical species *Astyanax lacustris*

Abstract: Plastic materials have been used on a global scale for decades and the consequent presence of their residues in aquatic environments can cause adverse effects on organisms. Histological analyses are an excellent tool to evaluate these effects. The Bioindicator Astyanax lacustris is widely used to evaluate environmental contamination, such as by assessing histological damage in target tissues such as gills and liver. Elevation of epithelium cells and vascular congestion were the most frequent histologies found in the gill tissues, while deformation of the cell contour, disarrangement of the hepatic cords and nuclear vacuolization were the most frequent in the liver. These histologies were found in animals exposed to treatments with HPA, HPA+MP and contaminated MP. These results indicate that specimens of A. lacustres when exposed to microplastic and HPAs, alone or together, present histopathological changes in the branchial and hepatic tissues that basically occur as a result of defense responses or compensatory mechanisms.

Keywords: yellow-tail tetra; polyethylene; gills; liver; Histopathology

Introdução

Há décadas, a utilização de materiais de origem plástica vem crescendo em escala [1]. É evidente que o contínuo aumento na demanda e na produção deste produto demanda uma

metodologia de descarte bem desenvolvida, o que não vem ocorrendo quando se considera também o aumento eminente da presença de resíduos desse material no meio dulcícola [2] e marinho [3].

A presença de resíduos plásticos no meio aquático pode causar efeitos adversos para os organismos que nele habitam [4]. Além de causar danos físicos em decorrência da deglutição [5], esses microplásticos, partículas plásticas que possuem entre 0.05 cm e 0.5 cm, podem adsorver compostos tóxicos, como os HPAs, fazendo com que estes organismos sofram os efeitos não somente dos microplásticos em si, mas também dos compostos tóxicos à ele associados [6]. Os HPAs são compostos derivados do petróleo de origem natural e antropogênica [7] [8]. Eles são amplamente encontrados em ambientes aquáticos, sendo conhecidos pelos seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos [9].

Para melhor compreensão dos efeitos dos contaminantes nos organismos aquáticos, a utilização de dados histológicos é uma ótima ferramenta pois permite uma avaliação profunda dos danos diretos e indiretos causados pelos compostos tóxicos aos organismos.

O organismo teste *Astyanax lacustris* (anteriormente chamado de *A. altiparanae*) popularmente chamado de lambari-do-rabo-amarelo é muito utilizado em testes de toxicidade e ecotoxicológicos [10]–[12] por ser amplamente distribuído no Brasil e ter uma participação relevante na teia alimentar, atuando como presa e predador com habito onívoro e detritívoro [13].

Objetivo

Estudar os danos histológicos no tecido branquial e hepático de *Astyanax lacustris* expostos à HPAs e microplásticos, avaliando os efeitos individuais e sinérgicos desses contaminantes.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA) do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba. Exemplares de *A. lacustres* (peso= (10,003 ± 0,117 g; Comprimento= 10,360 ± 0,211 cm), obtidos comercialmente (Peixes e Peixes®, Curitiba – PR), foram mantidos durante o período de aclimatação em estufa de manutenção com sistema circulação de água declorada (pH= 7.24 ± 0.66; alcalinidade = 40.0 ± 1.4 mg CaCO3 L-1), areação constante (oxigênio dissolvido = 6.13 ± 0.72 mg L-1),

temperatura controlada (25.4 ± 0.7 °C) e alimentação diária com ração comercial (taxa de proteína 24 a 32%). Antes do início dos experimentos, foram aclimatados em aquários de 80 L por uma semana em ambiente com temperatura do ar controlada (25 ± XX °C).

Após aclimatação inicial, os exemplares de *A. lacustris* foram acondicionados individualmente em aquários de vidro de 4 L e mantidos nessas condições por 24h antes do para aclimatação às condições experimentais. Após esse período, os animais foram divididos em seis tratamentos (n=12/tratamento): 1) Controle, 2) Controle sem manuseio (qual a diferença entre esse controle e o outro?), 3) Microplástico inerte (MP inerte), 4) HPA, 5) Microplástico + HPA (MPHPA) e 6) Microplástico previamente contaminado com HPA (MP contaminado) e mantidos nessas condições por 96 h. Durante o período de aclimatação (24 h) e experimental (96 h) os animais foram mantidos sob aeração constante (OD ≥ 6,5 mg/L) e temperatura controlada (25,0 ± 1,0 °C). Para auxiliar no controle da temperatura, os experimentos foram realizados em banho-maria equipados com aquecedores e em sala com temperatura ambiente controlada (25,0 ± 1,0 °C). A alimentação dos peixes foi suspensa durante todo o período experimental.

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados (solução de MS222 tamponada) insensibilizados por secção medular e mortos por hipovolemia. Foram coletados o tecido branquial e hepático para análise histológica. Os tecidos foram fixados em (ALFAC) (24 h) e conservados em álcool 70%. O tecido foi, posteriormente, desidratado em álcool e xilol e incluído em parafina. Os tecidos foram seccionados (5 µm) e corados com H/E. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz com aumento de 1000x. As histopatologias foram identificadas e classificadas de acordo com a metodologia descrita por Walker et al. [14].

Resultados

As alterações histopatológicas encontradas nas brânquias e fígado são descritas na Tabela 1. As histopatologias mais encontradas nos tecidos branquiais foram elevação das células do epitélio e congestão vascular, ambas possuem grau I de dano. Já no tecido hepático as histopatologias mais frequentes foram deformação do contorno celular, desarranjo dos cordões hepáticos e vacuolização nuclear, todas de grau I.

Discussão

ISSN: 2594-6153

As histopatologias presentes nos organismos estudados indicam uma alteração fisiológica devido aos contaminantes presentes nos tratamentos. O tecido branquial é o primeiro tecido ao entrar em contato com qualquer contaminante por ser um órgão externo. Já o fígado é um órgão de biotransformação, logo um órgão que facilmente será afetado se algo tóxico está presente no organismo. Pode-se observar uma maior frequência de ocorrência de patologias nos tratamentos em relação ao controle. Basicamente, essas alterações ocorrem como sendo resultado de respostas de defesa ou mecanismos compensatórios.

Tabela 1. Frequência de alterações histopatológicas presentes em tecido branquial e hepático de *A. lacustris*.

Alterações branquiais	**Grau**	**Controle**	**Controle s/ manuseio**	**MP inerte**	**HPA**	**HPAMP**	**MP contaminado**
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	0	0	0	0	0	0
Elevação das células do epitélio	I	+	+	++	+++	+++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0	0	0	0	0	0
Fusão Lamelar	I	0+	0+	0	0	0	0
Dilatação do seio sanguíneo	I	0	0	0	0	0	0
Constrição do seio sanguíneo	I	0	0	0	0	0	0
Congestão vascular	I	0+	0+	+	++	+	+
Presença de parasitas	I	0	0	0	0	0	0
Fusão completa de todas as lamelas	II	0	0	0	0	0	0
Ruptura do epitélio lamelar	II	0	0	0	0	0	0
Espessamento do tecido proliferativo	II	0	0	0	0	0	0
Rompimento das células pilares	II	0	0	0	0	0	0
Hemorragia comruptura do epitélio	II	0	0+	0	+	+	0
Aneurisma lamelar	II	0	0	0	0+	0	0
Necrose focal	III	0	0	0	0	0	0
Alterações hepáticas	**Grau**	**Controle**	**Controle s/ manuseio**	**MP inerte**	**HPA**	**HPAMP**	**MP contaminado**
Fibrose	III	0	0	0	0	0	0
Hipertrofia nuclear	I	0	0	0	0	0	0
Hipertrofia celular	I	0	0	0	0+	0	0
Atrofia celular	I	0	0	0	0	0	0
Atrofia nuclear	I	0	0	0	0	0	0
Aumento da frequência de vasos	I	0	0	0	0	0	0
Deformação do contorno nuclear	I	0	0	0	0	0	0
Deformação do contorno celular	I	0	0	+++	+++	+++	+++
Desarranjo dos cordões hepáticos	I	0	0	+	+++	++	++
Núcleos na periferia da célula	I	0	0	0	0	0	0
Presença de melanomacrófagos	I	0	0	0	0	0	0
Vacuolização citoplasmática	I	0	0	0	0	0	0
Grânulos eosinófilos	I	0	0	0	0	0	0
Vacuolização nuclear	II	0	0	+	++	+	++
Degeneração nuclear	II	0	0	0	0	0	0
Degeneração citoplasmática	II	0	0	0	0	0	0
Núcleos picnóticos	II	0	0	0	0	0	0
Rompimento celular	II	0	0	0	0	0	0
Estagnação biliar	II	0	0	0	0	0	0
Ruptura de vasos	II	0	0	0	0	0	0
Congestão	II	0	0	0	0	0	0
Necrose focal	III	0	0	0	0	0	0
Necrose total	III	0	0	0	0	0	0

0 Ausência; 0+ Ocorrência rara; + Presente; ++ Frequente; +++ Muito frequente.

Conclusões

Ao serem expostos ao MP inerte, HPA, MP+HPA e MP contaminado os indivíduos de *A. lacustris* apresentam alterações histopatológicas em tecido branquial e tecido hepático.

Agradecimentos: O presente estudo foi financiado pela CAPES – Código de financiamento 001. Os autores gostariam de agradecer ao LABOMAC e a UNISANTA, ao GIA e a UFPR pela estrutura fornecida para o desenvolvimento do presente trabalho.

Referências

1. G. Gourmelon, "Global Plastic Production Rises, Recycling Lags. Worldwatch Institute. http://www.plastic-resource-center.com. Accessed on 9 April 2020.," pp. 1–7, 2015.
2. M. C. Andrade et al., "First account of plastic pollution impacting freshwater fishes in the Amazon: Ingestion of plastic debris by piranhas and other serrasalmids with diverse feeding habits," Environ. Pollut., vol. 244, pp. 766–773, 2019, doi: 10.1016/j.envpol.2018.10.088.
3. A. Cózar et al., "Plastic debris in the open ocean," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 111, no. 28, pp. 10239–10244, 2014, doi: 10.1073/pnas.1314705111.
4. L. Van Cauwenberghe, A. Vanreusel, J. Mees, and C. R. Janssen, "Microplastic pollution in deep-sea sediments," Environ. Pollut., vol. 182, pp. 495–499, 2013, doi: 10.1016/j.envpol.2013.08.013.
5. S. Avery-Gomm, S. B. Borrelle, and J. F. Provencher, "Linking plastic ingestion research with marine wildlife conservation," Sci. Total Environ., vol. 637–638, no. July, pp. 1492–1495, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.409.
6. Y. Mato, T. Isobe, H. Takada, H. Kanehiro, C. Ohtake, and T. Kaminuma, "Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment," Environ. Sci. Technol., vol. 35, no. 2, pp. 318–324, 2001, doi: 10.1021/es0010498.
7. K. H. Kim, S. A. Jahan, E. Kabir, and R. J. C. Brown, "A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects," *Environ. Int.*, vol. 60, pp. 71–80, 2013, doi: 10.1016/j.envint.2013.07.019.
8. Y. Zhang and S. Tao, "Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004," *Atmos. Environ.*, vol. 43, no. 4, pp. 812–819, 2009, doi: 10.1016/j.atmosenv.2008.10.050.
9. Dipple A, Cheng SC, Bigger CA. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. Prog Clin Biol Res. 1990;347:109.
10. A. O. Junqueira Stevanato1, Fernanda Thaline da Silva Martins2*, Raphaela Toniolo Trauczynski2 and 1Programa, "Efeitos Da Exposição À Fração Solúvel Em Água Da Gasolina, Do Petróleo E Do Óleo Mineral Em Embriões E Larvas De Astyanax Altiparanae (Pisces, Characiformes)," 2019, doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
11. B. F. Pereira et al., "Effects of Biodegradable Detergents in Morphological Parameters of Liver in Two Neotropical Fish Species (Prochilodus lineatus and Astyanax altiparanae)," Microsc. Res., vol. 02, no. 02, pp. 39–49, 2014, doi: 10.4236/mr.2014.22006.
12. G. V. Cimbaluk et al., "Evaluation of multiwalled carbon nanotubes toxicity in two fish species," Ecotoxicol. Environ. Saf., vol. 150, no. December, pp. 215–223, 2018, doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.034.
13. C. A. Fernandes and I. C. Martins-Santos, "Astyanax altiparanae," Genet. Mol. Biol., vol. 430, pp. 421–430, 2002, doi: 10.1590/S1415-47572006000300011.
14. Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peckall, D.B.Principles of ecotoxicology. Taylor & Francis, Londres,321p., 1996.