



BIOMARCADORES HEPÁTICOS COMO INDICATIVO DE QUALIDADE AMBIENTAL

Guilherme Henrique Carrasco¹, Lilian Franco-Belussi², Rinneu Elias Borges³, Wadson Rodrigues Rezende⁴, Classius de Oliveira⁵, Lia Raquel de Souza Santos⁶

1- Discente do Curso de Ciências Biológicas - Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde-GO (IF Goiano) – guilhermehcarrasco@gmail.com

2 – Colaboradora da Universidade Estadual Paulista Campus São José do Rio Preto – SP.

3 – Professor Mestre da Universidade de Rio Verde – UniRV, Rio Verde – GO.

4 – Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Estadual Paulista Campus São José do Rio Preto – SP.

5 - Professor Doutor da Universidade Estadual Paulista Campus São José do Rio Preto – SP.

6- Docente e Orientadora do Projeto – IF Goiano/Campus Rio Verde-GO

Introdução

Centros de melanomacrófagos estão localizados em órgãos hematopoiéticos de vertebrados ectotérmicos, e desempenham um papel na destruição, detoxificação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos (PASSANTINO et al. 2014; FRANCO-BELUSSI et al. 2012). Estas células, contendo melanina são observadas no fígado e baço de anuros e possuem ação de proteção. Neste sentido, este projeto avaliou os efeitos de poluentes agrícolas no metabolismo hepático em populações de anfíbios anuros por meio de análises morfológicas do fígado de duas espécies de coletados em ambientes antropizados e preservados, mais especificamente a respeito da quantificação de melanomacrófagos.

Metodologia

Para realização do estudo, foram selecionadas duas espécies de anuros, *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus fuscus* coletadas em dois diferentes ambientes: área preservada no Parque Nacional das Emas e em propriedades agrícolas no município de Rio

Verde, ambas localizados no estado de Goiás. Os espécimes (n=5 cada espécie) foram coletados através de excursões noturnas nos ambientes supracitados.

Os animais foram levados para o Laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde – GO, onde foram eutanasiados por submersão em solução de benzocaina. Fragmentos de fígado foram retirados da cavidade abdominal e fixados em solução metacarn por no mínimo 24 horas, para então serem desidratados por serie alcoólica. Posteriormente os materiais foram incluídos em historesina (Metacrilato glicol) e seccionados em cortes com 2µm, para então serem corados com hematoxilina e eosina (H-E) e montados em lâminas permanentes. Após montadas, as lâminas foram fotografadas; sendo 25 campos histológicos aleatorizados para as análises, as quais se procederam utilizando-se o programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc. (versão 6.0). Para as análises estatísticas os dados discrepantes foram normalizados e em seguida foram aplicados teste One-Way-ANOVA para os dados paramétricos e Kruskal-Wallis ANOVA para os não paramétricos, atribuindo-se 5% de significância.

Resultados

Ambientes antropizados promovem alterações no metabolismo hepático de algumas espécies de anuros. De acordo com as análises, foi detectada diferença estatística na área ocupada pelos melanomacrófagos hepáticos da espécie *Leptodactylus fuscus* ($F=45.4$; $p=1,16e-10$), que vivem em áreas de matriz agrícolas no município de Rio Verde-GO, quando comparado aos animais da mesma espécie coletados em áreas preservadas, Parque Nacional das Emas (Figura 1). Entretanto para a espécie *Dendropsophus minutus* (Figura 2) não houve variação significativa ($F=0,14$; $p=0,708$) para este padrão analisado. A respeito das medias da área ocupada pelos melanomacrófagos, tivemos que para *L. fuscus* foi de 494,02 µm² das espécies coletadas no PNE e de 1115,50 µm² coletadas em Rio Verde; já para *D. minutus* estes valores foram de 1516,11 e 1500,55 µm² respectivamente. Estes valores se tornam claramente evidentes quando analisados a histologia do parênquima hepático das duas espécies de anuros estudadas (Figura 3).

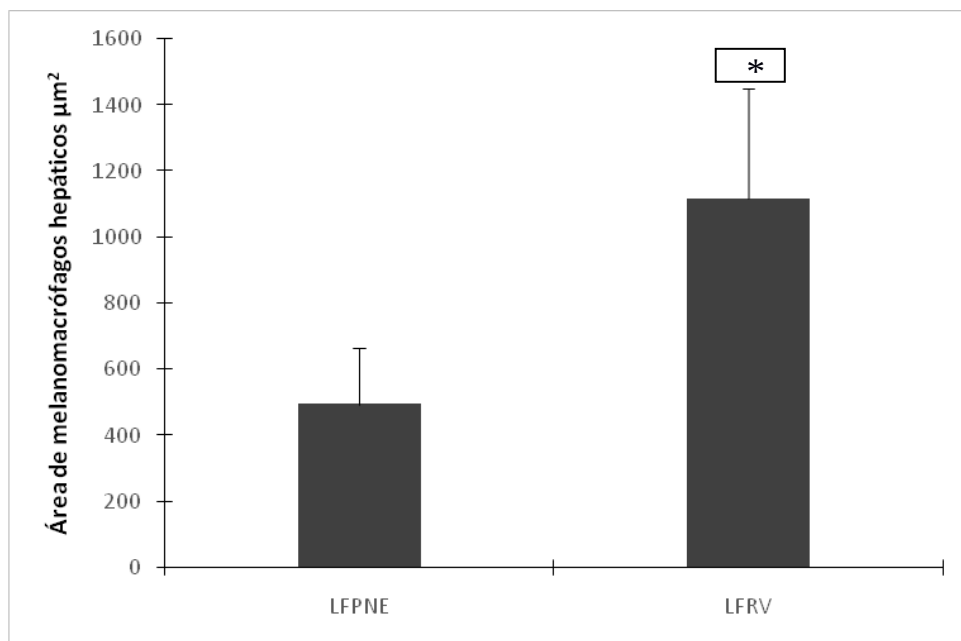


Figura 1: Área de melanomacrófagos hepáticos de *Leptodactylus fuscus* coletados em Rio Verde e no Parque Nacional das Emas e em Rio Verde. Legenda: LFPNE= *Leptodactylus fuscus* do Parque Nacional das Emas; LFRV= *Leptodactylus fuscus* de Rio Verde. * = diferença estatística.

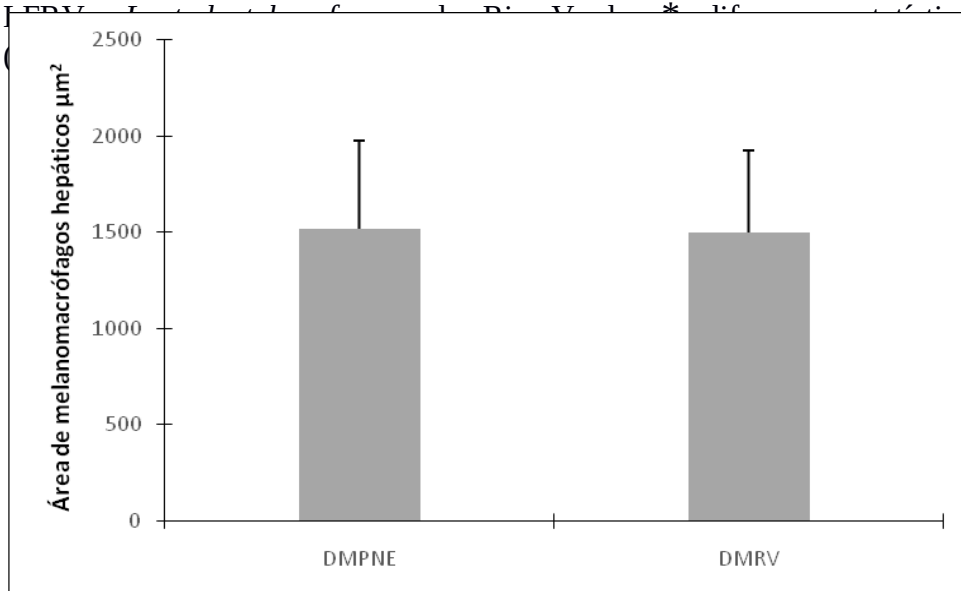


Figura 2: Área de melanomacrófagos hepáticos de *Dendropsophus minutus* coletados em Rio Verde e no Parque Nacional das Emas. Legenda: DMPNE=*Dendropsophus minutus* do Parque Nacional das Emas; DMRV=*Dendropsophus minutus* de Rio Verde. (F=0,14; p=0,708).

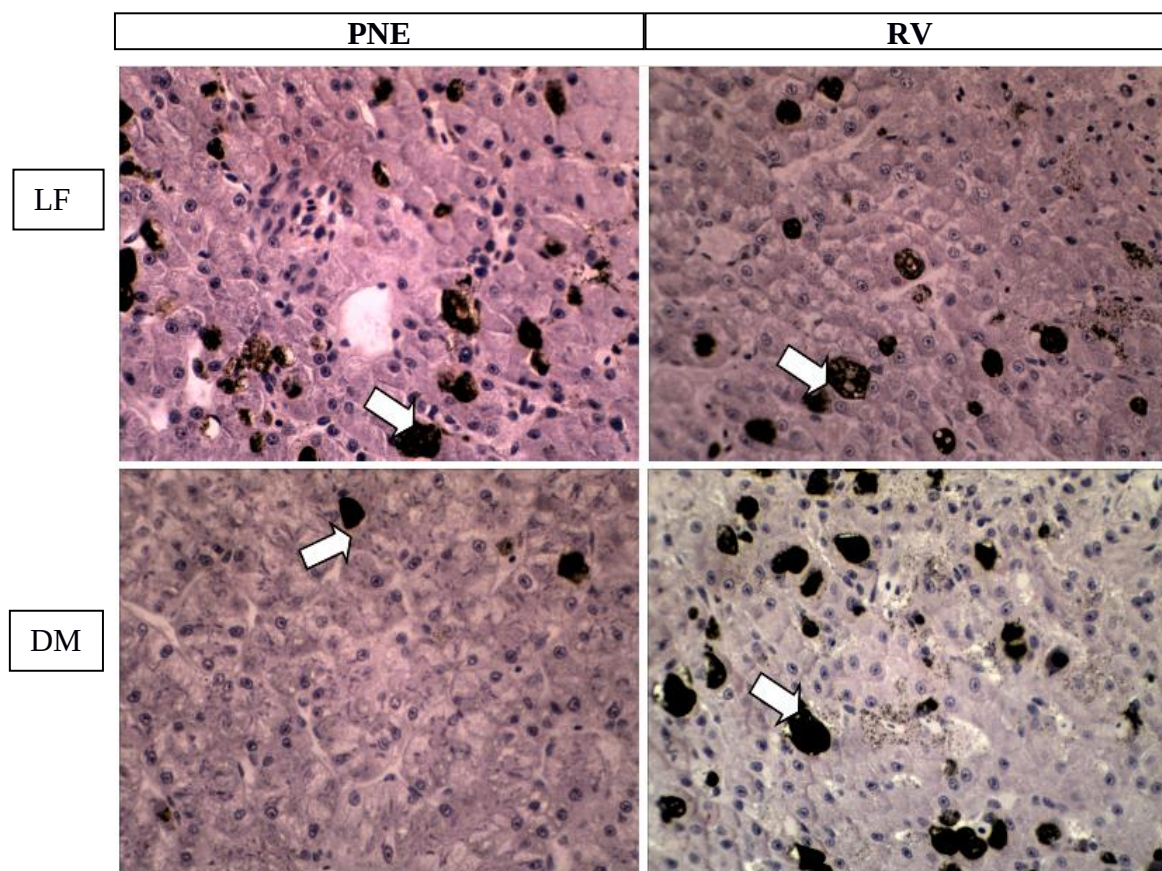


Figura 3: Fotomicrografia do tecido hepático das espécies de anuros estudadas. Seta=melanomacrófagos. É possível observar a grande quantidade de melanomacrófagos (células pigmentadas) no tecido hepático dos animais de *Leptodactylus fuscus* (LF) coletados em Rio Verde (RV) quando comparados com os animais coletados no Parque Nacional das Emas (PNE). Para as espécies de *Dendropsophus minutus* (DM) não detectou-se esta diferenciação. Aumento 20x.

Discussão

O fígado é a maior glândula encontrada nos vertebrados, e é também um órgão muito suscetível a mudanças ambientais, por ser responsável pelos processos de destoxificação (HILDEBRAN; GOSLOW, 2006). Os melanomacrófagos; ou célula de Kupffer (CORSARO et al., 2000); são as células responsáveis pelos processos de destoxificação através de um processo de fagocitose (FRANCO-BELUSSI et al., 2013) e desta forma são considerados excelentes biomarcadores.

A melanina presente nos melanomacrófagos possui função antioxidante, auxiliando a proteger os lipídios das membranas celulares de ataques de radicais livres (GARCIA et al. 1997). Desta forma é esperado que, em ambientes antropizados, tais substâncias apresentem

mais abundantes, se comparadas com indivíduos em regiões naturais. As análises demonstraram, que para *Dendropsophus minutus*, não houve alteração na área ocupada pelos melanomacrófagos nos dois ambientes, enquanto para *L. fuscus* houve um aumento para os animais de Rio Verde, onde há intensa prática agrícola.

Neste sentido sugere-se que os efeitos de agrotóxicos afetam em diferentes níveis animais de diferentes espécies, e a análise de pigmentação hepática pode ser suficiente e indicativo de perturbação ambiental para os anuros e portanto bioindicadores morfológicos da qualidade ambiental. Entretanto, ressaltamos que técnicas histoquímicas para detecção de hemosiderina e lipofuscina, quando realizada em conjunto poderão reforçar os resultados aqui apresentados.

Agradecimentos

A CNPq pela viabilização financeira do projeto (Edital Universal, Processo 477044/2013-1) e concessão de bolsa de iniciação científica na modalidade PIBIC. Ao Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde e a UNESP campus São José do Rio Preto.

Referencias

- CORSARO, C.; SCALIA, M.; LEOTTA, N.; et al.; Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. **Journal of Anatomy**, v. 196; n.2, p 249–261, 2000.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L. R. S.; OLIVEIRA, C.; et al. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7- α -melanocyte stimulating hormone and LPS. **Zoology**, v. 116, n.5, p. 316–332, 2013.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L. R. S.; ZIERI, R.; et al. Liver Anatomy, Histochemistry, and Ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) During the Breeding Season. **Zoological Science**, v. 29, n. 12, p. 844-848, 2012.
- HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. **Análise da Estrutura dos Vertebrados**, 2^a ed; São Paulo: Atheneu, 2006, p. 638.
- GARCIA, J.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M.; et al. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. **FEBS Letters**, v. 408, Issue 3, p. 297-300, 1997.
- PASSANTINO L., SANTAMARIA N., ZUPA R., et al. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. **Journal of Fish Diseases**, v.37, n.3, p. 241-250, 2014.