

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS DE PEIXES E
ANFÍBIOS CAUSADAS PELO USO DO FORMALDEIDO**

Diego Sales dos Santos

**Orientadora: Prof^a. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério
Coorientadora: Prof^a Dra. Fernanda Menezes França**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Agosto – 2018

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS DE PEIXES E
ANFÍBIOS CAUSADAS PELO USO DO FORMALDEIDO**

Diego Sales dos Santos

**Orientadora: Prof^a. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério
Coorientadora: Prof^a Dra. Fernanda Menezes França**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Agosto – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

S237a

Santos, Diego Sales dos
Alterações histopatológicas em brânquias de peixes e anfíbios causadas
pelo uso do formaldeído. / Diego Sales dos Santos. São Paulo, 2018.
v, 41f. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e
Abastecimento.

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

1. Anuros. 2. Osteictes. 3. Formol. 4. Arcos branquiais. 5. Danos histológicos.
I. Mostério, Cláudia Maris Ferreira. II. Título.

CDD 636.95

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

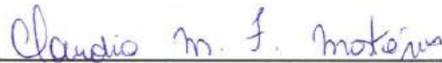
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

“ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS DE
PEIXES E ANFÍBIOS CAUSADAS PELO USO DO
FORMALDEÍDO”

AUTOR: Diego Sales dos Santos

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maris Ferreira Mostério

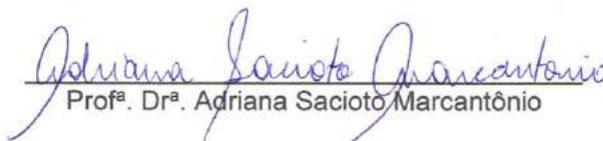
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof^a. Dr^a. Cláudia Maris Ferreira Mostério

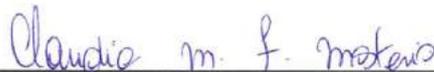


Prof^a. Dr^a. Monica Ponz Louro



Prof^a. Dr^a. Adriana Saciotto Marcantônio

Data da realização: 30 de agosto de 2018



Presidente da Comissão Examinadora
Prof^a. Dr^a. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Dedicatória

Dedico a minha família, amigos, e todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram com este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

A minha Orientadora Dr^a. Cláudia Maris Ferreira Mostério por me apoiar e contribuir intelectualmente com minha formação.

A minha Coorientadora Dr^a Fernanda Menezes França pela ajuda e conhecimentos.

Ao Instituto de Pesca da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios da Secretaria de Agricultura Abastecimento do Estado de São Paulo, por conceder a oportunidade cursar o Mestrado.

A CAPES e ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Pesca pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Ao Ocimar Pedro, secretário da Pós-Graduação.

Aos meus colegas do curso de mestrado: Cinthia, Karen, Sthefany, Iara, Fernanda, Taina, Junior e Cristina, e em especial, ao agora MSc André Resendes pela amizade, apoio, companheirismo e compartilhamento do material de estudo.

Profa. Dra. Maria Letizia Petesse, pela ajuda nas análises estatísticas.

À Prof^a. Dra. Cristina Martins, pela ajuda na leitura e interpretação dos achados histológicos e a Luara, Rodolfo pela ajuda nas confecções das lâminas.

O colégio Mackenzie pela oportunidade de realizar o estágio acadêmico.

Aos pesquisadores da Apta/SAA, do Vale do Paraíba, por me receberem e auxiliarem na realização de parte dos experimentos.

A família Myasaka por me receber em São Paulo.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram durante essa etapa, o meu agradecimento, muito obrigado.

Sumário

1. Agradecimentos.....	i
2. Resumo.....	iii
3. Abstract.....	iv
4. Introdução geral.....	1
5. Objetivo.....	8
6. Apresentação da dissertação.....	8
7. Referências bibliográficas.....	8
8. Cap. Único: Efeitos do formaldeído em brânquias de peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) e girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	
9. Resumo.....	14
10. Introdução.....	15
11. Material e Métodos.....	17
12. Resultados.....	20
13. Discussão.....	24
14. Agradecimentos.....	27
15. Referências bibliográficas.....	27
16. Anexos.....	33

Resumo geral

Na aquicultura deve haver equilíbrio entre a saúde do hospedeiro, a proliferação de agentes patogênicos e as condições do ambiente aquático. A má qualidade de água, a redução de oxigênio dissolvido, alterações bruscas de temperatura, alta densidade de organismos aquáticos, manejo inadequado ou nutrição desequilibrada são fatores capazes de produzir estresse aos animais, predispondo-os a diferentes infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias. O formaldeído é um agente genotóxico, carcinogênico e agressivo principalmente aos tecidos epiteliais. Porém, na aquicultura, seu uso é comum no tratamento de fungos e parasitas, e a utilização de doses inadequadas pode prejudicar a saúde e a vida dos organismos aquáticos. Neste cenário, os testes de toxicidade aquática têm sido cada vez mais utilizados para determinar os efeitos deletérios causados por produtos químicos como o formaldeído. O peixe-zebra (*Danio rerio*) e os girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), são dois modelos experimentais utilizados em ecotoxicologia por possuírem grande sensibilidade e ao mesmo tempo resistência a vários xenobióticos, e são capazes de absorver de forma rápida os compostos químicos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos. No presente estudo, identificamos os principais efeitos causados pelo formaldeído às brânquias desses dois modelos experimentais utilizados em ecotoxicologia: *D. rerio* adultos e girinos de *L. catesbeianus*, verificando a susceptibilidade de ambas as espécies a este químico. Foram conduzidos ensaios agudos e crônicos e durante a experimentação crônica as brânquias foram retiradas e analisadas histologicamente. A Concentração Letal Mediana 96h do formaldeído para adultos de *D. rerio* foi de 45,73 mg/L e para girinos *L. catesbeianus* foi de 9,17 mg/L. Constatamos que o formaldeído causou lesões às brânquias tanto de *D. rerio* adultos, quanto as de girinos de *L. catesbeianus*, sendo evidenciado perda e deslocamento de epitélio, congestão vascular, necrose; fusão lamelar; hipertrofia e hiperplasia de células epiteliais, aneurisma lamelar, além da proliferação de células secretoras de muco e de células de cloreto. Apesar das diferenças estruturais, as alterações histológicas causadas pela exposição crônica foram semelhantes em ambos os organismos e recomendamos a revisão de sua utilização no tratamento e profilaxia de organismos aquáticos.

Abstract

In aquaculture, there must be a balance between host health, the proliferation of pathogens and the conditions of the aquatic environment. Poor water quality, dissolved oxygen reduction, sudden changes in temperature, high aquatic organisms density, inadequate management or unbalanced nutrition are factors capable of producing stress to the animals, predisposing them to different bacterial, fungal and parasitic infections. Formaldehyde is a genotoxic agent, carcinogenic and aggressive mainly to the epithelial tissues. However, in aquaculture, its use is common in the treatment of fungi and parasites, and the use of inadequate doses may harm the health and life of aquatic organisms. Thus, aquatic toxicity tests have been increasingly used to determine the deleterious effects caused by chemicals such as formaldehyde. In this sense, the zebrafish (*Danio rerio*) and the bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*), possess great sensitivity and at the same time resistance, and are able to quickly absorb the chemical compounds that are directly added in the water and accumulate them in different tissues. These characteristics make them good experimental models. In the present study, we identified the main effects caused by formaldehyde on the gills of these two experimental models used in ecotoxicology: *D. rerio* adults and tadpoles of *L. catesbeianus*, verifying the susceptibility of both species to this chemical. Acute and chronic tests were conducted and during the chronic experiment the gills were removed and histologically analyzed. The median lethal concentration 96h of formaldehyde for adults of *D. rerio* was 45.73 mg/L and for tadpoles of *L. catesbeianus* it was 9.17 mg/L. We found that formaldehyde caused damage to the gills of both *D. rerio* adults and *L. catesbeianus* tadpoles, evidencing loss and displacement of epithelium, vascular congestion, necrosis; lamellar melting; hypertrophy and hyperplasia of epithelial cells, lamellar aneurysm, in addition to the proliferation of mucus secreting cells and chloride cells. Despite the structural differences, the histological changes caused by chronic exposure were similar in both organisms and we recommend the revision of their use in the treatment and prophylaxis of aquatic organisms.

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação dos ecossistemas aquáticos é um processo crescente nos últimos anos em virtude da poluição dos corpos d'água, eutrofização ou descarga de dejetos químicos ou industriais. O resultado desse impacto gera efeitos diretos sobre os peixes e anfíbios. Por estes motivos e também devido às ações antrópicas (poluição, uso excessivo de pesticidas), alterações climáticas e doenças emergentes, muitas populações estão em declínio (ALEXANDER and EISCHEID, 2001; CAREY *et al.*, 1999; FREIRE *et al.*, 2008; MUTHS *et al.*, 2003; STALLARD, 2001).

O processo de antropização nas bacias hidrográficas a partir do aumento das atividades humanas tem se tornado cada vez mais impactante em relação à qualidade das águas. O uso do solo é um importante fator que contribui para a degradação e acelera o processo de eutrofização de rios, lagos e reservatórios (NOGUEIRA *et al.* 2015). Segundo SANTOS *et al.* (2017) a descarga inadequada de resíduos, leva a problemas como: degradação das áreas de manancial e de proteção permanente; proliferação de agentes transmissores de doença; assoreamento de rios e córregos, contaminação de solo e lençóis freáticos.

Estes processos de poluição têm reflexo de maneira direta ou indireta sobre o cultivo de organismos aquáticos. A má qualidade de água, a redução de oxigênio dissolvido, alterações bruscas de temperatura, alta densidade, manejo inadequado ou nutrição desequilibrada são fatores capazes de produzir estresse aos animais, predispondo-os a diferentes infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias. Neste sentido, considera-se a água um ambiente extremamente favorável para a proliferação de agentes patogênicos sendo as parasitoses responsáveis por grandes perdas em nível mundial (ZANOLO e YAMAMURA, 2006).

O Brasil é um país privilegiado por sua fauna e flora. Com 13% das reservas de água do planeta e 8,5 mil Km de costa, possuindo um ótimo potencial de crescimento na Piscicultura. A tilápia é a mais importante espécie de peixe cultivado no Brasil ela representa 51,7% da piscicultura nacional. Tornando O Brasil o 4º maior produtor mundial de tilápias, com produção de 357.693 toneladas para o ano de 2017 de acordo com o levantamento da

Associação Brasileira da Piscicultura (ANUÁRIO PEIXEBR DA PISCICULTURA, 2018).

A rã-touro (*Lithobates castebeianus*) é um ótimo animal para ser comercializado devido suas características como rápido crescimento, tamanho e sua carne possuem uma ótima qualidade nutricional, tornando esse animal de grande interesse econômico. O Brasil é o país pioneiro neste tipo de criação cujas fazendas são datadas desde a década de 30 (DIAS *et al.* 2010, SCHLOEGEL *et al.* 2010). Atualmente, países como Brasil, China, Taiwan e México trabalham com metodologias de criação em confinamento intensivo, o que apesar de ser produtivamente mais rentável acaba por facilitar o afloramento de doenças pelas altas densidades (FREITAS *et al.* 2017; OLIVEIRA, 2017).

O formaldeído é um dos principais produtos químicos utilizado na aquicultura no tratamento de parasitas (MARTINS 2004; TAVARES-DIAS *et al.*, 2002). É um gás incolor com odor irritante e um dos aldeídos mais comuns e abundantes no ambiente. É utilizado na produção de resinas e mobílias e também como produto desinfetante e preservante (ECOTOX, 2006). Em organismos aquáticos pode ser aplicado nas formas de banho, de longa ou curta duração, mas as informações da eficiência e duração dos mesmos ainda é escassa (ARAUJO *et al.*, 2004). Segundo KECK and BLANC (2002) e PAHOR-FILHO *et al.* (2015) o uso do formaldeído pode causar estresse aos animais, e lesões nas brânquias.

Para averiguar estas suposições os testes de toxicidade têm sido cada vez mais utilizados para a determinação de efeitos deletérios em organismos aquáticos, em virtude, principalmente, do potencial risco da transferência de poluente do ambiente para os organismos (FERREIRA, 2002). A exposição a um agente tóxico pode ser aguda, quando a dose letal do tóxico é liberada em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônica, quando o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em doses subletais, durante um período mais longo de tempo (SCHVARTSMAN, 1991). Mas, são os testes ecotoxicológicos que descrevem a relação entre os poluentes químicos, o ambiente e os organismos que ali vivem. A avaliação ecotoxicológica é de extrema importância no controle, regulamentação e classificação das

substâncias tóxicas quanto a seu potencial de risco ambiental (SANTOS SILVA *et al.*, 2015).

O peixe *Danio rerio* e os girinos da espécie *Lithobates catesbeianus*, possuem grande sensibilidade e ao mesmo tempo resistência, e são capazes de absorver de forma rápida os compostos químicos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos. Por esta razão são muito utilizados em testes de toxicologia aquática (GROSSEL and WOOD, 2002, FRANÇA *et al.*, 2015).

Os peixes representam parte significativa da fauna aquática, apresentando sensibilidade aos poluentes. As brânquias dos peixes exercem papéis vitais, pois além de serem o principal sítio de trocas gasosas, também estão envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio acidobásico, excreção de compostos nitrogenados e gustação (MACHADO e FANTA, 2003).

A brânquia é um órgão multifuncional responsável pela respiração, o principal local para excreção de produtos nitrogenados e possui um importante papel no balanço de íons (EVANS *et al.*, 2006; NOGA, 2010). O epitélio brânquial, principal superfície de contato com o ambiente, constitui importante alvo dos poluentes presentes na água devido à sua extensa área superficial (WONG and WONG, 2000). Este epitélio reveste todo o arco branquial, os rastros, os filamentos branquiais e as regiões interlamelares (Figuras 1 e 2). Trata-se de epitélio pavimentoso composto por vários tipos celulares, incluindo células pavimentosas, células secretoras de muco e células de cloreto, além de células gustativas e de suporte não diferenciadas.

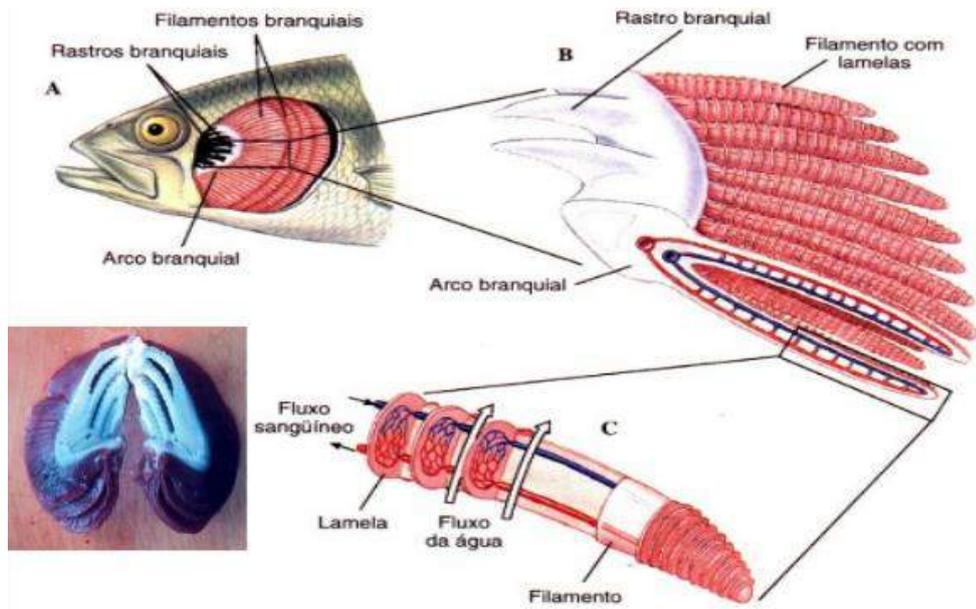


FIGURA 1: Brânquias de peixe teléosteo. **A-** Arcos branquiais que contém numerosos filamentos. **B-** Rastros branquiais (parte interna da brânquia). **C-** Filamento branquial evidenciando os capilares sanguíneos dentro das lamelas septadas. Fonte: <https://pt.slideshare.net/Cargnin/classe-dos-peixes-vertebrados-filo-dos-cordados/5>

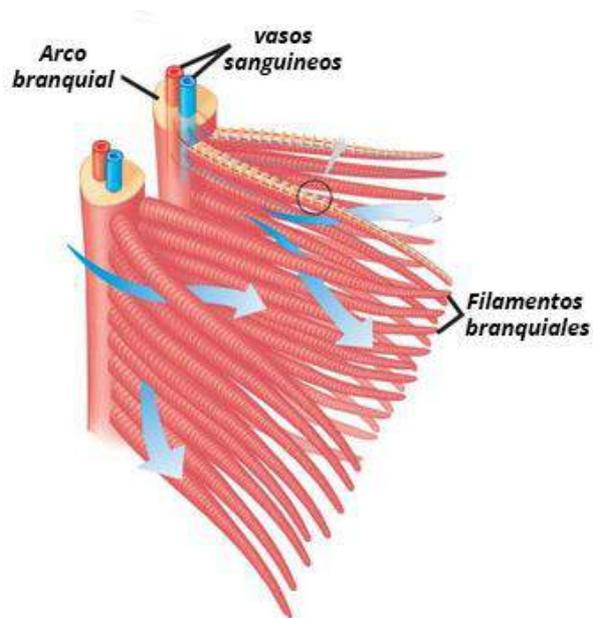


FIGURA 2: Detalhe da brânquia de peixe teléosteo, destacando o arco branquial com vasos sanguíneos, os filamentos e o fluxo da água através dos filamentos. Fonte: <http://biogeoportfolio.blogspot.com/2015/06/unidade-3-transformacao-e-utilizacao-de.html>

Da mesma forma, as brânquias dos anfíbios apresentam grande sensibilidade e exercem vital função na vida desses organismos, principalmente durante os primeiros estágios de vida (*i.e* girinos). Existe uma grande diversidade na em sua estrutura branquial, mas geralmente são internas e constituídas de quatro pares de arcos branquiais. Cada arco com duas filas de aproximadamente 8 a 30 filamentos branquiais discretos. Os filamentos são altamente ramificados dando origem a um número variável de projeções semelhantes a dedos. Essas projeções contêm caniais sanguíneos e constituem a principal superfície de troca gasosa das brânquias (Figura 3).

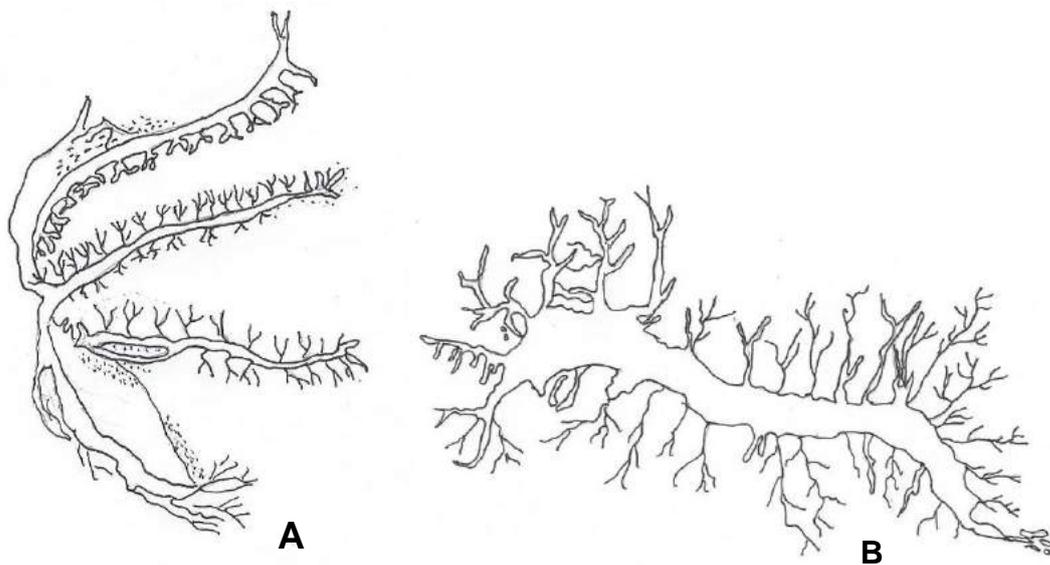


FIGURA 3: A – Brânquias de girinos de *Lithobates catesbeianus* destacando o arco branquial, com quatro pares de arcos branquiais. **B** – Detalhe de um filamento cheio de ramificações com vasos sanguíneos. Créditos: Tainá Martins (tainacarvalho.ap@hotmail.com).

A contaminação da água pode provocar uma série de alterações nos tecidos branquiais que podem ser estudadas através de técnicas histológicas. Segundo MACHADO (1999), as histopatológicas mais encontradas em brânquias, pela ordem são: descolamento do epitélio; necrose; fusão lamelar; hipertrofia das células epiteliais; hiperplasia ou fusão das lamelas por crescimento celular, reduzindo a área de superfície respiratória; ruptura das células epiteliais; hipersecreção de muco; aneurisma lamelar; congestão vascular; proliferação de células secretoras de muco e de células de cloreto; infiltração de leucócitos no epitélio; e alterações no espaço sanguíneo delimitado pelas células pilares (Figura 4).

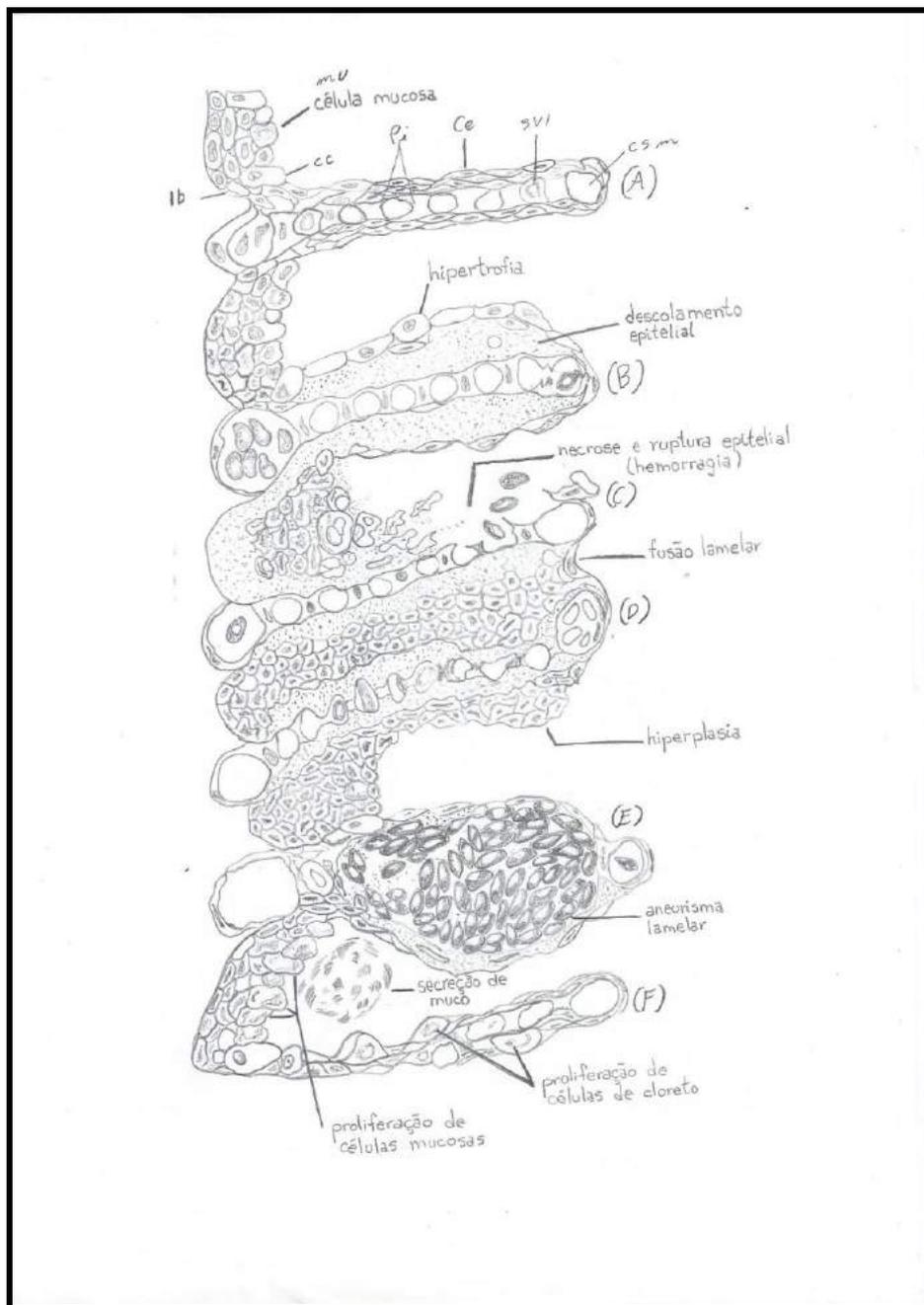


FIGURA 4: Diagrama esquemático das lesões branquiais mais comuns, induzidas por irritação. **A-** normal, **B a F** alterações. Abreviações: **lb-** lâmina basal; **cc-** células de cloreto; **mu-** célula mucosa; **pi-** célula pilar; **ce-** célula epitelial lamelar; **svl-** seio venoso lamelar; **csm-** canal sanguíneo marginal. Créditos: Tainá Martins (tainacarvalho.ap@hotmail.com). Adaptado de Machado (1999).

1.1. Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi identificar os principais efeitos causados pelo formaldeído às brânquias de dois modelos experimentais utilizados em ecotoxicologia: peixe-zebra (*Danio rerio*) e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), verificando a susceptibilidade de ambas as espécies a este químico.

1.2 Apresentação da Dissertação

A dissertação está apresentada em capítulo único em formato de artigo científico. Conforme normas do Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca a Introdução Geral da dissertação segue as referências bibliográficas do Boletim do Instituto de Pesca e o artigo as normas do periódico Anatomia, Histologia, Embryologia (Classificação B1 - CAPES-área de zoologia e Recursos Pesqueiros).

1.3 Referências Bibliográficas

ALEXANDER, M.A.; EISCHEID, J.K. 2001. Climate variability in regions of amphibian declines. *Conservation Biology*, 15: 930-942.

ANUÁRIO PEIXEBR, 2018. Associação Brasileira da Piscicultura, 13-14p.

ARAÚJO, D.L.; CHAGAS E.C.; GOMES, L.V. BRANDÃO, F.R. 2004. Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 217-221.

BURGGREN, W., MWALUKOMA, A. 1983. Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*). I. Morphological responses of lungs, skin and gills. *Journal of Experimental Biology*, 105: 191-203.

CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology*, 23: 459-472.

DIAS, D.C.; STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SANTOS, A.A. 2010 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquatic Research*, 41:1064–1071.

ECOTOX Data Base. 2006. Disponível em: <<https://cfpub.epa.gov/ecotox>>. Acesso em Maio 2018.

EVANS, J.J.; KLESIUS, P.H.; SHOWMAKER, C.A. 2006. Therapeutic and prophylactic immunization against *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Aquaculture Research*, 37: 742-750.

FERREIRA, C.M. 2002. *Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802) como animais sentinelas*. São Paulo: Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Univ. São Paulo. 109p.

FRANÇA, F.M.; PAIVA, T.C.B.; MARCANTÔNIO, A.S.; TEIXEIRA, P.C.; FERREIRA, C.M. 2015. Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 50: 406-410.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3): 1981-9366.

FREITAS, J.J.G.; VIAU, P.; OLIVIERA, C.A.; TEIXEIRA, P.C.; TACHIBANA, L.; DIAS, D.C.; HIPOLITO, M.; BORDON, I.C.C.; ALFAIA, S.R.; FERREIRA, C.M. 2017 Effect of dietary supplements in American bullfrogs reared in low and high stocking densities. *Aquaculture Reports*, 8: 45–48.

GROSELL, M.; WOOD, C.M. 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *Journal Experimental. Biology*, 205: 1179-1188.

KECK, N.; BLANC, G. 2002. Effects of formalin chemotherapeutic treatments on biofilter efficiency in a marine recirculating fish farming system. *Aquatic. Living Resource*, 15: 361–370.

MACHADO, M. R.; FANTA, E. 2003. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 361-372. doi:10.1590/S1516-89132003000300008

MACHADO, M.R.1999. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *UNOPAR Científica, Ciência. Biologica. Saúde*, 1: 63-76.

MARTINS, M. L. 2004 Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira, In: Ranzani-Paiva, M.J., Takemoto, R.M., e Lizama, M. A. P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Editora Varela. São Paulo: P. 355-368.

MUTHS, E.; CORN, P. S.; PESSIER, A. P.; GREEN, D. E. 2003. Evidence for disease-related amphibian decline in Colorado. *Biological Conservation*, 110: 357-365.

NOGA, E.J. 2010. *Diagnosis and Treatment*. Iowa: Wiley-Blackwell. *Fish Disease*, 378p.

NOGUEIRA, F.P., CABRAL, J.B.O., OLIVEIRA, S.F., ROCHA, S.R. 2015. Eutrofização no reservatório da UHE foz do rio claro (go). *Revista do Departamento de Geografia USP*, 30:19- 33.

OLIVEIRA, C.R. 2017 RASTREAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RANAVÍRUS (FV3) EM RÃS-TOURO PROVENIENTES DE CULTIVOS COMERCIAIS. Dissertação Mestrado. 37p. Programa de Pós-graduação em

Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento, São Paulo.

PAHOR-FILHO, E.; MIRANDA, K.C.; KLOSTERHOFF, M.; ROMANO, L.A.; PEREIRA JR., J. 2015. Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes). *Aquatic Resources*: 3040-3045.

SANTOS, A.J., ARAÚJO, C.R.A., SILVA.F.L., ALEXANDRE, L.A.C. 2017. Impactos Causados pelos Resíduos Sólidos do Gesso no Polo Gesseiro de Trindade- PE. *Revista de Piscicultura*, 11(37):143-159.

SANTOS SILVA, J., BARROS, I. K S. R; FREITAS, L.C; PEREIRA, N.J; RAIMUNDA, N.F.C.N. 2015. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. *Bioética*, 23: 2-418.

SCHLOEGEL, L.M.; FERREIRA, C.M.; JAMES, T.Y.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J.E.; HYATT, A.D.; YABSLEY, M.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; MAZZONI, R.; DAVIES, A.J.; DASZAK, P. 2010 The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*: 13,53–61.

SCHVARTSMAN, S. 1991. *Intoxicações agudas*. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 355p.

STALLARD, R. F. 2001. Possible environmental factors underlying amphibian decline in eastern Puerto Rico: analysis of U.S. government data archives. *Conservation Biology*, 15: 943-953.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; SCHALCH, S.H.C.; ONAKA, E.M.; QUINTANA, C.I.F.; MORAES, J.R.E.; MORAES F.R. 2002. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, (1887) (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). *Acta Scientiarum. Animal Science*, 24 : 547-554.

WONG, C.K.; WONG, M.H. 2000 Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, 48: 517-527.

ZANOLO, R.; YAMAMURA, M.H. 2006. Parasitas em tilápias-do-nilo criadas em sistema de tanques-rede. *Ciências Agrárias*, 27: 281-288

Capítulo único

Efeitos do formaldeído em brânquias de peixe-zebra (*Danio rerio*) e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

Resumo: O formaldeído é um agente genotóxico, carcinogênico e agressivo principalmente aos tecidos epiteliais. Porém na aquicultura seu uso é comum no tratamento de fungos e parasitas, e a utilização de doses inadequadas pode prejudicar a saúde e a vida dos organismos aquáticos. A espécie de peixe *Danio rerio* e os girinos da espécie *Lithobates catesbeianus* são reconhecidas internacionalmente para o uso em ensaios ecotoxicológicos. Assim, o objetivo desse estudo foi identificar os principais efeitos causados pelo formaldeído às brânquias de dois modelos experimentais utilizados em ecotoxicologia, peixe-zebra e girinos de rã-touro, verificando a susceptibilidade de ambas as espécies a este produto químico. Para o experimento foram conduzidos ensaios agudos e crônicos com formaldeído. A Concentração Letal Mediana 96h do formaldeído para adultos de *D. rerio* foi de 45,73 mg/L e para a girinos *L. catesbeianus* foi de 9,17 mg/L. Constatamos que o formaldeído causou lesões as brânquias tanto de *D. rerio*, quanto as de girinos de *L. catesbeianus*, sendo evidenciado perda e deslocamento de epitélio, congestão vascular, necrose; fusão lamelar; hipertrofia e hiperplasia de células epiteliais, aneurisma lamelar, além da proliferação de células secretoras de muco e de células de cloreto. Apesar das diferenças estruturais, as alterações histológicas causadas pela exposição crônica ao formaldeído em concentrações subletais foi semelhante em ambos os organismos e recomendamos a revisão de sua utilização no tratamento e profilaxia de organismos aquáticos.

Palavras-chave: Anuros; osteíctes; formol; arcos branquiais; danos histológicos

INTRODUÇÃO

As principais ameaças ao ecossistema aquático são as fontes de poluição, a perda de biodiversidade e a destruição do habitat (Linde-Arias *et al.*, 2008). O ecossistema aquático é considerado o meio mais suscetível à poluição, devido a fontes naturais ou em decorrência da atividade humana tais como, descarga de efluentes domésticos, indústrias e de agricultura, que podem ocorrer de forma intencional ou acidental (Zagatto e Bertoletti, 2008).

Essas alterações no ambiente aquático afetam diretamente a saúde dos peixes e anfíbios e até pequenas mudanças são suficientes para desencadear estímulos estressantes em animais (Randall e Tsui, 2002; Pereira e Mercante, 2005).

A espécie *Danio rerio* comumente chamada de peixe-zebra é um pequeno peixe tropical de água doce, de origem asiática que há muito tempo vem sendo utilizado como ornamental. Por possuir grande tolerância a variações ambientais e ter facilidade de se reproduzir em cativeiro, demonstrou ser um bom organismo para estudos científicos (Spitsbergen e Kent, 2003). Esse peixe suporta variações de temperatura, pH e dureza da água e também demonstra ótima sensibilidade a elevado número de substâncias (Knie e Lopes, 2004). Em 2001 o Instituto Senger iniciou o sequenciamento do genoma do peixe-zebra e constatou que essa espécie apresenta genoma com alto grau de similaridade com os genomas de humanos e de camundongos (Barbazuk *et al.*, 2000). Por esses motivos essa espécie é utilizada mundialmente como modelo toxicológico (Teraoka *et al.*, 2003). A espécie *Lithobates catesbeianus* conhecida como rã-touro é nativa do nordeste da América do Norte. Trata-se de uma espécie robusta e resistente quando comparada a outros anuros, prolífica e disseminada mundialmente (Frost, 2016). Por estas características e por sua fácil aquisição e manutenção em laboratório é também considerada um excelente modelo experimental sendo utilizada em testes ecotoxicológicos (Santana *et al.*, 2015). Acrescente-se a isto, o fato de que aproximadamente 70% das espécies de anuros possuem ciclo de vida vinculado a ambientes aquáticos, fato que os torna bons indicadores da qualidade da água (França *et al.*, 2015).

O princípio dos 3 R's da experimentação animal proposto por Russel e Burch (1959) recomenda "*replace*", que se traduz por substituir os animais

sencientes, ou seja capazes de experimentar a dor; “*reduction*”, que significa reduzir o número de animais usados, sem prejudicar a confiabilidade dos resultados; e, “*refinement*” que quer dizer refinamento, ou seja, a diminuição da incidência ou severidade de procedimentos aplicados (CONCEA, 2014). Corroborando esta linha de pensamento temos a Norma NBR ABNT 15088 (2016) sobre ecotoxicologia aquática (método de ensaio com peixes) que recomenda a utilização cada vez menor de organismos de alta complexidade em testes de toxicologia aquática. Neste sentido, os ensaios com de *D. rerio* e *L. catesbeianus* são considerados uma alternativa de vanguarda e cada vez mais utilizados em substituição aos testes realizados com mamíferos.

Nos cultivos de organismos aquáticos alguns químicos e produtos profiláticos são utilizados para manter a sanidade dos plantéis (Noga, 2010). Dentre estes o formol ou formaldeído (H_2CO) é indicado pela US Food and Drug Administration (FDA) no tratamento de doenças fúngicas, bacterianas e parasitárias, mesmo sendo um agente químico considerado carcinogênico pela International Agency for Research on Cancer (IARC). O formaldeído é um gás incolor com odor irritante e um dos aldeídos mais comuns e abundantes no ambiente. É utilizado na produção de resinas e mobílias e também como produto desinfetante e preservante (ECOTOX, 2006). Entretanto, existem evidências de que este produto possa ser agressivo as brânquias de peixes e anfíbios (Bueno-Guimarães *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2014). Nestes animais as brânquias possuem várias funções sendo muito importantes para a realização das trocas gasosas, processos de osmorregulação, equilíbrio acidobásico e excreção de compostos nitrogenados (Machado e Fanta, 2003; Evans *et al.*, 2006). As brânquias podem ser assim uma excelente ferramenta biomarcadora de danos ambientais e indicadoras de qualidade da água (Machado, 1999).

O objetivo desse estudo foi identificar os principais efeitos causados pelo formaldeído às brânquias de dois modelos experimentais utilizados em ecotoxicologia: peixe-zebra (*Danio rerio*) e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), verificando a susceptibilidade de ambas as espécies a este químico.

MATERIAL E METODOS

O trabalho foi realizado no Instituto de Pesca, São Paulo, Brasil e autorizado pelo Comitê de Ética desta instituição sob o número 1535. Para os experimentos foram utilizadas duas espécies de organismos aquáticos: peixe-zebra (*D. rerio*) e girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) (estágios 31 a 36 de Gosner, 1960). Os testes foram divididos em duas etapas, sendo que na primeira foi realizado o teste agudo e na segunda o crônico. Ambos os experimentos seguiram o mesmo protocolo adaptado às peculiaridades de cada espécie.

As normas técnicas para condução dos ensaios seguiram as recomendações de acordo com protocolos pré-estabelecidos (APHA, 2005; ABNT, 2016; ASTM, 2014). A solução estoque de formaldeído (Synt®) na concentração de 100 g/L foi preparada no dia de cada intoxicação, em balão de 500mL, sendo 125mL de formaldeído e 375mL de água destilada.

Durante os experimentos os animais mortos eram contabilizados, retirados diariamente dos aquários e descartados. Ao final, todos os animais sobreviventes foram anestesiados com eugenol (7mL/L) e eutanasiados por anestesia profunda, para remoção das brânquias que foram conservadas em formalina a 10 % tamponada. Posteriormente, no Laboratório Interinstitucional de Sanidade na Aquicultura (LISA) do Instituto Biológico de São Paulo, as amostras foram desidratadas, diafanizadas, incluídas em bloco de parafina, cortadas em fragmentos com espessura de 4,5 µm e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para confecção de lâminas histológicas.

Ensaio com peixe-zebra (*Danio rerio*)

Os experimentos de toxicidade aguda e crônica com peixe *D. rerio* foram realizados pelo MSc. André Sangineto Resendes (Resendes, 2017) durante sua dissertação de Mestrado no Instituto de Pesca de São Paulo. A Concentração Letal Mediana 96h (CL_{50-96h}) para o formaldeído obtida neste estudo foi de 45,73 mg/L e as concentrações crônicas de exposição foram: CL_{50-96h/100} – 0,45 mg/L; CL_{50-96h/10} – 4,57 mg/L e CL_{50-96h/2} – 22,86 mg/L.

As 96h de experimentação e ao final do experimento, dois peixes de cada tratamento foram sacrificados por anestesia profunda para retirada das

brânquias que foram conservadas em formalina tamponada a 10%, e analisadas no presente estudo (n=32).

Ensaio com girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

Ensaio Agudo

Após testes preliminares, o teste de toxicidade aguda teve a duração de 96h, com delineamento experimental inteiramente casualizado, em sistema semi-estático (24h), com seis tratamentos e quatro réplicas. Os tratamentos foram: 4, 8, 12, 16, e 20 mg/L de formaldeído mais o grupo controle (sem adição do produto). Os aquários foram preenchidos com água de abastecimento público declorada por pernoite com aeração.

A análise das variáveis de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH) foram feitas utilizando o oxímetro AK87 Akso® e o equipamentos HI98129®. No início do experimento os girinos foram pesados e não foram alimentados durante a exposição ao agente químico. Foi utilizada a densidade de 1 girino por litro, totalizando 8 girinos por aquário, como mostra a Figura 1.

Para verificar as possíveis diferenças significativas entre as variáveis físicas e químicas da água utilizou-se a análise de variância de um fator ($p < 0,05$) (Zar, 1999). A Concentração Letal Mediana foi estimada através Software Gwbasis 3.0 de acordo com o método estatístico “Trimmed Spearman Karber” (Hamilton *et al.*, 1977).



FIGURA 1: Sequência de aquários com girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos ao teste de toxicidade aguda (96h) com formaldeído (H₂CO)

Ensaio Crônico

O ensaio foi semi-estático, com renovação das soluções após 96h, e o período de exposição foi de 192h. O delineamento experimental teve quatro tratamentos com quatro réplicas simultâneas, a saber: CL_{50-96h}/2, CL_{50-96h}/10, CL_{50-96h}/100, além do controle (sem adição do produto).

Foram distribuídos aleatoriamente 16 aquários sob as bancadas, contendo 12 L de água, sendo 1 girino/L, com aeração constante, com um total de 192 girinos.

Os parâmetros da qualidade da água (pH, temperatura e oxigênio dissolvido, Dureza e Amônia Total) foram avaliados antes e após a renovação. Os girinos foram pesados antes do início do ensaio e alimentados com ração triturada Laguna (Socil® 40% PB) de dois em dois dias, na proporção de 0,5% da biomassa do aquário.

As 96h de experimentação e ao final do experimento dois girinos de cada tratamento foram sacrificados por anestesia profunda para retirada das brânquias que foram conservadas em formalina tamponada a 10% (n=32).

Análises histopatológicas

As análises histopatológicas das brânquias foram realizadas seguindo protocolo padrão para esta técnica no Laboratório Interinstitucional de Sanidade na Aquicultura (LISA) do Instituto Biológico em São Paulo, Brasil.

Basicamente as brânquias por serem muito pequenas foram embrulhadas em gases e acondicionadas em caxetas identificadas, desidratadas em uma bateria crescente de álcool (70°C, 80°C, 95°C e absoluto), diafanizadas em xilol, embebidas em parafina e armazenadas em estufa por 18h a 52° C. Após esse período foram emblocadas em parafina e submetidas a cortes de 4,5 µm de espessura com auxílio do micrótomo Hyrax Zeiss®. Os cortes foram colocados em lâminas com gel, para melhor fixação e desparafinizadas em bateria de xilol e álcool para posterior coloração com Hematoxilina e Eosina. A última bateria foi imersa em álcool crescente, xilol e cobrindo o fragmento que foi montado em lâmina com Etellan® e lamínula. A observação e registro das imagens foram feitas sob microscópio de luz CARL-Zeiss Axio Scope. a1® e software de captura de imagem ZEN®.

3. RESULTADOS

Ensaio agudo e crônico para girinos *L. catesbeianus*

Os parâmetros físicos e químicos da água mantiveram-se dentro dos valores considerados aceitáveis para a manutenção deste tipo de organismo em ensaios toxicológicos para espécie *L. catesbeianus* (Cribb *et al.*, 2013; Lombardi *et al.*, 2002) permanecendo estáveis durante a realização do teste, sem diferenças estatisticamente significativas entre eles. Os valores médios observados foram: temperatura $22,62^{\circ}\text{C} \pm 0,8$, pH $7,51 \pm 0,1$, condutividade elétrica $121,06 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 9,3$ e, oxigênio dissolvido $7,8 \text{ mg}/\text{L} \pm 0,8$. O peso médio dos girinos utilizados no teste agudo foi de $3,67\text{g} \pm 0,27$.

A Concentração Letal Mediana ($\text{CL}_{50-96\text{h}}$) do formaldeído para girinos de *L. catesbeianus* foi de $9,17\text{mg}/\text{L}$. A Figura 2 mostra a mortalidade acumulada dos animais durante a experimentação.

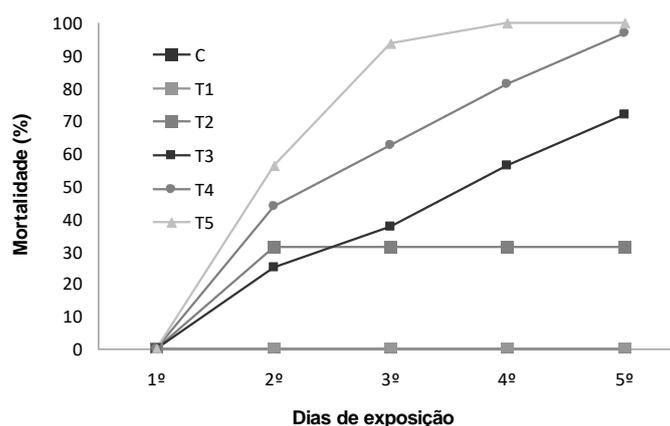


FIGURA 2: Mortalidade acumulada expressa em porcentagem (%) de girinos de *Lithobates catesbeianus*, submetidos às diferentes concentrações de formaldeído ao longo do teste de toxicidade aguda ($\text{CL}_{50-96\text{h}}$). C – Controle (sem adição do produto); T1 - 4 mg/L; T2 - 8 mg/L; T3 - 12 mg/L; T4 – 16 mg/L e T5 - 20 mg/L.

No teste crônico as concentrações de formaldeído utilizadas foram: $\text{CL}_{50/100} = 0,09 \text{ mg}/\text{L}$, $\text{CL}_{50/10} = 0,92 \text{ mg}/\text{L}$ e $\text{CL}_{50/2} = 4,58 \text{ mg}/\text{L}$. Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água foram: pH $7,05 \pm 0,16$, oxigênio dissolvido $7,03\text{mg}/\text{L} \pm 1,13$, temperatura $24,5^{\circ}\text{C} \pm 0,56$. Amônia total (NH_4)

2,7mg/L±0,7, Dureza 1,19°dH ±0,29. O peso médio dos animais foi de 3,38g ± 0,39. Não houve mortalidade durante o teste crônico.

Análises histopatológicas

As brânquias de *D. rerio* apresentam a formação padrão dos peixes teleósteos, ou seja, são externas com quatro delicados pares de arcos branquiais, com rastros pequenos localizados na curvatura interna do arco, e numerosos filamentos que possuem um eixo de cartilagem hialina revestidos por epitélio branquial pavimentoso multilamelar composto por células mucosas, clorídricas e pilares (Fig. 3).

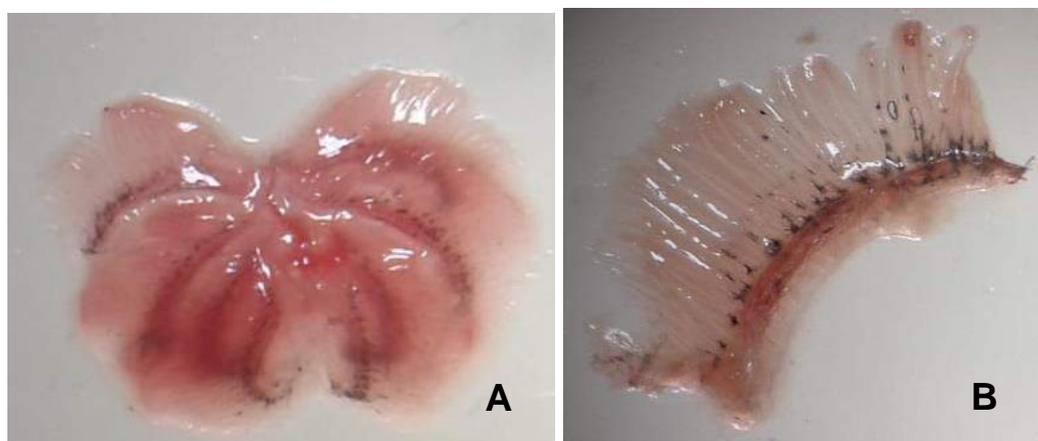


FIGURA 3: Visão macroscópica das brânquias de *Danio rerio*. A - Quatro pares de arcos branquiais (Nikon SMZ 745T – aumento de 2X). B – Detalhe de um arco branquial (Nikon SMZ 745T – aumento de 5X).

Em *L. catesbeianus* as brânquias são formadas por quatro pares de arcos branquiais internos que sustentam os filamentos branquiais. Estes filamentos possuem ramificações secundárias e são projeções semelhantes a dedos que contêm canais de sangue responsáveis pelas trocas gasosas. Eles estão envolvidos em muito muco (Bueno-Guimarães *et al.*, 2001; Burggren and Mwalukoma, 1983). Este padrão estrutural foi ratificado neste estudo (Fig. 4).

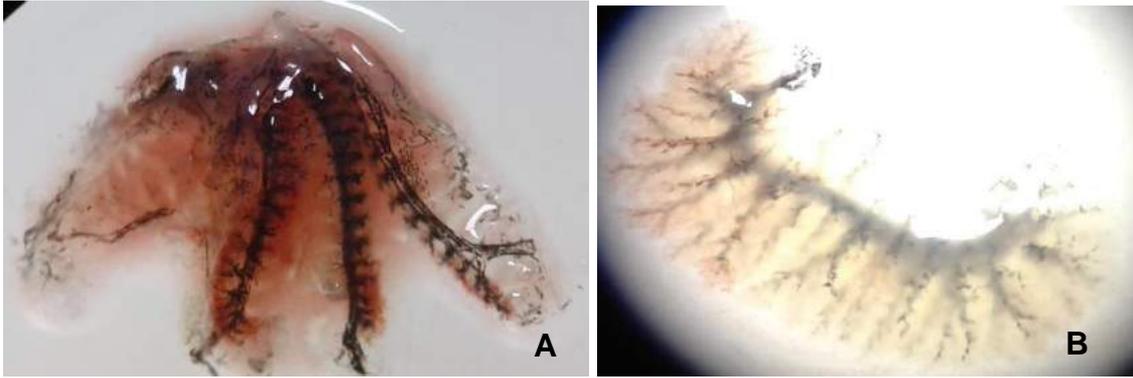


FIGURA 4: Visão macroscópica de brânquias de girinos de *Lithobates catesbeianus* estágio 31 a 36 de Gosner (1960). A – Quatro arcos branquiais (Nikon SMZ 745T – aumento de 2X). B – Detalhe de um arco branquial evidenciando os filamentos com ramificações secundárias (Nikon SMZ 745T – aumento de 5X).

Nos *D. rerio* expostos à concentrações subletais de formaldeído observamos desorganização estrutural do tecido normal com perda e deslocamento de epitélio e ruptura das células epiteliais. Os vasos apresentavam-se dilatados com infiltração de leucócitos no epitélio e congestão vascular. Houve também necrose; fusão lamelar; hipertrofia e hiperplasia de células epiteliais, alta formação de aneurisma lamelar; proliferação de células secretoras de muco e de células de cloreto (Fig. 5).

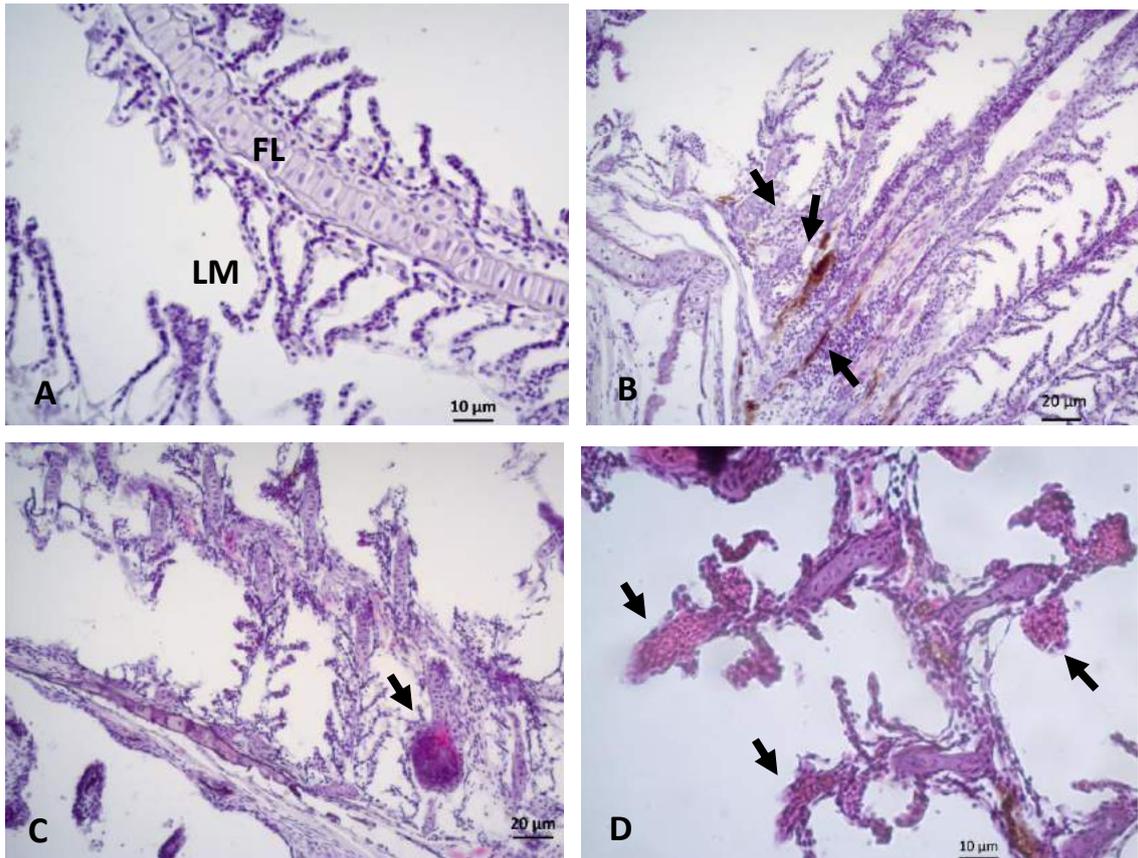


FIGURA 5: Fotomicrografia de brânquias de *Danio rerio* expostos a concentrações subletais de formaldeído evidenciando acentuada desorganização tecidual. **A** – Filamento branquial e lamelas revestidas por epitélio constituído de células pavimentosas (Grupo Controle), FL – Filamento e LM – Lamela, aumento 400x. **B** – Fusão lamelar, hiperplasia, hipertorfia e melanomacrófagos (CL_{50-96h/100} – 0,45 mg/L, 192h exposição), aumento de 200x. **C** – Aneurisma lamelar (CL_{50-96h/10} – 4,57 mg/L, 192h exposição), aumento de 200 x. **D** - Congestão vascular e aneurisma (CL_{50-96h/2} – 22,86 mg/L, 96h exposição), aumento de 400 x. Coloração H&E.

Em girinos de *L. catesbeianus* observamos basicamente as mesmas alterações com menor quantidade de aneurismas. Em muitos arcos branquiais o epitélio lamelar estava associado a edema intersticial pronunciado. Os vasos apresentavam-se altamente congestionados e havia presença de reações inflamatórias monolinfocitárias (Fig. 6).

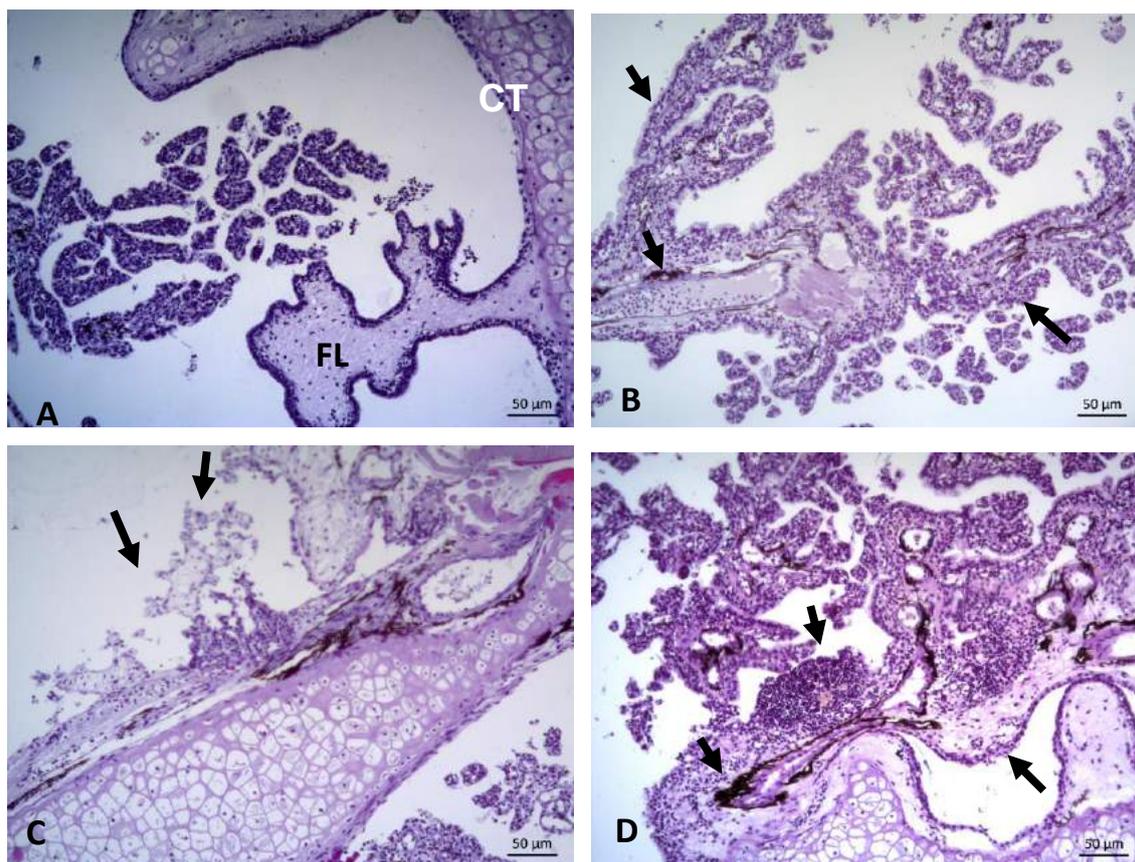


FIGURA 6: Fotomicrografia de brânquias de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos a concentrações subletais de formaldeído evidenciando congestão vascular e desorganização tecidual. **A** - Filamento do arco branquial com ramificações secundárias, FL – Filamento e CT – Cartilagem, aumento 100x. **B** – Seio venoso congestionado, hiperplasia de células epiteliais (CL_{50/100}= 0,09 mg/L, 96h exposição), aumento de 100 x. **C** – Perda do epitélio lamelar (CL_{50-96h/10} – 0,92 mg/L, 96h exposição), aumento de 100 x - **D** – Reação inflamatória, vasos congestionados, necrose celular e melanomacrófagos (CL_{50-96h/2} – 4,58 mg/L, 192h exposição), aumento de 100 x. Coloração H&E.

DISCUSSÃO

Santana *et al.* (2015) trabalhando com *L. catesbeianus* no mesmo estágio de vida obteve CL_{50-96h} do formaldeído de 10,53mg/L, valor muito próximo ao obtido nesta pesquisa. Outros estudos com organismos aquáticos determinaram a CL_{50-96h} para o formaldeído reportando os seguintes resultados: Durezza (1994) reporta a concentração de 148mg/L para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Hohreiter e Rigg (2001) determinaram 48,8mg/L

para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e 21,78mg/L para bagre-americano (*Ictalurus punctatus*) e, Resendes (2017) que obteve 45,73 mg/L para *Danio rerio*, indicando que a rã-touro é uma espécie bastante sensível ao formol se comparada com a maioria dos peixes.

Várias concentrações de formaldeído têm sido testadas acerca da eficácia quimioterápica e seus possíveis efeitos nocivos no tratamento de animais aquáticos, entretanto, a grande maioria evidencia hiperplasia das células brânquiais, danos genotóxicos e mortalidade dos animais, indicando a toxicidade deste produto químico (Martins, 2004; Santana *et al.*, 2015; Resendes, 2017). O epitélio branquial é uma das principais superfícies de contato com o ambiente e constitui-se em uma das primeiras linhas de defesa dos organismos, e conseqüentemente, em um dos primeiros órgãos a serem afetados. Nos peixes a estrutura branquial é muito semelhante entre as diferentes espécies. Em anfíbios existe considerável diversidade entre os anuros na estrutura e tipos de seus anexos branquiais. A estrutura do aparelho branquial larval destes animais está intimamente associada aos mecanismos de bombeamento e alimentação bucal que sofrem profundas modificações para formar o aparato hióide adulto, que sustenta as estruturas laríngeas e serve como base para a língua (Bandara *et al.*, 2012).

As reações mais comuns em resposta à exposição aos agentes químicos são o aumento celular e aumento na produção de muco (Wong e Wong, 2000). Neste estudo, para ambas as espécies as principais alterações histopatológicas variaram conforme a concentração de formaldeído aumentava, ou seja, a severidade das lesões aumentou com o aumento das concentrações de formol e o tempo de exposição. Comparativamente observamos maior tolerância ao formaldeído pelos organismos de *D. rerio*. A mais alta concentração a qual os girinos foram expostos equivale a uma concentração intermediária de exposição destes peixes, mas independente da tolerância as lesões estavam presentes. Áreas edematosas intersticiais, descamação epitelial, hiperplasia e hipertrofia epitelial e fusão de lamelas em alguns animais são lesões sugestivas de mecanismos de defesa, por diminuírem a área de superfície vulnerável da brânquia ou a barreira de difusão do produto químico (Karlsson-Norrgrén *et al.*, 1985; Erkmen e Kolankaya, 2000). Essas respostas dificultam o acesso do agente tóxico ao sangue prejudicando, contudo, a

realização de trocas gasosas (McDonald e Wood, 1993). Por sua vez, as dificuldades respiratórias podem ser responsáveis pela indução da vasodilatação. Estudos realizados por Bueno-Guimarães *et al.* (2001), Pahor-Filho *et al.* (2015) e Ramos *et al.* (2014) comprovam isto. O que evidenciamos no presente trabalho é uma intensa reação de defesa dos organismos expostos para sobreviver e sanar as lesões causadas pelo agente químico.

O formol é um composto ubíquo classificado como cancerígeno para humanos, tumorogênico e teratogênico por produzir efeitos na reprodução (IARC, 2014), mas mesmo assim é indicado no tratamento parasitário e controle fúngico de organismos aquáticos (Noga, 2010). Segundo Martins (2004), o formaldeído 37% pode ser utilizado na forma de banho de curta e longa duração (até 60 min) na concentração de 55,5 mg/L a 92,5 mg/L e em banhos de longa duração (24h) na concentração de 3,7 mg/L a 5,55 mg/L. Porém, Paixão *et al.* (2013) trabalhando com essas concentrações com a espécie de peixe *Hemigrammus* (um caracádeo muito utilizado em aquários) com banhos com formol durante 60 minutos tiveram 100 % de mortalidade. Os autores sugerem que isto possa ter acontecido pelo fato dos peixes selvagens serem mais susceptíveis ao estresse e menos rústicos do que os de cultivo. Dessa forma cuidados maiores devem ser realizados na estocagem e no tratamento de peixes nativos selvagens para exportação, pois, a resposta ao estresse se torna mais acentuada e a adaptação a nova condição pode ser comprometida. Martins (2004), afirma que o formol, que veio substituir o verde malaquita no tratamento contra parasitos e fungos, tem merecido destaque pela eficácia, se aplicado corretamente. Segundo Cruz *et al.* (2005) testes preliminares são essenciais ao tratamento definitivo com o formaldeído devido sua toxicidade. O dano das brânquias devido a agentes tóxicos causa uma cadeia de eventos destrutivos, o que pode levar a problemas respiratórios (Magare e Patil, 2000).

Constamos no presente estudo que o formaldeído causou lesões as brânquias, tanto de *D. rerio* que é mais tolerante a este produto, quanto a girinos de *L. catesbeianus*. Apesar das diferenças estruturais as alterações histológicas em ambos os organismos foram semelhantes e sugerimos assim, a revisão das recomendações de sua utilização no tratamento e profilaxia de organismos aquáticos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), ao laboratório de Aquicultura do Pólo Regional do Vale do Paraíba pela cessão das instalações, e o auxílio das pesquisadoras Letizia Maria Petesse, Luara Cassiano, Maria Julia Amâncio, Alcindo Gomes Pereira Júnior, Tainá Martins de Carvalho, Adriana S. Marcantonio e Danielle de Carla Dias pelo auxílio nas análises estatísticas, histológicas e na condução do experimento.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesse ou interesse financeiro com a publicação deste artigo.

4. REFERÊNCIAS – BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2016). NBR 15088, *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda. Método de ensaio com peixes*. São Paulo, p.19.
- APHA; AWWA; WPCF. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20^a. ed., Washington DC.
- ASTM - American Society For Testing And Materials. (2014). *Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates and amphibians*. West Conshohocken, PA, 218-238p.
- Bandara, M. G. D. K., Wijesinghe, M. R., Ratnasooriya, W. D., Priyani, A. A. H. (2012). Chlorpyrifos-induced histopathological alterations in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) tadpoles: evidence from empirical trials. *Journal of Tropical Forestry and Environment*, 2, 27-36. doi:10.31357/jtfe.v2i2.592
- Barbazuk, W. B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J. A., Mcpherson, J. D., & Johnson, S. L. (2000). The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research*, 10, 1351-1358. doi:10.1101/gr.144700
- Bueno-Guimarães, H. M., Ferreira, C. M., Garcia, M. L. B., & Saldiva, P. H. N. (2001). Tadpole epithelium test: potential use of *Rana catesbeiana*

- histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 67, 202-209. doi:10.1007/s001280111
- Burggren, W., & Mwalukoma, A. (1983). Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*). I. Morphological responses of lungs, skin and gills. *Journal of Experimental Biology*, 105, 191-203.
- CONCEA (2014). Resolução Normativa nº 17. Dispõe sobre o reconhecimento no país de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: agosto de 2018.
- Cribb, A. Y., Afonso, A. M., & Mostério, C. (2013). *Manual técnico de ranicultura*. Embrapa, Brasília, 73.
- Cruz, C.; Fujimoto, R.Y.; Luz, R.K.; Portella, M.C.; Martins, M.L. (2005). Toxicidade aguda e histopatologia do fígado de larvas de trairão *Hoplias lacerdae* expostas à solução aquosa de formaldeído a 10%. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 15: 21-28.
- Dureza, L. A. (1994). Toxicity of formalin and potassium permanganate to *Oreochromis niloticus* fry and fingerlings and subsequent gill pathology. *UP Research Digest*, 2, 357-358.
- ECOTOX Data Base. (2006). Available in: <<https://cfpub.epa.gov/ecotox>>. Access in may 2018.
- Erkmen, B., & Kolankaya, D. (2000). Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kızılırmak River, Turkey. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 64, 418-425. doi:10.1007/s001280000017
- Evans, J. J., Klesius, P. H., & Shoemaker, C. A. (2006). Therapeutic and prophylactic immunization against *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture Research*, 37, 742-750. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01487.x
- França, F. M., Brazil De Paiva, T. C., Marcantônio, A. S., Teixeira, P. C., & Ferreira, C. M. (2015). Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment

- of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50, 406-410. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1011950>
- Frost, D.R. (2016). *Amphibian Species of the World*. American Museum of Natural History. New York. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.html>> Acesso em: maio 2018.
- Gosner K. L. (1960). A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16, 183-190.
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11, 714-719. doi: 10.1021/es60130a004.
- Hohreiter, D. W., & Rigg, D. K. (2001). Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere*, 45, 471-486. doi:10.1016/S0045-6535(01)00061-3
- IARC - International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. (2014) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 88, 483. Disponível em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/index.php>. Acesso em maio 2018.
- Karlsson-Norrgren, L., Runn, P., Haux, C., & Förlin, L. (1985). Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton–Buchanan), and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 27, 81-95. doi:10.1111/j.1095-8649.1985.tb04011.x
- Knie, J. L., & Lopes, E. W. (2004). *Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações*. FATMA/GTZ.
- Linde-Arias, A. R., Inácio, A. F., de Albuquerque, C., Freire, M. M., & Moreira, J. C. (2008). Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the Total Environment*, 399, 186-192. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.028
- Lombardi, J. V., Perpetuo, T. R., Ferreira, C. M., Machado-Neto, J. G., & Marques, H. L. A. (2002). Acute toxicity of the fungicide copper oxychloride

- to tadpoles of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 69, 415-420. doi:10.1007/s00128-002-0078-6
- Machado, M. R. (1999). Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *Ciências Biológicas e da Saúde*, 1, 63-76. doi:10.17921/2447-8938.1999v1n1p%25p
- Machado, M. R., & Fanta, E. (2003). Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46, 361-372. doi:10.1590/S1516-89132003000300008
- Magare, S.R., & Patil, H.T. (2000). Effect of pesticides on oxygen consumption, red blood cell count and metabolites of a fish, *Puntius ticto*. *Environmental Ecology*, 891-894.
- Martins, M. L. (2004). Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira, In: Ranzani-Paiva, M. J., Takemoto, R. M., & Lizama, M. A. P (eds.). *Sanidade de Organismos Aquáticos*. (pp. 355-368), São Paulo: Editora Varela.
- McDonald, D. G., & Wood, C. M. (1993). Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In *Fish ecophysiology* (pp. 297-321). Springer, Dordrecht.
- Noga, E. J. (2010). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Iowa: Wiley-Blackwell. 378.
- Pahor-Filho, E., Miranda Filho, K. C., Klosterhoff, M., Romano, L. A., & Pereira Júnior, J. (2015). Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes). *Aquaculture research*, 46, 3040-3045.
- Paixão, L.F; Santos, R.F.B., Ramos, F.M., & Fujimoto, R.Y. (2013). Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus* sp. (*Osteichthyes: Characidae*). *Acta Amazonica*, 43, 211-216.
- Pereira, L. P. F., & Mercante, C. T. J. (2005). A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. *Boletim do Instituto de Pesca*, 31, 81-88.
- Ramos, T., Romano, L. A., & Pereira JR, J. (2014). Evolução histopatológica em brânquias de tainhas *Mugil liza* expostas à banhos terapêuticos com

- formalina. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 7, 45-59. doi:10.18817/repesca.v7i1.1064
- Randall, D. J., & Tsui, T. K. N. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Marine pollution bulletin*, 45, 17-23. doi:10.1016/S0025-326X(02)00227-8
- Resendes, A. S. (2017). *Efeito tóxico agudo e genotóxico causado pela formalina em Danio rerio (peixe-zebra): avaliação de concentrações seguras para uso profilático na aquicultura*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesca, São Paulo.
- Russel, W.M.S., & Burch, R.L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London, Johns Hopkins University, Baltimore
- Santana, J. M., Dos Reis, A., Teixeira, P. C., Ferreira, F. C., & Ferreira, C. M. (2015). Median lethal concentration of formaldehyde and its genotoxic potential in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50, 896-900. doi:10.1080/03601234.2015.1067095
- Santos, E.F; Tavares-Dias, M; Pinheiro, D.A; Neves, L.R; Marinho, R.G.B; Dias, M.K.R. (2013). Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. *Acta amazonica*, 43, 105 - 112
- Spitsbergen, J. M., Kent, M. L. (2003). The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations. *Toxicol Pathology*, 31 (Suppl.): 62–87. doi:10.1080/01926230390174959
- Teraoka, H., Dong, W., Tsujimoto, Y., Iwasa, H., Endoh, D., Ueno, N., Stegeman, J. J., Peterson, R. E., & Hiraga, T. (2003). Induction of cytochrome P450 1A is required for circulation failure and edema by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304, 223-228. doi:10.1016/S0006-291X(03)00576-X
- Wong, C. K., & Wong, M. H. (2000). Morphological and biochemical changes in the gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, 48, 517-527. doi:10.1016/S0166-445X(99)00060-0

Zagatto, P. A., & Bertoletti, E. (2008). *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. 2ª Ed. Sao Carlos: Rima. 486.

Zar J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey. Prentice. p. 946.

ANEXOS

ANEXO 1 – Solução Padrão de formaldeído PA 37% (Synt®)

Concentração de 100g/L formol (10%)

Volume de 100 mL- 25 ml formol- 75 ml água

ANEXO 2 – Cálculo utilizado nas preparações das soluções:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Onde:

C1= Concentração inicial (solução estoque);

V1= Volume a ser pipetado da solução estoque;

C2= Concentração final (aquela que se pretende preparar);

V2= Volume final da solução que se deseja preparar

Definitivo teste agudo- 18/09/2017

96 horas

Concentrações usadas- Formol

(T1) $C1.V1 = C2.V2$

$$100.V1 = 0,004. 8000$$

$$V1 = 32/100 = 0,32 \text{ mL ou } 320 \mu\text{L}$$

(T2) $C1.V1 = C2.V2$

$$100.V1 = 0,008. 8000$$

$$V1 = 64/100 = 0,64 \text{ mL ou } 6400 \mu\text{L}$$

(T3) $C1.V1 = C2.V2$

$$100.V1 = 0,012. 8000$$

$$V1 = 96/100 = 0,96 \text{ mL ou } 960\mu\text{L}$$

(T4) $C1.V1 = C2.V2$

$$100.V1 = 0,016. 8000$$

$$V1 = 128/100 = 1,28 \text{ mL ou } 1280\mu\text{L}$$

$$(T5) C1.V1 = C2.V2$$

$$100.V1 = 0,02. 8000$$

$$V1 = 160/100 = 1,6 \text{ mL ou } 1600\mu\text{L}$$

Teste Crônico - 08/03/2018

192 horas

Concentrações usadas- Formol

$$CL_{50}/2 = 9,17/2 = 4,58 \text{ mg/L}$$

$$CL_{50}/10 = 9,17/10 = 0,92 \text{ mg/L}$$

$$CL_{50}/100 = 9,17/100 = 0,09 \text{ mg/L}$$

ANEXO 3 – Histologia

1º BATERIA

REAGENTES	TEMPO
ALCOOL 70 I	15 minutos
ALCOOL 80 I	15 minutos
ALCOOL 80 II	15 minutos
ALCOOL 95 I	15 minutos
ALCOOL 95 II	15 minutos
ALCOOL ABSOLUTO I	10 minutos
ALCOOL ABSOLUTO II	10 minutos
ALCOOL ABSOLUTO III	10 minutos

XILOL I	10 minutos
XILOL II	10 minutos
XILOL III	10 minutos

OBS: Deixar as brânquias embebidas em parafina e armazenadas em estufa por 18h a 52°C. (overnight).

2º BATERIA

REAGENTES	TEMPO
XILOL I	10 minutos
XILOL II	10 minutos
XILOL III	10 minutos
ALCOOL ABSOLUTO I	5 minutos
ALCOOL ABSOLUTO II	5 minutos
ALCOOL ABSOLUTO III	5 minutos
ALCOOL 95 I	5 minutos
ALCOOL 95 II	5 minutos
ALCOOL 80 I	5 minutos
ALCOOL 80 II	5 minutos
ALCOOL 70 I	5 minutos

REAGENTES	TEMPO
LAVAR EM ÁGUA CORRENTE	Poe e tira
CORAR COM HEMATOXILINA	1 minuto
LAVAR EM ÁGUA CORRENTE	Poe e tira

DIFERENCIAR	Poe e tira
LAVAR EM ÁGUA CORRENTE	Poe e tira
CORAR COM EOSINA	5 minutos
LAVAR EM ÁGUA CORRENTE	Poe e tira

3º BATERIA

REAGENTES	TEMPO
ALCOOL 70 I	Poe e tira
ALCOOL 80 I	Poe e tira
ALCOOL 80 II	Poe e tira
ALCOOL 95 I	Poe e tira
ALCOOL 95 II	Poe e tira
ALCOOL ABSOLUTO I	Poe e tira
ALCOOL ABSOLUTO II	Poe e tira
ALCOOL ABSOLUTO III	Poe e tira
XILOL I	Poe e tira
XILOL II	Poe e tira
XILOL III	Poe e tira

OBS: COLOCAR A LAMÍNULA COM ETELLAN.

DEIXAR SECAR ATÉ O DIA SEGUINTE.

ANEXO 4 – Figuras ilustrativas



FIGURA 1: A-Preparação da solução padrão. B- Testes preliminares, para obtenção da (CL_{50-96h}). Laboratório do Polo APTA - Vale do Paraíba.



FIGURA 2: A-Testes agudos, para obtenção da (CL_{50-96h}) do formaldeído em sala aclimatiza. Laboratório do Polo APTA - Vale do Paraíba.



FIGURA 3: A- Mortes de girinos da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) submetidos as concentrações de formaldeído. B- Coleta de girinos mortos, para descarte. Laboratório do Polo APTA - Vale do Paraíba.



FIGURA 4: **A-** Aquários utilizados no teste de toxicidade crônica contendo. **B-** Análise das variáveis de qualidade. Laboratório Multiusuário do Instituto de Pesca. São Paulo. SP.



FIGURA 5: Reagentes utilizados para desidratar as brânquias. Bateria crescente de álcool (70°C, 80°C, 95°C e absoluto), e diafanização em xilol. Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura (LISA) do Instituto Biológico em São Paulo, Brasil.

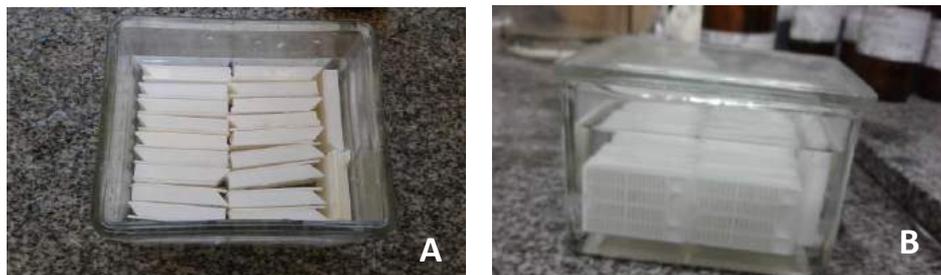


FIGURA 6: **A-** Brânquias embrulhadas em gases e acondicionadas em caixetas identificadas. **B-** Processo de desidratação brânquias. Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura (LISA) do Instituto Biológico em São Paulo, Brasil.



FIGURA 7: Processo de emblocamento em parafina. Laboratório Interinstitucional de Sanidade na Aquicultura (LISA) do Instituto Biológico em São Paulo, Brasil.



FIGURA 8: Corte histológico em micrótomo Hyrax Zeiss® (4,5 µm de espessura). Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura (LISA) do Instituto Biológico em São Paulo, Brasil.



FIGURA 9: **A-** Coloração com Hematoxilina. **B-** Coloração com Eosina. Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura (LISA) do Instituto Biológico em São Paulo, Brasil.