

Alterações Hematológicas em Apaiaris (*Astronotus ocellatus*) Expostos Artificialmente a Metilmercúrio

Francie Santos de Lima

Bolsista de Iniciação Científica, Biologia Marinha, FAMATh

Zuleica Carmen Castilhos

Orientadora, Geoquímica Ambiental, D. Sc.

Ana Paula de Castro Rodrigues

Co-orientadora, Geoquímica Ambiental, M. Sc.

Nadia Almosny

Co-orientadora, Medicina Veterinária, DSc.

Resumo

O metilmercúrio, sobretudo em ecossistemas aquáticos, mostra fenômeno de bioacumulação e biomagnificação, ou seja, atinge os maiores teores em organismos de níveis tróficos mais elevados via alimentação. Contudo, pouco se conhece sobre os efeitos adversos à biota. A causalidade deve ser demonstrada por meio de relação dose-resposta, averiguada unicamente por bioensaios. O presente trabalho investigou possíveis alterações em parâmetros hematológicos de apaiaris (*Astronotus ocellatus*) expostos ao metilmercúrio, via alimentação, utilizando ração comercial contaminada com cloreto de metilmercúrio na concentração de 7ppm durante 4 meses. Os indivíduos expostos apresentaram teores de metilmercúrio em sangue, em torno de um ordem de grandeza superiores aos controles, aumento de volume globular e diminuição na concentração de hemoglobina nos eritrócitos. Os resultados sugerem que o metilmercúrio é capaz de causar alterações hematológicas em peixes tropicais. Trabalhos futuros investigarão outras possíveis alterações, incluindo alterações bioquímicas e histológicas.

1. Introdução

Os ecossistemas aquáticos vêm sendo modificados por diversas atividades antrópicas, em especial através do lançamento de substâncias tóxicas no meio, alterando o ciclo biogeoquímico de substâncias orgânicas e inorgânicas, dentre elas o mercúrio (Hg). O mercúrio é um metal-traço presente no ambiente naturalmente em baixas concentrações (Sellanes *et al*, 2002) e que possui grande capacidade de bioacumulação e biomagnificação quando na sua forma orgânica de metilmercúrio - MeHg. Este é transferido e acumulado desde o primeiro nível trófico (produtores) até os consumidores, via alimentação, sendo que o último nível apresentará as maiores concentrações. Estes processos vêm sendo amplamente estudados. Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos potenciais do metilmercúrio à biota aquática, especialmente em peixes tropicais que ocupam níveis tróficos altos, como peixes carnívoros restritos (Rodrigues, 2006). Para humanos, sabe-se que o MeHg é neurotóxico e teratogênico e que a mais importante via de exposição é o consumo de pescado contaminado.

Potenciais efeitos toxicológicos de diversos xenobióticos sobre a biota têm sido estudados através de biomarcadores (ATSDR, 1994). Alguns estudos têm focado os efeitos do MeHg sobre populações de peixes e/ou sobre o indivíduo, coletados em seu habitat natural ou em laboratório através de bioensaio. Alterações na hematologia foram verificadas em ciclídeos da região amazônica, de vida livre, com aumentados teores de mercúrio, bem como em outras espécies de peixes, em bioensaios com mercúrio (Souto, 2004 & Berntssen *et al* 2004).

Os bioensaios são utilizados para se determinar que tipo de resposta biológica poderá ocorrer através da ação de uma substância contaminante, estabelecendo uma relação de causa e efeito (LANDIS & YU, 1995). Os bioensaios também são relevantes para a determinação de valores de referência, visto que estes não estão disponíveis na literatura, principalmente para peixes tropicais e, também, pela dificuldade em encontrar áreas de referência, ou seja, não perturbadas por ações humanas. Contudo, existem algumas dificuldades na realização dos bioensaios para uma completa mimetização do ambiente natural. Bioensaios mimetizando a exposição crônica de peixes a metilmercúrio, via alimentação, não são triviais e vem sendo aprimorados (Hammerschmidt *et al.*, 2002; Berntssen *et al.*, 2004), necessitando, também, de técnicas de manejo e conservação adequadas.

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar possíveis respostas hematológicas em peixes da espécie *Astronotus ocellatus* (apaiaris; Cichlidae) expostos artificialmente ao metilmercúrio, em ensaio crônico. Esta espécie é originária da Bacia Amazônica, de hábito alimentar onívoro com tendência a carnívora, pertence à mesma família na qual estudos prévios demonstraram alterações hematológicas relacionadas à exposição ao mercúrio (Souto, 2004; Silva, 2004) e possibilita sua manutenção em aquários de volume relativamente pequeno.

2. Materiais e Métodos

O apaiari é um peixe teleósteo pertencente à família Cichlidae, mesma família do tucunaré, e é utilizado comercialmente para aquariofilia e também para alimentação. O peixe atinge porte máximo de 25 a 30 centímetros de comprimento e aproximadamente 1,5 Kg. Habita águas de pH variando entre 6,0 e 8,0 e temperatura entre 22 a 25°C.

2.1 Bioensaios

Apaiaris (*Astronotus ocellatus*) de ambos os sexos foram adquiridos de um mesmo criador com aproximadamente 4 cm e aclimatados durante 3 meses no Laboratório de Hidrobiologia e Pesca da Faculdade de Veterinária – UFF. Esse período foi necessário para que os animais obtivessem tamanhos adequados para realização das coletas de sangue preocupando-se em manter a higidez e sobrevivência dos indivíduos. Após a aclimação, o experimento foi iniciado, tendo duração de 6 meses. Aqui serão apresentados os resultados dos quatro primeiros meses de experimento, que terminará em julho de 2009.

Os peixes foram mantidos em aquários individuais e independentes, com filtragem biológica e aeração 24 horas/dia, sendo alimentados com diferentes rações comerciais com alto valor protéico (40 % de proteína bruta),

2 vezes ao dia até a saciedade aparente, visando uma alimentação balanceada. Os aquários eram submetidos à troca parcial de água mensalmente e os parâmetros de qualidade da água, pH e temperatura, foram acompanhados semanalmente com utilização de quites comerciais para aquarofilia. Foram mantidos 13 espécimes de *Astronotus ocellatus* no grupo teste e 13 no grupo controle. Os animais do grupo teste foram alimentados com ração comercial contaminada com cloreto de metilmercúrio na concentração de 7ppm. Esta concentração foi escolhida levando-se em consideração resultados descritos na literatura para peixes de ambiente temperado (Hammerschmidt *et al.*, 2002; Berntssen *et al.*, 2004).

2.2 Parâmetros Biométricos

Os animais foram pesados e medidos (comprimento total) bimestralmente a partir do início do experimento, sempre após a coleta de sangue.

2.3 Hemograma

Foram realizadas 3 coletas de sangue com os peixes em jejum de 12 horas. A primeira no início do experimento (janeiro de 2009), antes de qualquer contaminação artificial do grupo teste. A segunda e a terceira coletas foram realizadas bimestralmente (março e maio de 2009, respectivamente).

A amostra sanguínea foi obtida promovendo-se a contenção e posicionamento do animal para punção. Foi coletado em média 0,4mL de sangue da veia caudal com seringa de 1ml e agulhas calibre 13 x 4,5 (26 G $\frac{1}{2}$ "), previamente rinsada com o anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Campbell, 2004) e acondicionadas em refrigeração até o processamento, no mesmo dia, no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF). O volume de sangue coletado foi definido em relação ao peso dos animais seguindo a fórmula: $(\text{Peso} \times 10/100) \times 5/100$. Essa padronização do volume é importante para a manutenção da vida do animal após a coleta, sem causar qualquer debilidade. Para separação e posterior determinação de mercúrio total nas hemácias, o sangue foi centrifugado a uma rotação de 3000 rpm por 5 minutos.

O hemograma foi realizado como sugerido por Almosny *et al.* (1993), no qual todos os tipos celulares estão presentes na câmara de Neubauer durante a contagem de eritrócitos e leucócitos. O eritrograma consiste na determinação do número de eritrócitos (H), hemoglobinometria (Hb) e volume globular (VG) de cada amostra. A hematimetria (H) foi feita a partir da diluição do sangue 1:100 em soro fisiológico. O volume globular foi obtido utilizando-se a técnica de microhematócrito em tubos capilares. O Volume Globular Médio (VGM) foi calculado aplicando-se a fórmula $\text{VG} \times 1000/\text{H}$. A hemoglobinometria foi realizada através de quites Labtest. A Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) foi calculada aplicando-se a fórmula $\text{Hb} \times 100/\text{VG}$. A leucometria global (contagem do número de leucócitos por mm³ de sangue) foi feita a partir da mesma diluição usada para hematimetria e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

2.4 Determinação Quantitativa de Hg

O Hg foi analisado nas rações utilizadas para alimentação, na água dos aquários (para verificação de possível passagem do MeHg para a água) e nas hemácias dos peixes através de um aparelho de absorção atômica (LUMEX). O equipamento trabalha de acordo com o princípio da destruição térmica da amostra seguida pela determinação da quantidade de vapor de mercúrio. A concentração do vapor do mercúrio é medida por uma célula analítica pela diferença de intensidade de radiação. Cálculos de acuracidade e a precisão foram realizados, sendo aceitos erros máximos de 10%.

2.5 Tratamento Estatístico dos dados

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o programa SPSS, versão 17.0, por análise de correlação de Pearson (para tratamento dos dados totais) e de Spearman (para grupos), e ANOVA para investigar diferenças entre os grupos controle e teste para todos os parâmetros, aceitando-se o nível de significância de $p < 0,05$, ou seja, um erro de 5%.

3. Resultados e Discussão

Entre a primeira coleta (tempo zero) e a terceira (de quatro meses de exposição) houve a perda de 8 espécimes, 5 do grupo controle e 3 do grupo teste. Ressalta-se que, em alguns casos, o volume de sangue coletado foi insuficiente para realização de todos os parâmetros. Por isso, são observadas diferenças nos números de amostras analisadas em cada parâmetro durante o tempo do experimento. Sendo assim, análises estatísticas foram realizadas apenas com os parâmetros com número razoável de indivíduos.

Os teores de Hg nas amostras de água resultaram abaixo do limite de detecção do aparelho, indicando perda insignificante de MeHg da ração contaminada para a água.

Na tabela 1 são apresentadas as médias \pm desvios padrão dos resultados encontrados para os parâmetros biométricos, concentração de mercúrio total nos eritrócitos e valores para o hemograma. A ração não contaminada, utilizada na aclimação, para ambos os grupos, e para o grupo controle durante o experimento, mostraram teores de Hg de 20,5ng/g a 37,5ng/g, o que pode explicar os detectados teores de Hg em sangue dos peixes no tempo zero e durante o experimento, para os peixes controle. Os peixes cresceram de forma homogênea entre os grupos, ou seja, o tamanho e o peso dos animais no grupo teste não foram diferentes do grupo controle durante o experimento. Na primeira coleta, onde nenhum espécime fora contaminado ainda, não houve diferença significativa para nenhum parâmetro estudado, demonstrando que os animais estavam em condições de saúde equivalentes.

Em relação ao grupo teste, os teores de Hg nas hemácias foram diferentes nas três coletas, havendo um aumento da concentração com o passar do tempo (Anova, $F=9,94$; $p < 0,01$). A partir da exposição ao alimento contaminado, os teores de Hg nas hemácias aumentaram exponencialmente, sendo cerca de uma ordem de magnitude mais altas do que no grupo controle, tanto nos primeiros dois meses (Anova, $F=33,6$; $p < 0,001$) quanto

após 4 meses de exposição (Anova, $F=62,1$; $p<0,001$). É importante ressaltar que os teores observados, para ambos os períodos de exposição, estão numa faixa equivalente aos observados em peixes de vida livre (Rodrigues, 2006).

No grupo teste, o VG e o VGM foram maiores na coleta de 2 meses (Anova, $p<0,001$), enquanto a Hb e a CHGM decresceram (Anova, $p<0,01$). A CHGM apresentou correlação significativa com a concentração de Hg em hemácias ($p<0,05$; $n=39$), refletindo as diferenças encontradas nos valores de VG e Hb, uma vez que seu cálculo é uma relação entre esses dois parâmetros. Aos 4 meses de experimento, as concentrações de mercúrio continuaram a aumentar, e o VG decresceu (Anova, $F=9,9$; $p<0,01$). Esses resultados refletem as mudanças no volume ocupado pelos eritrócitos no sangue, sem alteração significativa da hematimetria, sugerindo desequilíbrios osmóticos ou até mesmo quadro de anemia potencial, pois o aumento do volume pode ser consequência de maior número de eritrócitos adultos e menor número de eritrócitos jovens, sugerindo que a produção e a maturação desses eritrócitos podem ser alteradas como resultado da exposição ao metilmercúrio.

O aumento na leucometria global do grupo teste nos dois últimos meses (Anova, $p<0,001$) demonstra uma ativação das respostas imunológicas do organismo, estando correlacionadas também à concentração de Hg nas hemácias ($P=0,58$; $p<0,001$; $n=33$). Embora a tendência de aumento no número de leucócitos tenha sido observada também no controle (Anova, $p<0,05$), o incremento no grupo controle foi 1,5 vezes e para o grupo teste, o valor triplicou, ou seja, os resultados sugerem que o sistema inune possa ser ativado direta ou indiretamente pelo Hg.

4. Conclusões

Os apaiaris *Astronotus ocellatus* expostos artificialmente a metilmercúrio, via alimentação, por período crônico, apresentaram resultados que sugerem que a produção e a maturação de eritrócitos, bem como a ativação do sistema inune podem ser afetados como resultado da exposição ao metilmercúrio, reforçando a hipótese, observada em estudos prévios *in situ*, de que o metilmercúrio seja capaz de causar alterações hematológicas em peixes tropicais. Trabalhos futuros investigarão outros indicadores biológicos, incluindo alterações bioquímicas e histológicas desses animais e, ainda, diferentes doses serão utilizadas para se testar a causalidade por meio da interrelação dose-resposta.

Tabela 1. Resultados encontrados nas três coletas de sangue realizadas para parâmetros biométricos, concentração de mercúrio total (w.w.) nos eritrócitos e hemograma de apaiaris (*Astronotus ocellatus*) expostos artificialmente a metilmercúrio (7ppm) durante 4 meses.

		TEMPO ZERO				2 MESES				4 MESES			
		CONTROLE		TESTE		CONTROLE		TESTE		CONTROLE		TESTE	
		Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n
Biometria	Tamanho total (cm)	14,6 ± 0,7	13	14,4 ± 0,6	13	16,8 ± 1,8	11	17,5 ± 0,6	13	19,2 ± 1,3	9	19,0 ± 1,2	11
	Peso (g)	69,9 ± 11,3	13	68,1 ± 9,8	13	109,2 ± 23,4	11	108,8 ± 18,0	13	181,8 ± 45,2	9	180,1 ± 29,3	12
HgHe (ng/g)		10,9 ± 15,0		17	7,4 ± 12,4	9	543,7 ± 258,9	11	9,7 ± 4,7	6	1090,6 ± 231,0	5	
Hemograma	H (10 ⁶ /mm ³)	1,8 ± 0,5	12	1,6 ± 0,5	13	1,6 ± 0,7	11	1,4 ± 0,6	13	1,8 ± 0,5	5	1,2 ± 0,2	8
	L (10 ³ /mm ³)				235,4 ± 107,8	11	167,3 ± 54,8	13	412,0 ± 124,0	5	559,4 ± 262,9	8	
	VG(%)	22,8 ± 7,4	13	22,8 ± 5,9	13	25,1 ± 9,3	10	30,5 ± 4,8	13	24,8 ± 3,0	5	20,4 ± 2,1	8
	Hb (mg/l)	4,7 ± 1,9	8	6,5 ± 2,9	9	2,5 ± 0,3	10	2,5 ± 0,6	13	4,7 ± 1,7	5	5,4 ± 1,4	8
	VGM (fl)	129,9 ± 42,5	12	144,0 ± 45,6	13	166,5 ± 72,8	10	262,0 ± 121,7	13	148,3 ± 37,1	5	155,0 ± 37,5	8
	CHGM (%)	19,8 ± 8,6	8	28,8 ± 13,9	9	11,2 ± 4,3	9	8,5 ± 2,7	13	19,7 ± 9,6	5	27,0 ± 9,0	8

HgHe= Mercúrio total em hemácias; H=Hematimetria; L=Leucometria global; VG=Volume globular; Hb=Hemoglobina; VGM = Volume globular médio;

CHGM=Concentração de hemoglobina globular média

5. Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida; à parceria com a Universidade Federal Fluminense, mais especificamente com a Faculdade de Veterinária, através do auxílio da Profª Nádia Regina Pereira Almosny, que cedeu espaço para a realização do experimento e para as análises de hemograma e bioquímica; a toda equipe (Patrícia Araújo e Eliel Gama) do Laboratório de Especificação de Mercúrio Ambiental (LEMA), do CETEM, pelo suporte nas determinações de mercúrio; à Ana Paula de Castro Rodrigues e Zuleica Carmen Castilhos.

6. Referências Bibliográficas

ALMOSNY, NRP *et al.* Hemograma de Aves: Métodos. VI Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa, Salvador, BA., 1993.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological profile. US. Dept. of Health and Human Services, TP-93/05, Atlanta, Ga., 1994.

BERNTSSEN, M. H.G; HYLLAND, K.; JULSHAMN, K.; LUNDEBYE, A.-K.; WAAGBO, R. Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish feed. *Aquaculture Nutrition*, v.10, p.83-97, 2004.

CAMPBELL, T.W. Hematology of Fish. In: Thrall, M. A. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. p. 277-289. Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

HAMMERSCHIMDT, C.R.; SANDHEINRICH, M.B.; WIENER, J.G.; RADA, R.G. Effects of dietary MeHg on reproduction of fished minnows. *Environ. Sci. Technology*. V.36, p.877-883, 2002.

LANDIS, W. G.; YU, MING-HO. *Introduction to environmental toxicology - Impacts of chemical upon ecological systems*. Lewis Publishers, 1995.

RODRIGUES, A.P.C., *Avaliação de Risco Ecológico associado à contaminação mercurial em dois estuários do estado do Rio de Janeiro: Baía de Guanabara e Baía da Ribeira*. Niterói, 2006. Dissertação (Mestrado em Geociências-Geoquímica Ambiental), Universidade Federal Fluminense. 2006.

SELLANES, A.G., MÁRSICO, E.T., SANTOS, N.N., SÃO CLEMENTE, S.C., OLIVEIRA, G.A. & MONTEIRO, A.B.S. Mercúrio em Peixes Marinhos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 30: 107-112. 2002.

SILVA, L. C. C. P. da. *Avaliação da contaminação mercurial sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos plasmáticos de tucunarés (Cichla spp.) oriundos da região do Rio Tapajós, Pará, Brasil*. Dissertação (Mestrado) Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2004.

SOUTO, P. S. dos S. *Risco ecológico associado a contaminação mercurial em ecossistemas aquáticos da Amazônia: Região do rio Tapajós, estado do Pará, Brasil. Caracterização através de biomarcadores no gênero Cichla (tucunarés)*. Tese (Doutorado) Geociências-Geoquímica ambiental, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.