

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS

NATAN KASPER

**RESPOSTAS HISTOPATOLÓGICAS E GENOTÓXICAS EM PEIXES DE ÁGUA
DOCE EXPOSTOS A AMBIENTES ANTROPIZADOS**

CERRO LARGO – RS

2019

NATAN KASPER

**RESPOSTAS HISTOPATOLÓGICAS E GENOTÓXICAS EM PEIXES DE ÁGUA
DOCE EXPOSTOS A AMBIENTES ANTROPIZADOS**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal Da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

Orientador: Prof^(a). Dr^(a). Suzymeire Baroni

Co-orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Marlei Veiga dos Santos

CERRO LARGO – RS

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Kasper, Natan

Respostas histopatológicas e genotóxicas em peixes de água doce expostos a ambientes antropizados / Natan Kasper. -- 2019.

91 f.:il.

Orientadora: Dr^a Suzymeire Baroni.

Co-orientadora: Dr^a Marlei Veiga dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis-PPGATS, Cerro Largo, RS , 2019.

1. Genotoxicidade . 2. Teste do Micronúcleo. 3. Histopatologia de brânquias e fígado. 4. Xenobióticos . 5. Rio Ijuí. I. Baroni, Suzymeire, orient. II. Santos, Marlei Veiga dos, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

NATAN KASPER

**RESPOSTAS HISTOPATOLÓGICAS E GENOTÓXICAS EM PEIXES DE ÁGUA
DOCE EXPOSTOS A AMBIENTES ANTROPIZADOS**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Área de Concentração: Monitoramento, Controle e Gestão Ambiental

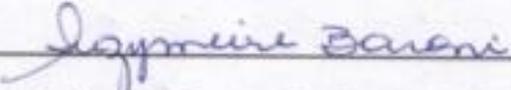
Linha de Pesquisa: Qualidade ambiental

Orientador: Prof(ª). Dr(ª). Suzymeire Baroni

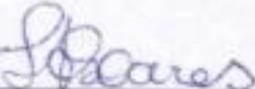
Co-orientador(a): Prof(ª). Dr(ª). Marlei Veiga dos Santos

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: 22/02/2019

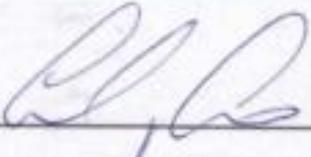
BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Suzymeire Baroni - UFFS



Profª. Drª. Izabel Aparecida Soares – UFFS



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit - UFFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a todos que de alguma forma fizeram parte desta caminhada.

Agradeço a Universidade Federal da Fronteira Sul, por proporcionar ensino público, gratuito e de qualidade, como também, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis desta instituição, junto ao qualificado corpo docente que proporcionaram momentos de aprendizagem, reflexão e formação de um pensamento crítico sobre as ações do homem no meio ambiente. Por nos mostrar, que não somos os únicos seres habitantes deste planeta e, sim parte dele e os únicos com a capacidade e as ferramentas para modifica-lo. Mudança essa, que deve ser nas nossas ações diárias, por menor que seja, só assim trilharemos para um meio ambiente limpo, sustentável e dignamente habitável para todos os seres vivos.

Agradeço aos colegas, hoje amigos, que o mestrado proporcionou nesta trajetória e aos valorosos debates sobre política, sociedade, meio ambiente e etc.

Aos colegas e técnicos de laboratório pela parceria e auxílio no processamento dos materiais.

Em especial, serei eternamente grato a Prof^a. Dr^a. Suzymeire Baroni pela sua dedicação, profissionalismo, orientações e, por me ensinar a caminhar no mundo da pesquisa e da ciência.

Por último, porém o mais significativo, pois considero o alicerce para que todo esse trabalho tenha ocorrido, minha família. Meu irmão pelo auxílio nas coletas de campo, pai, mãe, irmã, tios e avós pelo auxílio e incentivo diário. Em especial, a Paola minha namorada, por me aturar e dar forças durante toda esta jornada.

Eternamente grato a todos!!!

RESUMO

Atividade antrópica pode ser definida como toda a ação humana que gera impacto no meio ambiente. As atividades antrópicas foram potencializadas nas últimas décadas pela demanda econômica e social, aumentando a geração de resíduos através das atividades industriais, agrícolas, pecuária e urbanização desordenada das cidades, acarretando na contaminação dos recursos naturais, principalmente, dos corpos hídricos que são considerados os ecossistemas mais frágeis. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de contaminantes ambientais em áreas antropizadas do Rio Ijuí, por meio das respostas histopatológicas em brânquias e fígados de peixes capturados em cinco pontos do rio, bem como buscou realizar análise genotóxica, utilizando o Teste do Micronúcleo (MN) e Anomalias Nucleares (AN), em eritrócitos periféricos desses organismos. Os resultados obtidos através da análise histopatológica, demonstraram predominância de alterações moderadas em brânquias e severas no fígado, em todos os pontos analisados, revelando a ocorrência de xenobióticos nas águas do Rio Ijuí capaz de induzir lesões comprometedoras em órgãos vitais para os peixes. Para o teste MN, os resultados indicaram que em apenas um dos cinco pontos de coleta avaliado, as frequências de MN em peixes se apresentaram superiores ao esperado; já as frequências de AN foram superiores aos MNs em todos os pontos. Dessa maneira, os testes utilizados nesta pesquisa demonstraram ser parâmetros eficientes para avaliar a presença de poluentes em um corpo hídrico. Além disso, verificou-se que os contaminantes presentes no rio induzem danos metabólicos genéticos e fisiológicos em peixes, dando clara evidência de que a antropização no Rio Ijuí está afetando organismos eucariotos.

Palavras-chave: Micronúcleo. Anomalia Nuclear. Fígado. Brânquia. Rio Ijuí.

ABSTRACT

Anthropic activity can be defined as all human action that impacts the environment. Anthropogenic activities have been potentiated in the last decades by economic and social demand, increasing the production of waste through industrial activities, agriculture, livestock and disorderly urbanization of the cities, resulting in the contamination of natural resources, mainly of water bodies considered as ecosystems more fragile. The present study aimed to evaluate the occurrence of environmental contaminants in anthropic areas of the Ijuí River by means of histopathological responses in gills and fish livers captured in five points of the river, as well as to perform genotoxic analysis using the Micronucleus Test (MN) and Nuclear Abnormalities (AN) in peripheral erythrocytes of these organisms. The results obtained through histopathological analysis showed a predominance of moderate changes in gills and severe changes in the liver in all analyzed points, revealing the occurrence of xenobiotics in the waters of the Ijuí River, capable of inducing compromising lesions in organs vital to fish. For the MN test, the results indicated that in only one of the five collection points evaluated, the MN frequencies in fish presented higher than expected, since the AN frequencies were higher than the MNs at all points. In this way the tests used in this research proved to be efficient parameters to evaluate the presence of pollutants in a water body, in addition, it was verified that the contaminants induce genetic and physiological metabolic damages in fish, giving clear evidence that the anthropization in the Ijuí river is affecting eukaryotic organisms.

Keywords: Micronucleus. Nuclear Abnormalities. Liver. Gill. Ijuí River.

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1 – Estudos realizados no território brasileiro utilizando a histologia como ferramenta de avaliação da contaminação e contaminantes ambientais.....28

Tabela 2 – Classificação das alterações histopatológicas do fígado quanto a severidade das lesões de acordo com Poleksic e Mitrovic-tutundzic (1994) com adaptações.....31

Tabela 3 – Classificação das alterações histopatológicas das brânquias quanto e a severidade das lesões de acordo com Poleksic e Mitrovic-tutundzic (1994) com adaptações.....35

Tabela 4 - Estudos realizados com análise histopatológica de brânquias visando caracterizar os efeitos de substâncias poluidoras em potencial.....35

Capítulo 1: Genotoxicidade em organismos eucariotos de água doce avaliada pelo teste de micronúcleo e anomalias nucleares.

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos parâmetros Físico-Químico das quatro estações sazonais nos cinco pontos de coleta.....44

Tabela 2 - Tabela de Tukey das médias de MN e AN em 50 peixes/estação (3,000 células analisadas por peixe)46

Capítulo 2: Histopatologia em peixes de água doce expostos a ambientes antropizados.

Tabela 1 – Classificação das alterações histopatológicas do fígado e das brânquias quanto a severidade das lesões de acordo com Poleksic e Mitrovic-tutundzic (1994) com adaptações.....62

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos parâmetros Físico-Químico das quatro estações sazonais nos cinco pontos de coleta.....63

Tabela 3 – Tabela dos valores de p gerado pelo teste T entre os pontos de coleta referente as médias do IAH das brânquias e fígado.....65

Tabela 4 – Tabela dos valores de p, gerado pelo do teste t entre as estações nos pontos de coleta referente as médias do IAH das brânquias e do fígado.....66

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1 – Taxa de consumo de agrotóxico por área plantada no Rio Grande do Sul.....	19
Figura 2 – Ilustração da formação de Micronúcleos sob os efeitos de agentes clastogênicos (A) e Aneugênicos (B).....	24
Figura 3 – Esquema da coleta de sangue e as etapas da confecção dos esfregaços..	26
Figura 4 – Alterações morfológicas nucleares: A- blebbed; B – lobbed; C – notched; D - vacuolated.....	27
Figura 5 - Esquema representativo das células brânquiais e as possíveis alterações encontradas em estudos histopatológicos. Brânquia normal (A), lâmina basal (lb), célula mucosa (mu), célula cloreto (cc), célula pilar (pi), célula epitelial (ce), seio venoso lamelar (svl), canal sanguíneo marginal (csm); B, C, D e F, alterações mais encontradas.....	34

Capítulo 1: Genotoxicidade em organismos eucariotos de água doce avaliada pelo teste de micronúcleo e anomalias nucleares.

Figura 1 – Localização dos pontos de coleta do estudo.....	42
Figura 2 – Eritrócito normal em A e eritrócitos micronucleados B, C, D, E observados em objetiva de 100x.....	45
Figura 3 – Eritrócitos dos peixes analisados com anomalias nucleares AN: em A - normal, B e C – blebbed, D e E – lobbed, F – notched, G – vacuolated e H – segmented.....	45
Figura 4 – Frequência (%) de MN e AN em 10 peixes/estação. Sendo A (Primavera) B (Verão) C (Outono) e D (Inverno).....	46
Figura 5 – Diagrama de dispersão da correlação linear de Pearson.....	47
Figura 6 – Frequência média de MN observada nos peixes/pontos coletados.....	47
Figura 7 – Frequência média de AN observada nos peixes/pontos coletados.....	48

Capítulo 2: Histopatologia em peixes de água doce expostos a ambientes antropizados.

Figura 1 – Localização dos pontos de coleta do estudo.....	60
Figura 2 – Variação sazonal de cobre identificado nas brânquias e fígado dos peixes em cada ponto de coleta.....	64
Figura 3 – Média do IAH (Índice de Alteração Histológica) observado em brânquias nas quatro coletas sazonais (10 peixes por coleta)	64
Figura 4 – Média do IAH (Índice de Alteração Histológica) observado nos fígados nas quatro coletas sazonais (10 peixes por coleta)	65
Figura 5 – Brânquia normal (lb – lamela branquial; ef – epitélio filментар; e – eritrócito; ce – célula epitelial; cp – célula pelar; cm – célula mucosa; sm – secreção de muco; cc – célula cloreto).....	67
Figura 6 – Alterações histológicas observadas em brânquias dos peixes do Rio Ijuí. Elevação epitelial – A; proliferação de cc – B; fusão parcial – C; fusão completa – D..	67
Figura 7 – (A) Fígado normal – hepatócito – seta verde; capilar sinusóide – seta azul; célula de kupffer – seta vermelha; eritrócito – seta amarela; veia porta – seta preta; artéria hepática – cabeça da seta.....	68
Figura 8 – Alterações histológicas observadas nos fígados dos peixes do Rio Ijuí (A) vacuolização nuclear – seta e degeneração citoplasmática – cabeçada seta; (B) degeneração nuclear – cabeça da seta e vacuolização citoplasmática – seta; (C) hiperemia – seta; (D) necrose focal – seta e vacuolização citoplasmática – cabeça da seta.....	69
Figura 9 – Visão geral da Porcentagem de peixes e o total de severidades observada nas brânquias e fígado, considerando todo o estudo que envolveram 200 indivíduos.....	70
Figura 10 – Porcentagem de peixes e as severidades observadas por ponto (A – brânquias e B – fígado)	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN – Anomalias nucleares

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância e Inspeção Sanitária

As – Arsênio

CC – Células cloreto

Cd – Cádmio

ce - célula epitelial

CEUA – Conselho de ética do uso de animais

COD – condutividade

CONAMA – Conselho nacional do meio ambiente

Co – Cobalto

csm - canal sanguíneo marginal

Cu – Cobre

DNA – Ácido desoxirribonucleico

e – Eritrócito

EDTA – Ácido etilonodiaminotetracético

Fe – Ferro

HE – Hematoxilina e Eosina

Hg – Mercúrio

IAH – Índice de alterações histopatológicas

Ib - lâmina basal

MN – Micronúcleo

Mn – Manganês

mu - célula mucosa

OD - Oxigênio dissolvido

Pb – Chumbo

pH – potencial hidrogeniônico

pi - célula pilar

SAL - salinidade

SDT - sólidos dissolvidos totais

SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre saneamento

svl - seio venoso lamelar

UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul

Zn – Zinco

°C – temperatura graus Celsius,

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO.....	15
2REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Poluentes aquáticos	17
2.1.1 Contaminação por rejeitos urbanos e industriais.....	17
2.1.2 Contaminação por resíduos agrícolas	18
2.1.3 Contaminação por metais.....	20
2.1.4 Cobre no ambiente aquático	21
2.2 Uso de peixes como biomarcadores de contaminação ambiental.....	22
2.2.1 Teste do Micronúcleo em Peixes	23
2.2.2 Análise histopatológica em peixes	27
3Resultados.....	37
CAPÍTULO 1	38
GENOTOXICIDADE EM ORGANISMOS EUCARIOTOS DE ÁGUA DOCE AVALIADA PELO TESTE DE MICRONÚCLEO E ANOMALIAS NUCLEARES.....	39
1Introdução.....	40
2Material e Métodos	41
2.1 Área de estudo	41
2.2 Caracterização dos pontos e análise dos parâmetros físico-químicos	42
2.3 Processamento e análise dos esfregaços	42
2.4 Análise estatística	43
3Resultados.....	44
4Discussão	48
5Conclusão.....	51
Referências.....	52
CAPÍTULO 2.....	56

HISTOPATOLOGIA EM PEIXES DE ÁGUA DOCE EXPOSTOS A AMBIENTES ANTROPIZADOS	57
1 Introdução.....	58
2 Material e Métodos	59
2.1 Local de estudo e coleta dos peixes	59
2.2 Parâmetros Físico-químicos da água e Determinação de Cu em brânquias fígado.....	61
2.3 Processamento e análise histológica	61
2.4 Análise estatística	63
3 Resultados.....	63
4 Discussão	71
5 Conclusão.....	74
Referências.....	75
Considerações finais.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
Apêndice.....	85

1 INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias químicas sobre os organismos vivos, podendo o estudo ser a campo ou em laboratório. Constitui-se em uma ferramenta auxiliar nas análises de impactos ambientais causados por tais elementos, estimando assim sua toxicidade em relação ao organismo analisado (SILVA et al., 2015).

Tendo em vista a contaminação ambiental, os ambientes aquáticos como rios e lagos tornaram-se nas últimas décadas o campo de estudo da ecotoxicologia, pois são os mais afetados por substâncias das mais diversas origens e composição. Esses ambientes são considerados ricos em sua biodiversidade, porém alguns organismos são frágeis e capazes de responder a sutis alterações na qualidade da água. Desta forma, os estudos deste ramo da ciência são imprescindíveis para o monitoramento desses ambientes (SILVA et al., 2015).

A utilização de organismos biológicos do próprio ambiente para avaliar os níveis de contaminação local, fornecem respostas mais precisas do que só a utilização dos parâmetros convencionais de monitoramento (BUSS et al., 2003). Segundo Silva et al. (2015), parâmetros físicos e químicos não retratam o impacto ambiental causado pelos poluentes, pois não demonstram os efeitos sobre o ecossistema. Conforme Costa (2008), mesmo se esses parâmetros se encontram nos limites estabelecidos pela legislação, não é possível discriminar qual substância está provocando alterações nos organismos expostos.

Em virtude da complexa composição de muitas substâncias que adentram nos corpos hídricos, a sua ação sobre a biota aquática pode ser letal. Contudo, os organismos biológicos possuem a capacidade de biotransformar muitas substâncias, inclusive alguns xenobióticos. Porém, quando essa capacidade é afetada, os xenobióticos podem bioacumular, biomagnificar, como também afetar tecidos de órgãos vitais e ainda, provocar danos de nível celular atingindo moleculares de DNA, e em um cenário catastrófico, afetar as taxas de reprodução, levando espécies à extinção.

Nessa perspectiva, para analisar a presença de contaminantes nos corpos hídricos, os peixes são excelentes bioindicadores; ademais, de acordo com Moreira et al. (2010), eles vêm sendo amplamente utilizados, uma vez que, nos fornecem parâmetros confiáveis da situação real do ambiente em que se encontram, estão

presentes em praticamente todos os rios e lagos, além de serem de fácil coleta e manuseio.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de contaminantes ambientais em áreas antropizadas do Rio Ijuí, por meio das respostas histopatológicas em brânquias e fígados de peixes capturados em cinco pontos do rio, bem como, buscou realizar análise genotóxica utilizando o Teste do Micronúcleo (MN) e Anomalias Nucleares (AN), em eritrócitos periféricos desses organismos.

Esta dissertação apresenta-se dividida em três partes. A primeira corresponde a uma revisão bibliográfica relacionada aos recorrentes contaminantes ambientais que impactam os ecossistemas aquáticos bem como, uma revisão sobre o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixe e avaliação histopatológica em brânquias e fígado. Os resultados deste trabalho estão apresentados em forma de artigos, onde, o teste do micronúcleo e anormalidades nucleares está exposto no capítulo I e, o teste histopatológico no capítulo II.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Poluentes aquáticos

No atual cenário ambiental, os ecossistemas estão em um processo avançado e alarmante de degradação, como destacam Silva e Nepomuceno (2010), onde, a presença de substâncias tóxicas vem sofrendo um crescente aumento devido às ações inconsequentes do homem. Nem sempre a presença de um contaminante provoca danos imediatos e aparentes no ambiente, pois ocorrem simultaneamente inúmeros processos onde a biota poderá transformar, eliminar ou acumular tais contaminantes com o objetivo de manter o equilíbrio do meio ambiente (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). No entanto, muitos dos poluentes incorporados no ambiente por ações antrópicas de forma constante e em grande quantidade, saturam esses processos e afetam diretamente os ecossistemas, interagem com populações e organismos promovendo perturbação nos processos vitais que garantem a sobrevivência dos mesmos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Neste contexto, os ecossistemas aquáticos são os mais afetados, pois, acabam recebendo uma vasta carga de poluentes com potencial para provocar danos fisiológicos, genéticos e ainda, gerar efeitos bioacumulativos atingindo os mais diversos níveis tróficos do ecossistema (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

A contaminação dos ambientes aquáticos origina-se em diversas fontes: aquela que parte do despejo de efluente industrial em um determinado ponto, que classifica-se como contaminação pontual, e a contaminação não pontual, que ocorre quando os contaminantes são carregados pela água da chuva até o corpo hídrico (HODGSON, 2004). Dentre essas fontes, destacam-se os poluentes urbanos, industrial e agrícola. Esses poluentes são caracterizados por apresentar uma complexa composição, abrangendo resíduos orgânicos e/ou inorgânicos e ainda, substâncias as quais não foram investigados seus impactos sobre o meio ambiente (HODGSON, 2004).

2.1.1 Contaminação por rejeitos urbanos e industriais

Os rejeitos urbanos oriundos das residências compreendem uma vasta diversidade de substâncias, as quais abrangem químicos orgânicos e inorgânicos,

microrganismos patogênicos e moléculas sintéticas de grande complexidade que foram incorporados no cotidiano da sociedade (GOUVEIA, 2012). No Brasil, apenas 45% da população tem o seu esgoto tratado, sugerindo que 55% das residências não recebem tratamento, ou seja, aproximadamente 100 milhões de pessoas não possuem o serviço básico de saneamento (SNIS, 2016). Outro agravante é a deposição de lixo em áreas inadequadas, uma vez que, conseqüentemente ela é carregada pelas águas da chuva até os corpos hídricos, podendo liberar substâncias que são solubilizadas pelas águas afetando inúmeros organismos (GOUVEIA, 2012).

Os rejeitos industriais variam em sua composição devido à fatores que abrangem desde a matéria prima utilizada até os processos de industrialização empregados. Desta forma, podem conter substâncias com grande potencial poluidor e, mesmo passando por um tratamento dentro das normas estabelecidas por lei, isto não garante a sua interação e ações sobre os organismos no meio ambiente, pois sabe-se que, durante o tratamento empregado podem surgir compostos intermediários, assim o efluente pode tornar-se mais tóxico do que o original (BUSS et al. 2003).

2.1.2 Contaminação por resíduos agrícolas

A poluição causada por resíduos agrícolas pode ocorrer de forma pontual ou difusa. A pontual refere-se, por exemplo, à contaminação causada pela criação de animais em sistemas de confinamento, onde grandes quantidades de dejetos são produzidas e lançadas diretamente no ambiente ou aplicadas nas lavouras. Já a poluição difusa é aquela causada principalmente pelo deflúvio superficial, a lixiviação e o fluxo de macroporos (MINELLA, 2002). Esses fatores, somados à falta de práticas de conservação do solo e a expansão das áreas agricultáveis que avançam em direção às margens dos rios, onde as matas ciliares já estão degradadas, contribuem para os processos de degradação dos ecossistemas aquáticos (MINELLA, 2002).

Dentre os contaminantes aquáticos, os agrotóxicos representam os agentes mais tóxicos para a biota. Classificados em grupamentos químicos, de acordo com a sua composição, nesse sentido, entre os mais utilizados destacam-se, os inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e ainda, a classe dos herbicidas e fungicidas. Muitos desses químicos empregados na agricultura de forma indiscriminada não afetam somente os organismos alvo, mas também, não-alvos

(SISINNO; OLIVEIRA-FILHO 2013), o que faz da utilização dos agrotóxicos um risco eminente para todos os organismos expostos.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Brasil destaca-se desde 2008, como o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, revelando que a taxa de crescimento do mercado brasileiro de agrotóxicos entre 2000 a 2010 foi de 190% contra 93% do mercado mundial. No estado do Rio Grande do Sul, entre 2007 e 2009 foi registrado uma taxa média de consumo de agrotóxicos de 4,27 kg/ha, já entre 2010 e 2012 a média foi de 10,49 kg/ha, não havendo ampliação na área plantada (Figura 1), registrando um aumento de 112% no uso de agrotóxicos nas áreas plantadas do Rio Grande do Sul.

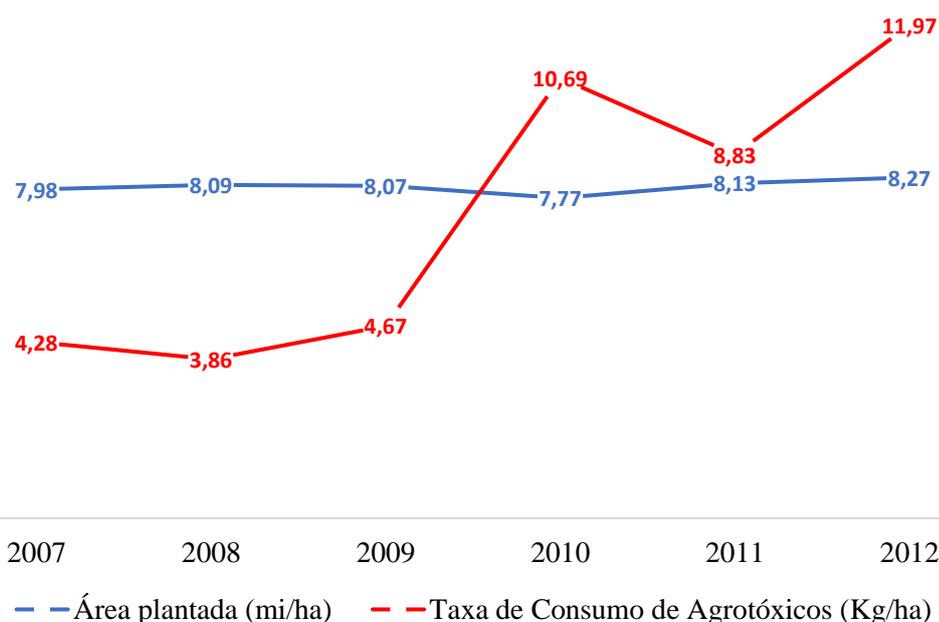


Figura 1 – Taxa de consumo de agrotóxico por área plantada no Rio Grande do Sul. **Fonte:** Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos.

A ação dos agrotóxicos sobre os organismos não-alvo é tema de estudos no mundo todo. Sobre tudo, busca-se reconhecer os seus efeitos na biota aquática, como demonstrado nos estudos de Nakagome et al. (2007) que avaliaram a dose letal (CL₅₀) em peixes *Danio rerio* dos herbicidas, 2,4-D, metsulfurom-metílico, carfentrazoneaetílica, bentazona, quincloraque, clomazona, oxadiazona, oxifluorfem, bispiribaque-sódico, pirazossulfurom-etílico e dos inseticidas, betaciflutrina,

carbofurano, fipronil e lambdacialotrina, Disner et al. (2011) e Silva (2014) realizaram estudos com o herbicida glifosato, buscando descobrir os seus efeitos sobre o DNA de *Astyanax spp.*; Goldioni e Goldoni (2012) avaliaram a ação do fungicida mancozeb em *Astyanax jaculiensis*; Matozo et al. (2015) avaliaram a ação do fungicida ridomil em *Astyanax altiparanae*. Desta forma, as pesquisas vêm demonstrando que os agrotóxicos podem representar uma das críticas fontes de contaminação dos corpos hídricos, quadro este que se agrava com o crescente aumento das áreas agrícolas.

2.1.3 Contaminação por metais

Os metais são elementos ou compostos químicos que ocorrem naturalmente na natureza e têm sido utilizados há séculos nas mais diversas atividades humanas, contudo, houve uma intensificação do seu uso após a Revolução Industrial (BARROCAS, 2013), assim, alterando os ciclos biogeoquímicos e gerando uma fonte antrópica de contaminação.

As principais fontes de contaminação dos corpos hídricos por metais, originam-se de ações antrópicas que estão relacionadas com as atividades industriais, por meio de efluentes líquidos que são lançados em pequenos córregos ou diretamente em rios e lagos, além dos resíduos urbanos e da agricultura que podem ser carregados facilmente através das chuvas (PEREIRA *et al.*, 2007; DSIKOWITZKY *et al.*, 2013).

Os metais apresentam diferentes níveis de toxicidade e abundância, sendo que, alguns atuam como micronutrientes essenciais aos organismos, quando em quantidades traço, como cobalto (Co), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn), no entanto quando em quantidades excessivas podem causar danos aos organismos. Por outro lado, existem elementos que podem causar danos mesmo em baixas concentrações, como o mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e o arsênio (As) (KUNIYOSHI, 2011).

Os metais de difícil biodegradação possuem alta persistência no meio ambiente (BARROCAS, 2013). Uma vez nos corpos hídricos pode ocorrer um contato prolongado com os organismos, desta forma, acabam reagindo com ligantes difusores, macromoléculas e ligantes presentes em membranas. Os peixes são atingidos facilmente a partir da cadeia alimentar ou tendo como importante sítio de entrada o epitélio das brânquias e posteriormente, o que não for sintetizado, metabolizado ou excretado pelo organismo, acaba bioacumulando em músculos e

vísceras abdominais, como fígado, rins e trato gastrintestinal (PORTO; ETHUR, 2009). Além do processo de bioacumulação, os metais podem biomagnificar, assim, atingindo toda a cadeia trófica inclusive os humanos (PORTO; ETHUR, 2009).

Muitos metais presentes em níveis elevados, possuem grande potencial mutagênico, ou seja, possuem a capacidade de provocar mutações e/ou lesões no DNA, o que lhes confere propriedades mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Caso não ocorra o reparo das lesões no DNA, pode-se iniciar uma cascata de consequências biológicas nas células, provocando distúrbios nos processos metabólicos, danificando a funcionalidade de órgãos vitais e até atingir populações e comunidades inteiras, pois, alguns danos como em peixes por exemplo, estão associados à redução do crescimento corporal, desenvolvimento hormonal, diminuição da sobrevivência de embriões e larvas (LEE; STEINERT, 2003).

2.1.4 Cobre no ambiente aquático

O cobre é um dos metais mais abundantes na natureza e essencial para o funcionamento do metabolismo dos organismos, agindo como cofator de enzimas, biossíntese de neurotransmissores, homeostase de ferro e apresentando papel importante na respiração celular. O Cu quando se torna um poluente em potencial, está presente em elevadas concentrações e tem origem como muitos poluentes aquáticos, através de resíduos industriais, domésticos e agrícolas, sendo esse último um dos principais (GROSELL, 2011).

Os peixes, são afetados pela alta concentração de cobre no meio aquático, em águas doces a toxicidade é maior e só perde para o mercúrio, em ambientes marinhos a toxicidade do cobre é reduzida em favor das atividades complexantes de sais dissolvidos em água. A exposição de certas espécies de peixes revela que doses entre 0,02 – 0,2 mg.L⁻¹ reduzem o tempo de vida, crescimento, taxa de reprodução e crescimento de ovos, o pH do sangue e consumo de oxigênio ficam acima dos níveis normais (EISLER; GARDNER, 1973).

As brânquias são os primeiros órgãos a sofrerem com o efeito tóxico do cobre, ocorrendo precipitação de secreções no tecido branquial dificultando o processo respiratório, além disso, há um estímulo na divisão celular do epitélio respiratório, onde verifica-se uma deficiência na produção de células sanguíneas e, em consequência ocorre a diminuição da atividade oxidativa (ARELLANO et al., 1999).

Outros órgãos também são afetados, pela morte de células, principalmente os rins e o fígado, este último, via degeneração do tecido gorduroso presente no órgão (EISLER; GARDNER, 1973; MACHADO, 1999).

2.2 Uso de peixes como biomarcadores de contaminação ambiental

O uso de parâmetros biológicos para mensurar a qualidade da água baseia-se nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem (BUSS et al. 2003), assim inúmeros bioindicadores são utilizados para realizar testes de monitoramento ambiental. Esta técnica é capaz de fornecer dados sobre os níveis de interferência dos contaminantes nos organismos biológicos, sendo eles, vegetal ou animal. Em ambiente aquático, as plantas aquáticas, algas, crustáceos, moluscos, peixes, mamíferos, aves, podem ser utilizados como bioindicadores (LINS et al., 2010). Um bioindicador ideal deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também, apresentar resistência relativa ao contaminante que está exposto. Outros aspectos que podem facilitar o desenvolvimento de um estudo são a abundância dessa espécie no ambiente e a facilidade em adaptar-se aos ensaios laboratoriais (AKAISHI, 2004; LINS et al., 2010), visto que, em laboratório são realizados estudos para avaliar o potencial tóxico de um contaminante sobre um organismo.

Nessa perspectiva, para analisar a presença de contaminantes nos corpos hídricos, os peixes são excelentes bioindicadores, ademais, de acordo com Moreira et al. (2010), eles vêm sendo amplamente utilizados, uma vez que, nos fornecem parâmetros confiáveis da situação real do ambiente em que se encontram, estão presentes em praticamente todos os rios e lagos, além de, serem de fácil coleta e manuseio.

Os peixes são organismos que sofrem grande ameaça por serem sensíveis às mudanças no seu habitat. Esse risco vem assinalado por alterações genéticas e fisiológicas provocadas por xenobióticos, isto é, compostos tóxicos aos organismos biológicos de origem natural ou antropogênica os quais causam danos em nível celular e molecular (FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2005).

Os danos em nível celular são possíveis de observação através de biomarcador histológico, utilizando órgãos chave, ou seja, onde os xenobióticos interagem e provocam alterações tecidual, como por exemplo, nas brânquias e no fígado. Já os danos em nível molecular são possíveis de observação através de biomarcadores

bioquímicos, endócrinos, ou ainda, hematológicos, avaliando quantitativamente ou qualitativamente os eritrócitos sanguíneos (SIMONATO et al., 2006). Um dos testes amplamente empregados utilizando a análise de eritrócitos é o Teste do Micronúcleo, que visa avaliar alterações na molécula de DNA devido a ação de substâncias genotóxicas (SIMONATO et al., 2006).

Segundo Freire et al., (2008), uma das características mais importantes dos biomarcadores moleculares e celulares, é que sua avaliação antecipa mudanças nos altos níveis de organização biológica, isto é, população, comunidade ou ecossistema. Em peixes, os xenobióticos podem manifestar seus efeitos, além das alterações estruturais em órgãos e tecidos comprometendo a sua fisiologia, como também, podem provocar modificações que afetam o crescimento, reprodução, bioacumular e biomagnificar (SIMONATO, 2006), assim, ocasionando um potencial desequilíbrio na população, comunidade ou ecossistema. Desse modo, o uso da biota aquática é uma importante ferramenta na avaliação da qualidade das águas superficiais (BUSS et al., 2003).

2.2.1 Teste do Micronúcleo em Peixes

O teste do Micronúcleo (MN) foi desenvolvido originalmente por Schmid (1975). Através deste teste verificou-se, em eritrócito jovens de roedores, a correlação entre aberrações cromossômicas e o aparecimento de anomalias nucleares (micronúcleos) submetidos a doses de tremeton. Anos depois, o teste foi adaptado com sucesso por Hoftman e Raat (1982) empregando o sangue periférico de peixes.

O teste do MN em eritrócito de peixe é uma análise de genotoxicidade utilizada para avaliar a toxicidade de substâncias em ensaios de laboratório, ou ainda, verificar a presença de contaminantes em um corpo hídrico oriundos de áreas antropizadas. Comparado com outros testes citogenéticos, o do MN apresenta algumas vantagens, incluindo baixo custo e rapidez de análise para triagem de grande número de substâncias (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

O teste é reconhecido internacionalmente por agências e instituições governamentais, sendo um dos métodos preferenciais para avaliar o dano genético em organismos, pois permite detectar danos provenientes tanto de agentes clastogênicos, responsáveis por quebras cromossômicas, como de agentes

aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (RIBEIRO, 2003; ANSARI et al., 2011) (Figura 2).

O teste do MN baseia-se na observação de células que sofrem alterações na distribuição de suas cromátides (efeito sobre o fuso) ou quebra de cromátides. Durante a anáfase, momento em que há a segregação dos cromossomos, os fragmentos provenientes das quebras e de cromossomos inteiros e que não estão ligados pelo fuso, não acompanham a migração para os pólos da célula (SILVA; NEPOMUCENO, 2010). Após a telófase, tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (FENECH, 2000) (Figura 2).

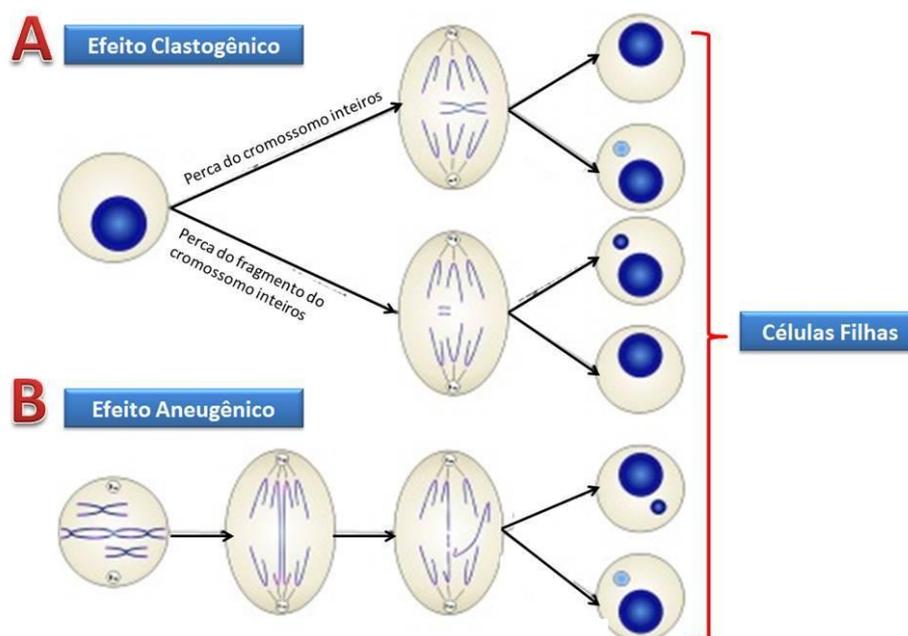


Figura 2 – Ilustração da formação de Micronúcleos sob os efeitos de agentes clastogênicos (A) e Aneugênicos (B). **Fonte:** CABRAL, 2014.

A análise de MN em eritrócito de peixes, quando os testes são realizados no laboratório, visa avaliar o potencial genotóxico de substâncias em diferentes concentrações, como observado no trabalho de Montozo et al. (2015), que avaliaram a toxicidade do pesticida Ridomil em diferentes concentrações na espécie *Astyanax altiparanae*. Silva (2014), analisou a frequência de MN em *Astyanax* spp. submetidos

a diferentes concentrações do herbicida Glifosato®, enquanto Radoll (2013) verificou a genotoxicidade de resíduos líquidos de frigorífico em *Astyanax sp.* onde foram expostos aos efluentes líquidos pré e pós-tratamento, bem como, a montante e a jusante do lançamento.

Já a análise de peixes *in loco*, quando capturados nos rios ou lagos, visa identificar a presença ou não de agentes com capacidade de interferir na integridade fisiológica desses animais, como observado por Rivero (2007), o qual objetivou em seu trabalho realizado no Lago Paranoá - Distrito Federal, avaliar a genotoxicidade da água através do teste do MN em peixes nativos. Porto e Ethur (2009), investigaram a toxicidade das águas dos rios da Bacia Hidrográfica Butuí-Icamaquã, na fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, onde um dos testes utilizados foi o de micronúcleo. Silva e Nepomuceno (2010) avaliaram os possíveis efeitos genotóxicos da poluição aquática em peixes do rio Paranaíba, região de Patos de Minas/MG, por meio do teste do micronúcleo utilizando o peixe mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) como bioindicador. Cantanhêde et al. (2016), avaliaram a qualidade de dois ambientes salobros localizados na Ilha do Maranhão, sendo o teste do MN um dos utilizados em eritrócito de *Centropomus undecimali*.

Como é possível observar, o teste do MN em peixes vem sendo utilizado frequentemente nos mais diversos estudos, desde os que envolvem o reconhecimento da toxicidade de substâncias, até aqueles que realizam monitoramento de ambientes aquáticos. Esse procedimento ocorre em virtude dos peixes serem organismos bioconcentradores de muitos contaminantes que ainda que em baixas concentrações, podem afetar sua fisiologia e capacidade de sobrevivência (GRISOLIA et al., 2009). Além disso, os peixes são relevantes no processo de avaliação local, devido aos seus hábitos piscívoro e sedentário (EGITO et al., 2010).

Nos peixes, os micronúcleos são encontrados no sangue periférico, diferentemente do teste realizado em alguns mamíferos, onde necessita extrair material da medula óssea. A coleta do sangue é realizada logo após o sacrifício do animal com preparo de esfregaços (Figura 3), fixação do material e coloração para posterior análise em microscopia óptica.

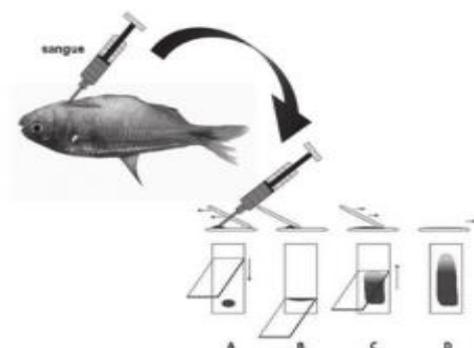


Figura 3 – Esquema da coleta de sangue e as etapas da confecção dos esfregaços. **Fonte:** Cort e Ghisi (2014).

A frequência de micronúcleos é analisada através da observação de 1000 a 3000 eritrócitos por lâmina em microscopia. De acordo com Oliveira (2013), as identificações dos micronúcleos seguem os seguintes critérios: (1) o micronúcleo deve ser um terço menor que o núcleo principal; (2) o micronúcleo não deve tocar o núcleo principal; (3) deve ter o mesmo plano de foco do núcleo; (4) padrão de coloração idêntico ao núcleo.

Conforme Ribeiro (2003), o resultado positivo no teste, indica a presença de substâncias genotóxicas no local de estudo avaliado. O resultado negativo no teste indica que, sob as condições do teste, não houve indícios da presença de substâncias no ambiente estudado capazes de promover danos genéticos nas espécies avaliadas.

Concomitante ao teste do MN realiza-se a observação de alterações na morfologia do envelope nuclear, o que também dá indícios da presença e interação de substâncias químicas com o organismo avaliado. São alterações provocadas por agentes que também induzem os MNs, porém, os mecanismos moleculares que acarretam as alterações não foram desvendados ainda (PALHARES; GRISOLIA, 2002), mas acredita-se que estão relacionados a erros que ocorrem durante os processos mitóticos (FENECH, 2000).

As alterações morfológicas nucleares (AMN) descritas com maior frequência em estudos foram observadas primeiramente por Carrasco *et al.* (1990) como: “blebbed” núcleo que apresenta uma pequena invaginação no envoltório nuclear; “lobbed” núcleo com uma invaginação maior do que o belbbed; “notched” núcleo com corte notável no conteúdo do material nuclear; “vacuolated” núcleos que apresentam

uma região que lembra vacúolos em seu interior (Figura 4). Outras alterações já foram relatadas por muitos autores, como, “binúcleo” dois núcleos bem definidos; “segmented” dois núcleos unidos por um filamento largo; “kidney-shape” núcleo dobrado em formato e um rim (CARROLA *et al.*, 2014).

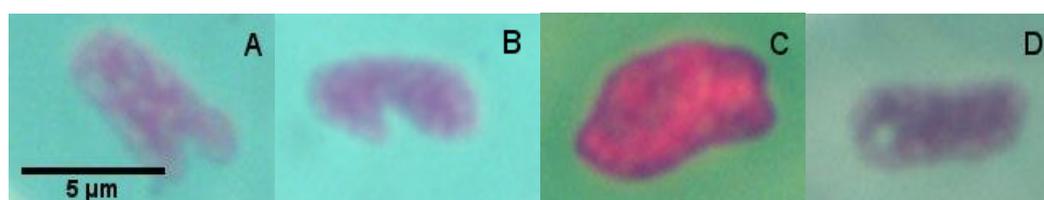


Figura 4 - Alterações morfológicas nucleares: A- blebbed; B – lobbed; C – notched; D - vacuolated. **Fonte:** autor.

2.2.2 Análise histopatológica em peixes

A avaliação histopatológica tem sido um valioso instrumento biomarcador de qualidade ambiental. Por definição, os biomarcadores são alterações biológicas que podem estar relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de compostos químicos do ambiente (PEAKALL, 1994; VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996). Os peixes são organismos extremamente sensíveis às mudanças na qualidade de seu habitat, com isso, alterações no ambiente devido à presença de contaminantes podem resultar em inúmeras mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar à formação de lesões que, por muitas vezes, podem ser irreversíveis (HINTON e LAUREN, 1990; HILTON *et.al.*, 1992).

Essa técnica permite uma análise específica dos órgãos em nível tecidual e celular, visto que eles são afetados por estressores ambientais sob condições *in situ*, além disso, em avaliação de campo, a histopatologia é um método eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (SILVA, 2004). Em peixes, a histologia é direcionada para órgãos chave, que estão em contato com xenobióticos, como as brânquias e o fígado. Muitos xenobióticos presentes nos ecossistemas aquáticos acabam absorvidos pelos peixes através da ingestão de alimentos, água, pelas brânquias e pele. Segundo Silva (2004) e Avilez (2008), as brânquias constituem uma porta de entrada dos xenobióticos que estão presentes na

água, já o fígado, tem a função de biotransformar poluentes que entraram no organismo por via alimentar para posterior excreção.

Estudos com o uso da histologia do fígado e das brânquias, com o objetivo de monitorar a poluição dos ambientes aquáticos ou a toxicidade de substâncias químicas, vêm expandindo-se no território brasileiro como evidenciado na tabela 1.

Tabela 1 – Estudos realizados no território brasileiro utilizando a histologia como ferramenta de avaliação da contaminação e contaminantes ambientais.

Autores	Órgão/Espécie	Objetivo
Miletti et al. (2003)	Fígado e brânquia de <i>Serrapinnus notomelas</i> e <i>Danio rerio</i>	Avaliou a toxicidade do sedimento dos rios da Bacia do Mogi-Iguaçu.
Silva (2004)	Fígado e brânquia de <i>Astyanax</i> sp.	Avaliou a toxicidade da água de um Ribeirão Urbano.
Simonato et al. (2006)	Fígado e brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i>	Avaliou a exposição aguda e subcrônica à fração solúvel de óleo diesel.
Garcia-Santos et al. (2006)	Brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	Avaliou a exposição a frações de Cádmio.
Avilez (2008)	Fígado e brânquias de <i>Bricon amazonicus</i>	Avaliou os efeitos de concentrações de fenol.
Condessa (2009)	Fígado e brânquias de <i>Astyanax bimaculatos</i>	Analisou a bioacumulação e os efeitos da exposição subcrônica a diferentes concentrações de Zn.
Faria (2009)	Fígado e brânquias de <i>Poecilia vivipara</i>	Verificou a toxicidade de concentrações do herbicida Roundup®.
Brito (2010)	Fígado e brânquias de <i>Pimelodus maculatus</i> e <i>Oligosarcus hepsetus</i>	Avaliou a qualidade da água de três reservatório no Rio Paraíba do Sul.
Rocha et al. (2010)	Fígado de <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Avaliou a qualidade ambiental da Baía do Guajará
Rezende (2011)	Fígado e brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	Avaliou a qualidade da água de uma represa através das alterações histológicas.

Tabela 1 – (Continuação)

Autores	Órgão/Espécie	Objetivo
Shiogiri (2011)	Fígado e brânquias de <i>Piractus mesopotamicus</i>	Avaliou a toxicidade de concentrações do herbicida glifosato na formulação Roundup® Ready.
Campos (2012)	Fígado de <i>Prochilodus lineatus</i>	Avaliou a toxicidade da água de um lago e de detergente biodegradável.
Figueredo (2013)	Fígado e brânquias de <i>Rhamdia quelen</i>	Verificou as alterações histológicas em peixes do Rio da Madre, SC, situado em uma região predominada pela rizicultura.
Moraes (2013)	Brânquias de <i>Bricon amazonicus</i>	Avaliou os efeitos de concentrações de cipermetrina.
Filho et al., 2014	Fígado e brânquias de <i>Pygocentrus nattereri</i> e <i>Serrasalmus marginatus</i>	Avaliou a qualidade da água do Rio Paraguai.
Virgens et al., 2015	brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	Avaliou os efeitos após a exposição Acefato, Difenconazol e Sulfluramida
Pinto, 2016	Fígado e brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	Avaliou a toxicidade do cobre e a qualidade da água do reservatório Guarapiranga, SP.
Neves, 2017	Brânquias e fígado de <i>Ancistrus mullerae</i>	Avaliou a qualidade ambiental de sete rios da bacia do baixo Iguaçu – PR.
Pinheiro et al., 2017	Fígado de <i>Colossoma macropomum</i>	Avaliou o tecido hepático de peixes em lago sob influência de atividade mineradora na Amazônia.

Fonte: autor.

Desta forma, a avaliação histológica em peixes tem demonstrado ser uma excelente ferramenta de pesquisa para estudos de monitoramento da qualidade de ambientes aquáticos e ainda, colabora para evidenciar o efeito desses poluentes sobre a integridade dos organismos aquáticos.

2.2.2.1 Fígado

O fígado localiza-se na cavidade celomática com os demais órgãos, sendo composto por dois lobos. As células que o compõe são os hepatócitos, células epiteliais dos ductos biliares, os macrófagos, as células sanguíneas e as células endoteliais. Os hepatócitos possuem um ou dois núcleos grandes, esféricos e centralmente localizados, com nucléolo evidente, e o citoplasma com granulações e aspecto vacuolizado, são as principais e mais abundantes células, pois são responsáveis pela síntese, secreção, armazenamento, biotransformação e metabolismo de substâncias (OLIVEIRA, 2015; COSTA et al. 2012; SILVA, 2004).

O fígado de peixe possui função similar aos demais vertebrados, desse modo, é responsável pelo metabolismo de proteínas, lipídeos, carboidratos, e pela biotransformação de substâncias tóxicas, como os metais. Ainda, nos peixes, está envolvido na hematopoiese e na produção de anticorpos durante o período larval (SILVA, 2004; PARIS-PALACIOS et al., 2000).

O xenobiótico, após entrar no organismo, é transportado pelo sangue e atinge os órgãos do peixe, podendo se estocar nas gorduras, rins e músculos, ou ainda no fígado; entretanto, esse último pode biotransformar os compostos tóxicos eliminando-os. O processo de biotransformação tem como definição a conversão catalisada por enzimas de uma substância em outra, com a finalidade de torna-la mais hidrofílica, assim, evitando que permaneça o tempo suficiente no organismo para provocar danos irreparáveis (SIJM; OPPERHUIZEN, 1989). Ainda, segundo Sijm e Opperhuizen (1989), no que diz respeito à toxicidade, o xenobiótico biotransformado pode tornar-se mais tóxico para o organismo do que o seu composto original, sendo que depende do tipo de composto e a capacidade do organismo em realizar esse processo.

Conforme Sijm e Opperhuizen (1989), o processo de biotransformação em geral é dividido em Fase I e Fase II. A Fase I corresponde a reações não sintéticas que envolvem a oxidação, redução ou hidrólise, com o objetivo de introduzir um grupo

funcional no xenobiótico. As reações da Fase II são de conjugação com compostos endógenos. O produto a ser excretado pode ser formado somente na Fase I ou Fase II ou em ambas (HODGSON, 2004; AVILEZ, 2008). Desta forma, o fígado está envolvido em funções vitais, sobretudo nos organismos aquáticos, tais como os peixes, tornando-se um importante biomarcador capaz de fornecer informações quanto às respostas desses organismos com relação à qualidade do ambiente em que vivem.

As alterações histológicas em tecido hepático foram classificadas por Poleksic e Mitrovictutundzic (1994) de acordo com o estágio de severidade, onde, o estágio I corresponde às alterações consideradas leves, aquelas que não alteram a função do tecido; o estágio II condiz às alterações moderadas, isto é, aquelas que alteram parcialmente a função do tecido, já o estágio III representa as alterações severas, aquelas que alteram totalmente a função do tecido (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação das alterações histopatológicas do fígado quanto a severidade das lesões de acordo com Poleksic e Mitrovic-tutundzic (1994) adaptado pelo autor.

Estágio	Alterações histológicas
	Núcleo na periferia da célula
	Deformação do contorno celular
	Deformação do contorno nuclear
	Hipertrofia celular
	Hipertrofia nuclear
	Atrofia celular
I	Atrofia nuclear
	Centros de melanomacrófagos
	Vacuolização citoplasmática
	Vacuolização nuclear
	Degeneração citoplasmática
II	Degeneração nuclear
	Rompimento celular
	Estagnação biliar
	Hiperemia
III	Necrose focal

Com base nesta classificação, os autores desenvolveram a seguinte equação para calcular o Índice de Alterações Histopatológicas (IAH): $IAH = 10^0 \cdot \sum SI + 10^1 \cdot \sum SII$

$+10^2 \cdot \sum SIII$ onde, $\sum SI$, $\sum SII$ e $\sum SIII$ = somatório do número de alterações de estádios I, II e III; 10^0 = múltiplo da fase I; 10^1 = múltiplo da fase II; 10^2 = múltiplo da fase III. Os valores do IAH são classificados em quatro categorias: 0-10 = funcionamento normal do órgão; 11-20 = alterações leves; 21-50 = alterações moderadas; 51-<100 = lesões severas.

Como as células do fígado agem diretamente no metabolismo e biotransformação de xenobióticos é possível a identificação de alterações estruturais que ocorrem devido as suas ações. As alterações possíveis de observação através da técnica Hematoxilina-Eosina (HE) e, frequentemente utilizadas nos estudos de histopatologia do fígado de peixes, são do tipo: núcleo na periferia da célula, deformação do contorno celular, deformação do contorno nuclear, hipertrofia celular, hipertrofia nuclear, centros de melanomacrófagos, vacuolização citoplasmática, vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, rompimento celular, estagnação biliar, necrose e hiperemia, sendo está última uma alteração nos vasos sanguíneos (MILETTI et al., 2002; SILVA, 2004; SIMONATO, 2006; AVILEZ, 2008; CONDESSA, 2009; FARIA, 2009; BRITO, 2010; ROCHA ET AL., 2010; REZENDE, 2011; SHIOGIRI, 2011; CAMPOS, 2012; FIGUEREDO, 2013; FILHO et al., 2014; PEREIRA, 2014; PINTO, 2016; NEVES, 2017; PINHEIRO et al., 2017)

2.2.2.2 Brânquias

As brânquias exercem funções vitais nos peixes. Através da sua atividade ocorrem os processos de trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados (LIMA et al. 2008; MACHADO; FANTA, 2003). A qualidade do ambiente aquático afeta diretamente a estrutura branquial, pois as brânquias estão em contato com a água, logo, em contato direto com poluentes. Desta forma, torna-se um excelente bioindicador de qualidade dos ambientes aquáticos, como também, uma forma de avaliar as respostas desses organismos na presença de xenobióticos presentes no ambiente (SILVA, 2004).

Em relação a morfofisiologia das brânquias, a disposição e o tamanho variam conforme a espécie, localizam-se na cavidade opercular e são divididas em arcos de onde surgem os filamentos branquiais com suas fileiras de lamelas secundárias (VIERGENS et al., 2015). Essas lamelas são muito vascularizadas e são as principais estruturas responsáveis pelas trocas gasosas, já sua estrutura histológica apresenta-

se revestida por epitélio pavimentoso simples e amparada por células pilares, sendo essas formadoras de lacunas contendo os capilares sanguíneos, nos quais ocorrem as trocas gasosas e também, estão presentes na estrutura as células de cloreto, células mucosas, melanócitos, macrófagos e os linfócitos (Figura 2-A) (FILHO et al. 2014; VIRGENS et al., 2015).

As brânquias são os órgãos mais afetados pela presença de poluentes na água, pois é a principal rota de entrada das substâncias tóxicas, o que geralmente ocasiona um desajuste da regulação hidromineral que é regulada pelas células cloreto e pavimentosas. As células cloreto são as células-chave envolvidas neste processo, elas absorvem Cl^- através dos trocadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+ através dos trocadores $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ e nas pavimentosas estão presentes canais de Na^+ , onde o influxo iônico é dirigido pelo gradiente eletroquímico regido por uma H^+ -ATPase (EVANS et al., 2005; BONGA; LOCK, 2008; MORAES, 2013).

Muitos contaminantes orgânicos e inorgânicos podem alterar a permeabilidade do epitélio branquial à água e aos íons. Essa alteração ocorre por meio da ação direta do contaminante sobre os mecanismos de transporte e/ou da ação indireta, através da indução de respostas de estresse que envolvem a liberação de catecolaminas e cortisol na corrente sanguínea, desencadeando uma série de reações que afetam a funcionalidade das brânquias (BONGA; LOCK, 2008). A catecolamina liberada provoca um aumento da perfusão lamelar e da permeabilidade de íons, já o cortisol, induz a proliferação de CC (Figura 5-F) com o objetivo de reestabelecer o balanço iônico e em consequência da proliferação de CC, ocorre um aumento da espessura da membrana lamelar prejudicando as trocas gasosas entre a água e o sangue (MORAES, 2013).

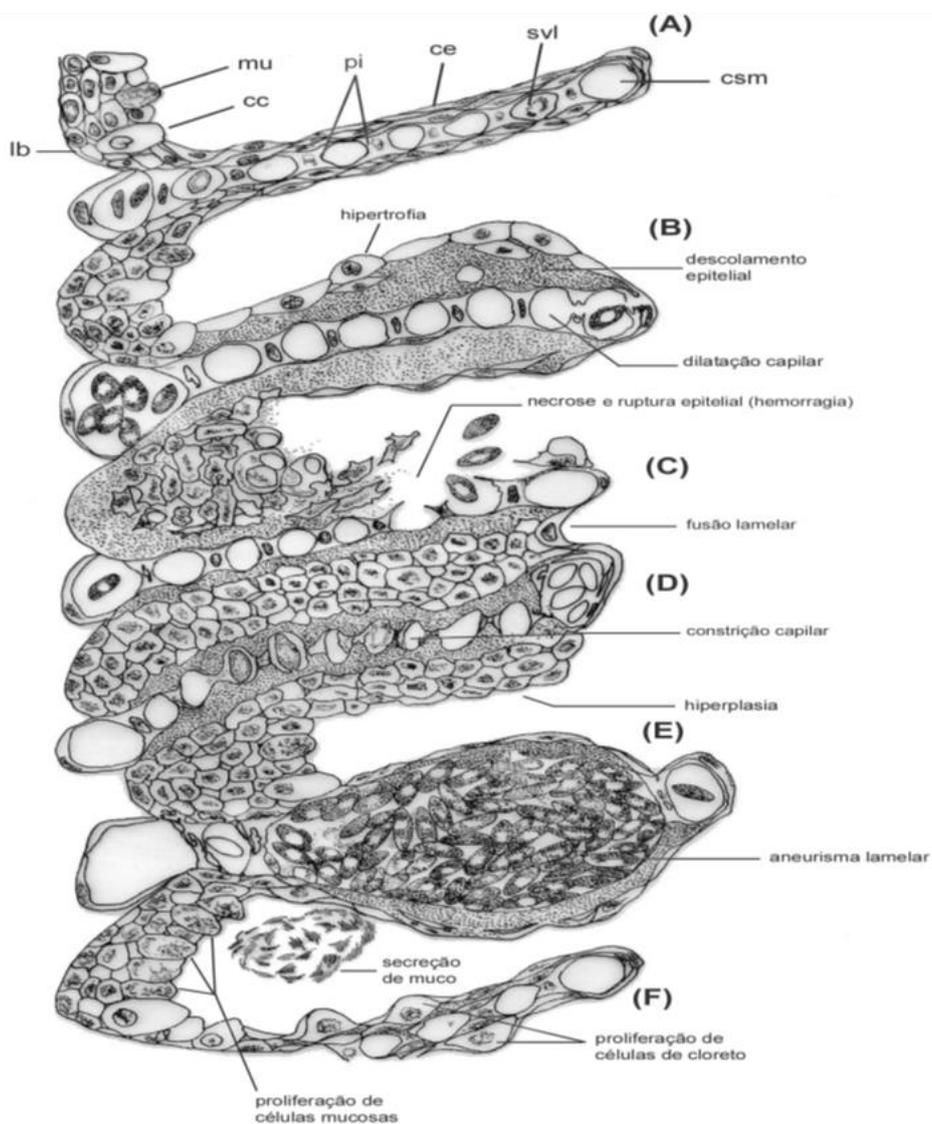


Figura 5 – Esquema representativo das células branquiais e as possíveis alterações mais encontradas em estudos histopatológicos. Brânquia normal (A), lâmina basal (lb), célula mucosa (mu), célula cloreto (cc), célula pilar (pi), célula epitelial (ce), seio venoso lamelar (svl), canal sanguíneo marginal (csm); B, C, D e F, alterações mais encontradas. **Fonte:** MORAES, 2013.

As alterações branquiais recorrentes da ação de poluentes estão exemplificadas na Figura 5B, 5C, 5D, 5E e 5F, sendo que estas também foram classificadas por Poleksic e Mitrovictutundzic (1994) de acordo com o estágio de severidade, onde, o estágio I representa as alterações consideradas leves, ou seja, as que alteram a função do tecido; o estágio II refere-se as alterações moderadas, que alteram parcialmente a função do tecido; logo o estágio III corresponde as alterações severas, aquelas que alteram totalmente a função do tecido (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação das alterações histopatológicas das brânquias quanto e a severidade das lesões de acordo com Poleksic e Mitrovic-tutundzic (1994) adaptado pelo autor.

Estágio	Alterações histológicas
I	Hipertrofia do epitélio lamelar
	Elevação do epitélio lamelar
	Hiperplasia do epitélio lamelar
	Desarranjo lamelar
	Dilatação do seio sanguíneo
	Constricção do seio sanguíneo
	Congestão vascular
II	Fusão incompleta das lamelas
	Fusão completa de algumas lamelas
	Fusão completa de várias lamelas
	Ruptura do epitélio
III	Aneurisma lamelar
	Destrução do epitélio lamelar
	Congestão vascular
	Necrose

Fundamentando-se nesta classificação, os autores desenvolveram a seguinte equação para calcular o Índice de Alterações Histopatológicas (IAH): $IAH = 10^0 \cdot \sum SI + 10^1 \cdot \sum SII + 10^2 \cdot \sum SIII$ onde, $\sum SI$, $\sum SII$ e $\sum SIII$ = somatório do número de alterações de estádios I, II e III; 10^0 = múltiplo da fase I; 10^1 = múltiplo da fase II; 10^2 = múltiplo da fase III. Os valores do IAH são classificados em quatro categorias: 0-10 = funcionamento normal do órgão; 11-20 = alterações leves; 21-50 = alterações moderadas; 51-<100 = lesões severas.

As alterações histopatológicas em brânquias descritas na Tabela 3 e demonstradas na Figura 5, foram evidenciadas em muitos estudos que visaram avaliar substâncias potencialmente poluidoras. Alguns desses estudos estão expostos na Tabela 4, com as respectivas alterações descritas pelos autores.

Tabela 4 – Estudos realizados com análise histopatológica de brânquias visando caracterizar os efeitos de substâncias poluidoras em potencial.

Autor	Poluente(s)	Alteração(ões)
Simonato et al. (2006)	Óleo diesel	Descolamento epitelial, hiperplasia e aneurisma.

Tabela 4 – (Continuação)

Autor	Poluente(s)	Alteração(ões)
Garcia-Santos et al. (2007)	Cádmio	Proliferação do epitélio filamentar, vasodilatação do seio venoso central e da região basal do eixo vascular das lamelas e destacamento do epitélio.
Aviles (2008)	Fenol	Fusão lamelar, congestão sanguínea, necrose e aneurisma.
Shiogiri (2011)	Roundup® Ready	Hipertrofia, hiperplasia e proliferação de CC.
Moraes (2013)	Cipermetrina®	Hiperplasia, hipertrofia, dilatação de vasos sanguíneos e aneurisma.
Virgens et al. (2015)	Acefato, Difenconazol e Sulfluramida	Desarranjo celular, desorganização dos filamentos, aneurismas e apoptose.
Arellano et al. (1999)	Cobre	Destacamento do epitélio, proliferação de CC.
van den Heuvel et al. (1999)	Areia betuminosa	Aneurisma, proliferação de células epiteliais e CC.
Pane et al. (2004)	Níquel	Fusão das lamelas
Maduenho et al. (2007)	Dimilin®	Congestão vascular, desarranjo lamelar secundária, hiperplasia e fusão completa.

Fonte: Autor

Diante do exposto, a histologia é uma ferramenta capaz de revelar sensível e seletivamente até mesmo os efeitos subletais de substâncias presentes no meio ambiente e com potencial de interferir na biota aquática (ARELLANO et al., 1999).

3 Resultados

CAPÍTULO 1

**GENOTOXICIDADE EM ORGANISMOS EUCARIOTOS DE ÁGUA DOCE
AVALIADA PELO TESTE DE MICRONUCLEO E ANOMALIAS NUCLEARES.**

GENOTOXICIDADE EM ORGANISMOS EUCARIOTOS DE ÁGUA DOCE AVALIADA PELO TESTE DE MICRONÚCLEO E ANOMALIAS NUCLEARES.

Resumo

A antropização dos ambientes aquáticos agrava os riscos de contaminação por substâncias genotóxicas, desta forma, pondo em risco a integridade genética de muitos organismos. O teste do Micronúcleo (MN) e Anomalias Nucleares (AN) em sangue periférico de peixes, empregado à campo é uma forma de avaliar a presença de genotóxicos nos corpos hídricos que já estão em interação com os organismos. No presente estudo, o teste do MN e AN foi avaliado em peixes do Rio Ijuí/RS. O rio está localizado em meio a áreas agrícolas, urbanas com atividades industriais e somando a isso, o deficiente tratamento de esgoto doméstico das cidades. Os resultados obtidos indicam que em apenas um dos cinco pontos de coleta avaliados as frequências de MN em peixes se apresentam superiores ao esperado, já as frequências de AN foram superiores aos MNs em todos os pontos. As frequências baixas de MN não excluem o fato de que o rio esteja livre de contaminantes, pois os resultados apresentados são momentâneos e referentes aos peixes coletados neste estudo.

Palavras-chave: Contaminação. Bioindicador. Xenobiótico. Corpo hídrico.

GENOTOXICITY IN FRESH WATER EUKARYOTE ORGANISMS ASSESSED BY THE MICRONUCLEUS TEST AND NUCLEAR ABNORMALITIES.

Abstract

The anthropization of aquatic environments aggravates the risks of contamination by genotoxic substances, in this way at risk the genetic integrity of many organisms. Micronucleus test (MN) and Nuclear Abnormalities (AN) in the peripheral blood of fish used in the field is a way to evaluate the presence of genotoxics in water bodies, which are already in interaction with organisms. In the present study, the MN and AN tests were evaluated in Ijuí river fish. The river is located in the middle of agricultural areas, urban with industrial activities and adding to this, the deficient treatment of domestic sewage of the cities. The results indicate that in only one of the five points of collection evaluated the MN frequencies in fish are higher than expected, and the AN frequencies were higher than the MNs at all points. The low MN frequencies do not exclude the fact that the river is free of contaminants, since the results presented are momentary and refer to the fish collected in this study.

Keywords: Contamination. Bioindicator. Xenobiotic. Water body.

1 Introdução

Os ecossistemas aquáticos estão expostos a uma gama de substâncias potencialmente poluidoras, as quais, originam-se das ações humanas. Os principais focos de antropização são os efluentes doméstico, industrial e os agroquímicos e tais poluentes são caracterizados por apresentarem uma complexa composição, que abrange químicos orgânicos, inorgânicos, metais, microrganismos patogênicos, bem como, substâncias cujos efeitos sobre o meio ambiente ainda são desconhecidos. O quadro pode ser agravado com a falta de conservação das matas ciliares de rios, lagos e nascentes.

Nem sempre a presença de um contaminante provoca danos imediatos e mensuráveis no meio ambiente, pois ocorrem simultaneamente inúmeros processos onde a biota poderá transformar, eliminar ou acumular os contaminantes com o objetivo de manter o equilíbrio do meio ambiente (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). No entanto, esses poluentes contaminam de forma constante e em grande quantidade os ambientes aquáticos, ocasionando uma saturação desses processos e afetando diretamente os organismos aquáticos promovendo perturbação nos processos vitais dos mesmos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Dessa forma, estudos vêm sendo realizados para avaliar os níveis de poluição dos ambientes aquáticos e um deles, é o uso de parâmetros biológicos, que baseiam-se na avaliação das respostas biológicas dos organismos em relação ao meio onde vivem (BUSS et al. 2003; LINS et al., 2010).

Um bioindicador ideal deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar resistência relativa ao contaminante que está exposto. Outros aspectos que podem facilitar o desenvolvimento de estudos são a abundância dessa espécie no ambiente e a facilidade em adaptar-se aos ensaios laboratoriais (AKAISHI, 2004; LINS et al., 2010), visto que, em laboratório são realizados estudos para avaliar o potencial tóxico de um contaminante sobre um organismo.

Diante disso, os peixes são excelentes bioindicadores de ambientes aquáticos, e segundo Moreira et al. (2010), fornecem parâmetros confiáveis da situação real do ambiente em que se encontram, além de estar presente em praticamente todos os rios e lagos, ser de fácil coleta e manuseio.

Em peixes, os xenobióticos podem provocar danos em nível celular, comprometendo o funcionamento de órgãos vitais, podendo ainda, bioacumular e

biomagnificar (SIMONATO *et al.*, 2006), como também, danos em nível molecular, que são provocados principalmente na molécula de DNA, onde, muitos xenobióticos têm a capacidade de interagir promovendo danos clastogênicos, responsáveis por quebras cromossômicas, como de agentes aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (ANSARI *et al.*, 2011).

Os contaminantes que causam danos no DNA são conhecidos como genotóxicos e há testes eficientes para avaliar a presença em ambientes aquáticos. O teste do MN foi desenvolvido originalmente por Ledebur e Schmid (1973), com eritrócito jovens de roedores; posteriormente, o teste foi adaptado com sucesso por Hoftman e Raat (1982) empregando em sangue periférico de peixes.

Em relação à avaliação de AN, estas são conceituadas como alterações na morfologia do envelope nuclear, o que também fornece indícios da presença de substâncias químicas nos corpos hídricos que interagem com o organismo avaliado.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de MN e AN em eritrócitos de peixe de água doce, expostos a ambientes antropizados.

2 Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), sob o protocolo nº 23205.000642/2018-45.

2.1 Área de estudo

O corpo hídrico utilizado para este trabalho foi o Rio Ijuí, cuja localização transpõe a região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, sob as coordenadas 27°45' e 26°15' de latitude Sul e 53°15' e 56°45' de longitude Oeste, no qual, foram delimitados cinco pontos de coleta (Figura 1). Onde, P1 localiza-se sob as coordenadas 28°19'10,81" S e 53°58'54,52" W, nas margens da RS 342, próximo à cidade de Ijuí-RS. É o ponto mais próximo da nascente (± 50 Km) entre a junção dos rios Palmeira, Caxambu e Fiúza; P2 localiza-se sob as coordenadas 28°18'50.74"S e 54°18'38.39"W, após a cidade de Santo Ângelo-RS; P3 localiza-se sob as coordenadas 28°11'53.20"S e 54°41'25.47"W, próximo a cidade de Cerro Largo-RS; P4 localiza-se sob as coordenadas 28°08'13.35"S e 55°03'50.77"W, próximo a cidade

de Roque Gonzales-RS; P5 localiza-se sob as coordenadas 28°03'29,0"S e 55°07',39,0"W, é o ponto próximo do Rio Uruguai.

Foram realizadas quatro coletas uma em cada estação sazonal anual, compreendendo a primavera de 2017, verão, outono e inverno de 2018, capturando 10 espécimes de peixe por estação, totalizando 40 peixes por ponto independente da espécie. A captura foi efetuada com anzóis e isca viva.

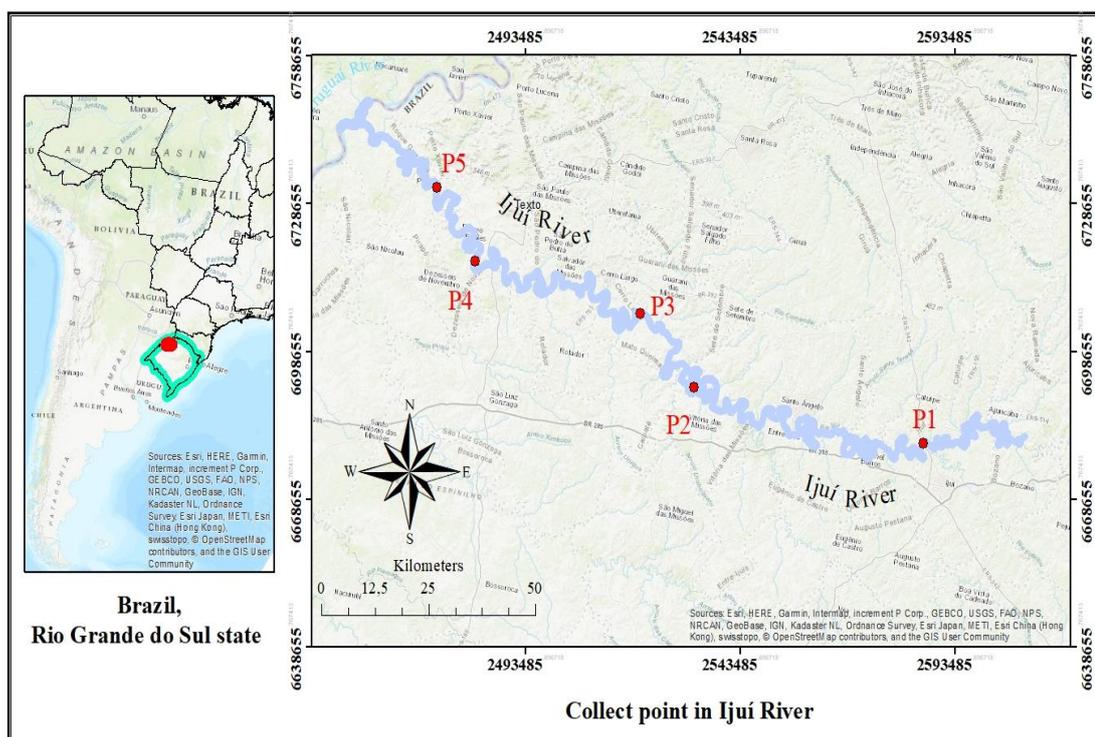


Figura 1 – Localização dos pontos de coleta do estudo. **Fonte:** elaborado pelo autor através do ArcMap®.

2.2 Caracterização dos pontos e análise dos parâmetros físico-químicos

O ambiente no local dos pontos foi caracterizado levando em consideração os focos de antropização: presença de mata ciliar, atividades agrícolas e presença de áreas urbanas. Os parâmetros físico-químicos temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade (COD), sólidos dissolvidos totais (SDT) e salinidade (SAL) foram aferidos através de sonda multiparâmetro em todas as coletas.

2.3 Processamento e análise dos esfregaços

Posterior à captura, os peixes foram anestesiados através de imersão em solução de Eugenol 3% e imediatamente sacrificados por decapitação, uma incisão foi efetuada na artéria caudal para extração do sangue através de capilar de vidro contendo EDTA 3%, para evitar a coagulação do sangue.

Foram confeccionadas três lâminas de esfregaço sanguíneo por peixe e deixados secar em temperatura ambiente; após, fixados em metanol por 15 minutos e armazenados em porta lâminas para transporte até o Laboratório de Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Cerro Largo, RS. No laboratório, as lâminas foram submetidas a hidrólise em HCl 5 N por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada seguida da coloração do núcleo em reativo de Schiff por duas horas, em seguida lavadas em água destilada e imergidas em Fast-Green por um minuto para contra-coloração.

Em microscopia óptica, foram observadas 1000 células por lâmina, ou seja, 3000 por peixe, contabilizando as células micronucleadas (MN) e as anomalias nucleares (AN) dos tipos : “blebbed”, núcleo que apresenta uma pequena invaginação no envoltório nuclear; “lobbed”, núcleo com uma invaginação maior do que o blebbed; “notched”, núcleo com corte notável no conteúdo do material nuclear; “vacuolated”, núcleos que apresentam uma região que lembra vacúolos em seu interior; “binúcleo”, dois núcleos bem definidos; “segmented”, dois núcleos unidos por um filamento largo.

Os dados extraídos das contagens foram transformados em frequências de MN e AN através da fórmula:

$$\text{Frequência} = \frac{\text{Total de MN ou AN contabilizados} \times 100}{\text{total de células observadas}}$$

2.4 Análise estatística

Para a análise estatística, as frequências entre os pontos e as estações foram submetidas ao teste Kruskal-Wallis, as médias, ao teste Tukey de comparação múltipla entre os pontos e as estações. Para avaliar uma possível correlação entre a incidência de MN e AN os dados das respectivas variáveis foram submetidos ao teste de Correlação Linear de Pearson. Para todos os testes, foi considerado significativo $p \leq 0,05$.

3 Resultados

Os cinco pontos de coleta estabelecidos para este estudo, foram estrategicamente selecionados visando os mais diversos ambientes e seus potenciais causadores de impacto. Todos os pontos apresentam sinais de antropização (Apêndice 1), caracterizado pelo lançamento de efluente doméstico e industrial, agravando-se no P1 e P2.

Os parâmetros físico-químicos (Tabela 1), das quatro coletas sazonais e nos cinco pontos, apresentam-se em conformidade com a resolução nº 357 (CONAMA, 2005) enquadrando-se em classe 2 para água doce.

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos parâmetros Físico-Químico das quatro estações sazonais nos cinco pontos de coleta.

Ponto	Média e desvio padrão dos parâmetros Físico-Químicos					
	OD mg/L	pH	COND µS/cm	SLDT mg/L	SAL %	T°C
P1	6,1±0,3	7,18±0,1	87,6±10,1	60,85±9,2	0,04±0,01	20,1±2,3
P2	6,6±0,8	7,24±0,3	115,1±12,0	81,2±5,9	0,06±0,01	17,5±5,9
P3	6,5±0,9	6,8±0,01	124,5±2,6	90,3±15,1	0,06±0,01	19,2±9,5
P4	6,3±1,7	7,4±0,1	119,4±17,6	83±20,6	0,06±0,01	17,6±8,1
P5	6,3±1,6	7,4±0,05	194±1,6	128,9±7,1	0,09±0,04	17,6±10,3
CONAMA 3357/2005	>5,0	6,0 a 9,0	60>	<500	<0,5	

*OD=oxigênio dissolvido; COND=condutividade; SLDT=sólidos dissolvidos totais; SAL= salinidade.

No presente estudo, foram observadas as presenças de MNs (Figura 2) e ANs do tipo “blebbed”, “lobbed”, “notched”, “vacuolated”, “binúcleo”, “segmented” (Figura 3).

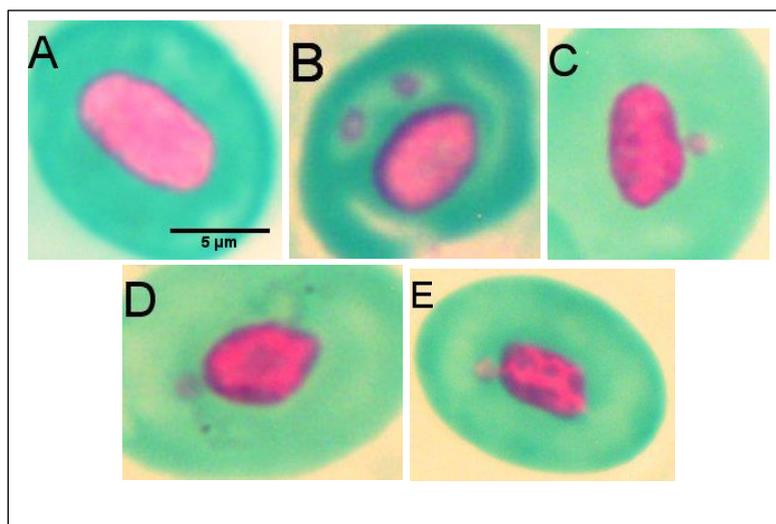


Figura 2 – Eritrócito normal em A e eritrócitos micronucleados B, C, D, E observados em objetiva de 100x. **Fonte:** Autor

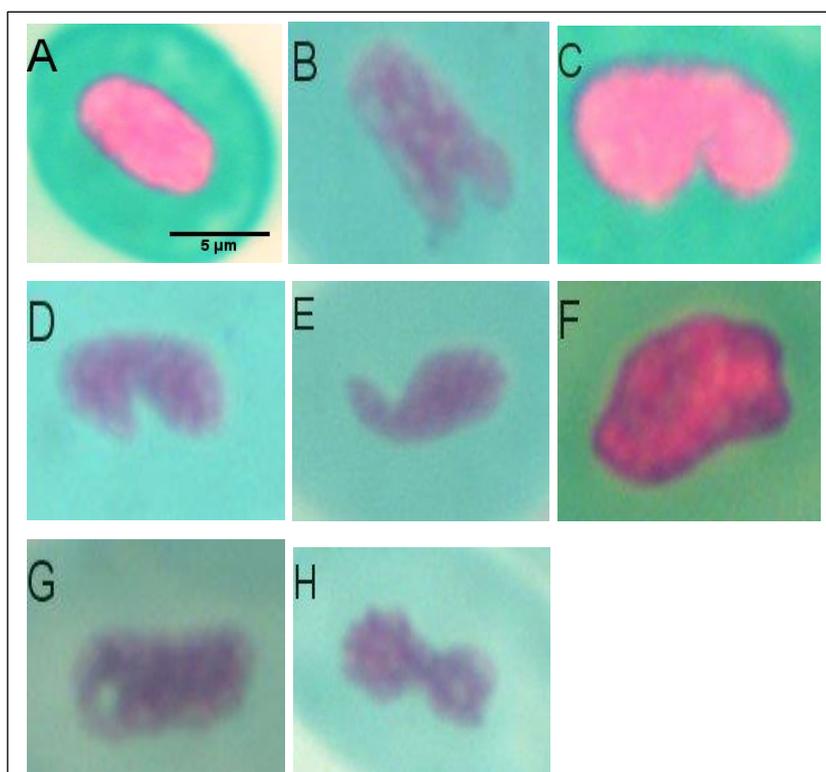


Figura 3 – Eritrócitos dos peixes analisados com anomalias nucleares AN: em A – normal; B e C – blebbed; D e E – lobbed; F – notched; G – vacuolated; e H – segmented. **Fonte:** Autor.

Nos peixes analisados nos cinco pontos do Rio Ijuí, não há presença significativa de MN, exceto no Ponto 3 na primavera (Figura 4A) em que o índice se mostra superior ao esperado que é de 0,2%. Os dados coletados de células com AN, mostram que seus valores são maiores que o índice de células com MN, ocorrendo

um maior aumento nos peixes do P2 nas estações de primavera, verão e outono (Figura 4A, B, C)

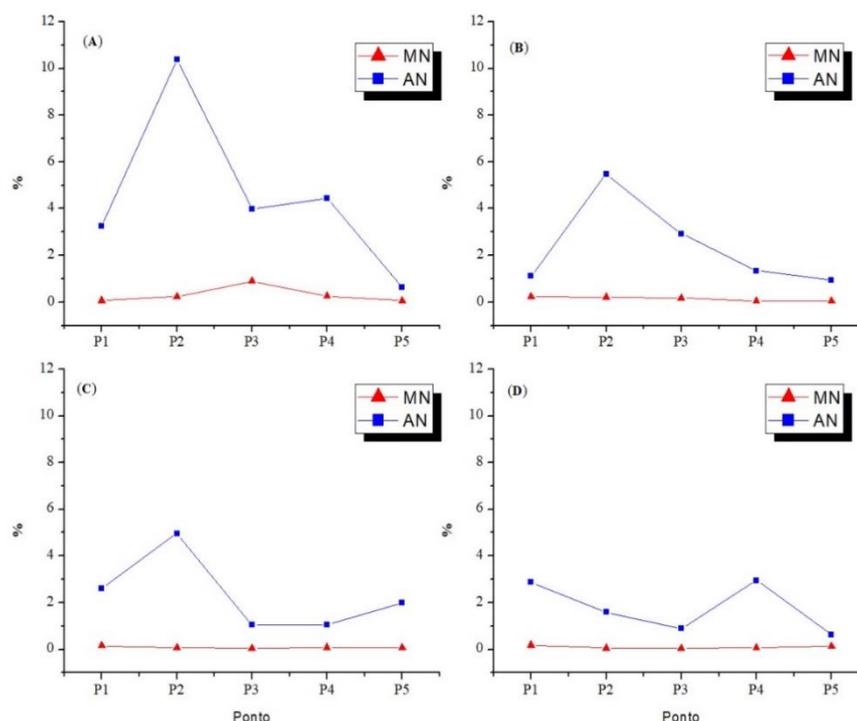


Figura 4 – Frequência (%) de MN e AN em 10 peixes/estação. Sendo A (Primavera) B (Verão) C (Outono) e D (Inverno). **Fonte:** Autor.

Os dados foram submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis para frequência de MN e AN. As frequências de MN e AN observadas não diferem entre as estações, pois $p > 0,05$. Ainda, as médias de MN e AN foram submetidas ao teste de Tukey para comparação múltipla (Tabela 2), onde, os resultados corroboram com o teste Kruskal-Wallis.

Tabela 2 – Tabela de Tukey das médias de MN e AN em 50 peixes/estação (3.000 células analisadas por peixe).

Estação	Média MN*	Média AN*
Primavera	91,4 a	1532 a
Verão	45 a	894 a
Outono	26,4 a	827.2 a
Inverno	26,4 a	585.8 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Para avaliar uma possível correlação entre a incidência de MN e AN, os dados das respectivas variáveis foram submetidos ao teste de Correlação Linear de Pearson (Figura 5). O valor de r foi próximo a 0, demonstrando que não há correlação entre o surgimento de MN e AN.

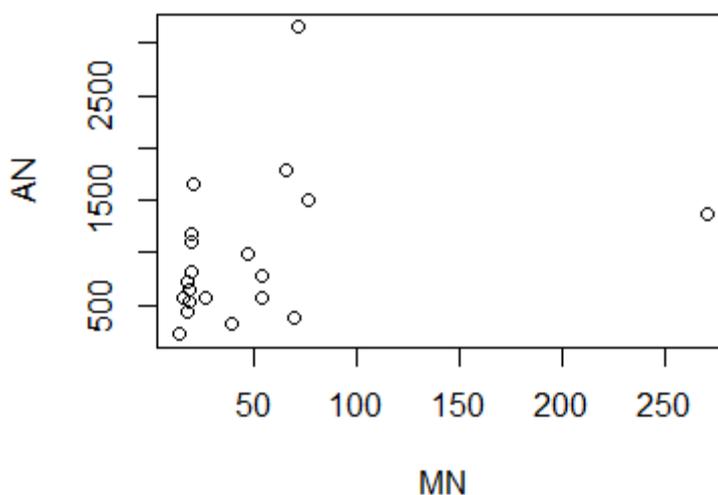


Figura 5 – Diagrama de dispersão da correlação linear de Pearson ($r= 0.3121145/ p= 0.1803$). **Fonte:** Autor.

Entre as espécies coletadas, o *Astyanax sp.* apresentou as maiores frequências de MN, exceto no P4 (Figura 6).

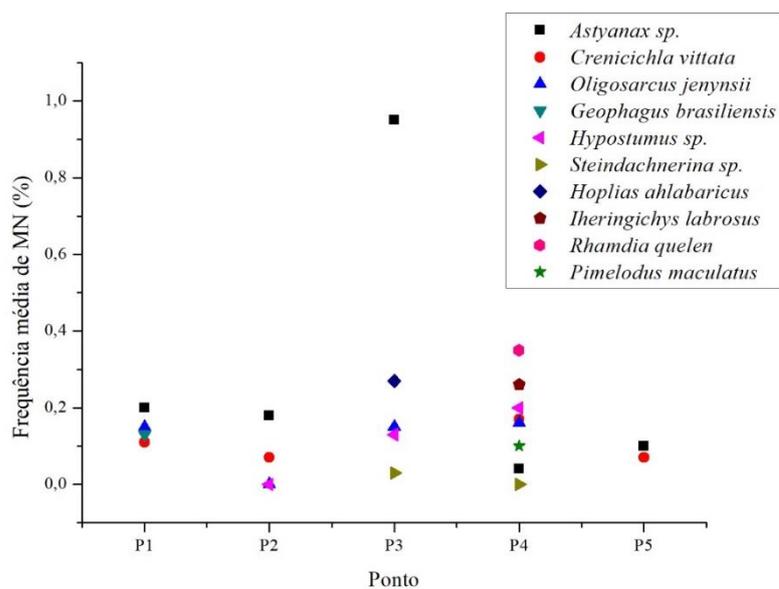


Figura 6 – Frequência média de MN observada nos peixes/pontos coletados.

A Figura 7, diferentemente do resultado de MN, mostra que o *Astyanax* sp, não difere dos outros peixes quanto a presença de AN.

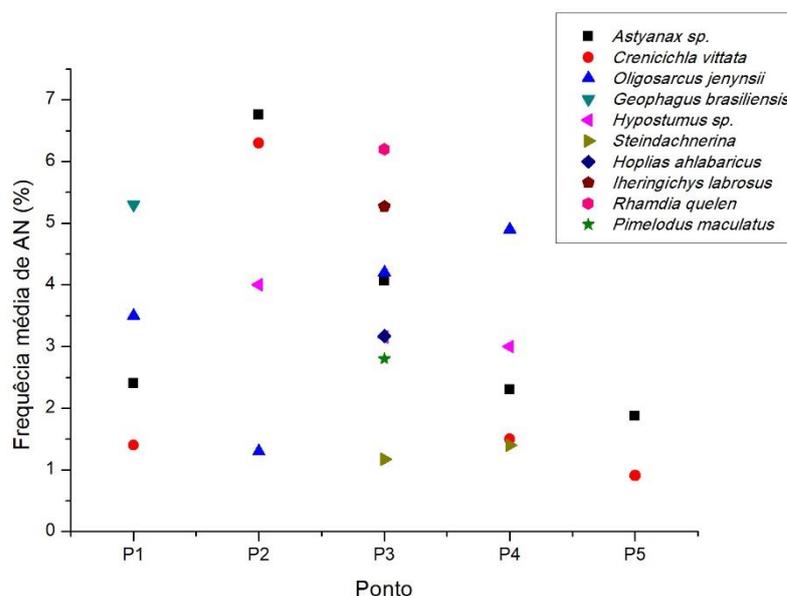


Figura 7 – Frequência média de AN observada nos peixes/pontos coletados.

4 Discussão

O estudo mostra que nos pontos P1 e P2, onde a antropização é mais significativa verificou-se maior incidência de MN e AN em relação a outros pontos menos impactados.

A degradação da mata ciliar é evidente em todos os pontos onde foram feitas as coletas. Os pontos P1 e P2, estão próximos das cidades com maior número de habitantes, além disso, ocorre o despejo de efluentes urbanos e industriais em rios tributários ao Ijuí. A presença de áreas agricultáveis é evidente em todos os pontos, com predomínio de monocultura e pecuária que avança sobre a mata ciliar até as margens do rio.

A mata ciliar desempenha função de filtro natural para os corpos hídricos, barrando contaminantes carregados pelas águas pluviais e pelo solo, através de processos como erosão e assoreamento, além de ser habitat de inúmeras espécies de aves, répteis e mamíferos que utilizam o rio como fonte de alimento (LOWRANCE et al., 1997).

Os peixes analisados apresentam níveis não significativos de células micronucleadas (MN), com exceção do Ponto 3 na primavera, que apresenta um índice superior ao esperado que é de 0,2%, considerado um nível de formação

espontânea de MN (MANAS et al., 2009), essa maior frequência de MN no P3 reflete o estado de conservação do local, que se caracteriza pela inexistência de mata ciliar, presença de atividades suinícolas e plantio de monoculturas. Além disso, a primavera compreende um período chuvoso que aumenta o processo de escoamento superficial e depósito de resíduos nos leitos dos rios, o que pode explicar esse aumento em relação aos outros períodos analisados.

Heddle et al. (1991) destacam que MNs são respostas a curto prazo a uma substância genotóxica, de modo que a sua expressão depende da intensidade a exposição a um xenobiótico e independe da duração dessa exposição. Outro fator a ser considerado é que segundo Al-Sabti e Metcalfe (1995) a máxima indução de MN ocorre de um a cinco dias de exposição, que por sua vez concorda com os resultados de Grisolia e Cordeiro (2000), que obtiveram maiores níveis de indução de MN entre dois e sete dias de exposição a mutagênicos e, uma diminuição da frequência a partir do décimo quarto dia da exposição.

Desta forma, os resultados obtidos podem refletir uma janela de tempo em que os peixes capturados não apresentam níveis significativos de MN. Podemos também pontuar que a frequência de MN dentro de uma população de células é altamente dependente da cinética da proliferação celular. Essa cinética pode variar de acordo com a espécie e com o tecido avaliado. Desta forma não é possível estabelecer tempo ideal para uma exposição e consequente aparecimento de MN. Em função dessas variáveis é importante a análise conjunta de NA (GRISOLIA e CORDEIRO, 2000).

Observa-se que presença de AN foi superior à presença de micronúcleos, com frequência aumentada no ponto que está próximo à área urbana que compreende o P2 (Figura 4). O aumento das ANs condiz com outros estudos que demonstraram o mesmo comportamento quando esses testes são aplicados, como, nos achados de Carrola *et al.* (2014) que identificaram maior frequência de AN do que MN, em eritrócito de peixes de três rios de Portugal; Grisolia *et al.* (2009) avaliaram a presença de MN e AN em eritrócitos de diferentes espécies de peixes do lago Paranoá/DF e, evidenciaram maior frequência de AN; Montozo et al. (2015) verificaram que o fungicida Ridomil quando em contato com os peixes, induz maior frequência de AN do que MN.

As análises mostram alterações do tipo blebbed, lobbed, notched, vacuolated, segmented, as quais, corroboram com as descritas por Carrasco *et al.* (1990). As AN são alterações provocadas pelos mesmos agentes que induzem os MN, porém, os

mecanismos moleculares que acarretam as alterações não foram desvendados até o momento (PALHARES; GRISOLIA, 2002), mas acredita-se que estão relacionados a erros que ocorrem durante os processos mitóticos (FENECH, 2000). Apesar, dos mecanismos afetados que induzem essas alterações nucleares serem os mesmos, não há correlação entre o surgimento de MN e AN conforme os resultados na Figura 5.

Ayllon e Garcia-Vasquez (2001) sugerem que as ANs sejam incluídas nas análises de genotoxicidade em peixes por tornarem o estudo mais confiável, isto porque testes de bioensaio com peixes podem apresentar respostas diferentes a diversos compostos. Segundo estes autores, por exemplo, a ciclofosfamida induz aumento de MN e AN em *Oncorhynchus mykiss*, enquanto que a mitomicina induz somente o aumento na frequência de AN. Desta maneira, ao observar os dados desse trabalho, pode-se inferir que o ambiente escolhido para os testes possui fatores que induzem preferencialmente eventos de AN.

O maior índice de AN correspondera ao P2 nas estações primavera, verão e outono (Figura 4A;4B;4C) fornecendo indícios que a sazonalidade pode aumentar os níveis de xenobióticos e contaminantes nos períodos de chuva por escoamento superficial, e nos períodos de seca, aumentando a concentração dos mesmos (CARROLA *et al.* 2014).

Outro indício da maior frequência de AN no P2, é a proximidade da cidade com sua descarga de rejeito urbano e industrial. Os rejeitos urbanos das residências compreendem uma vasta diversidade de substâncias que abrange químicos orgânicos e inorgânicos (GOUVEIA, 2012), já os rejeitos industriais, variam em sua composição devido à fatores que abrangem desde a matéria prima utilizada, processos de industrialização empregados. Desta forma esses rejeitos podem conter substâncias com grande potencial poluidor que mesmo passando por tratamento, dentro das normas estabelecidas por lei, não garante sua não interação e ações sobre os organismos no meio ambiente (BUSS *et al.* 2003).

O teste do MN em conjunto com as AN em sangue periférico de peixes, torna-se uma ferramenta eficaz no monitoramento da qualidade dos ambientes aquáticos. A indução predominante de qualquer tipo de micronúcleo pode ser usada para classificar a atividade química nas categorias clastogênica ou aneugênica (OBIAKOR *et al.*, 2014). Os clastogênicos induzem quebra, rearranjos e danos cromossômicos através de interações com o DNA para formar fragmentos acêntricos de cromossomos

(SALEH; SARHAN, 2007). Fragmentos de cromátides ou cromossomos que não são incorporados nos núcleos filhos recém-formados formam os MNs, já os aneugênicos, causam perda cromossômica principalmente através da interferência com o aparelho do fuso mitótico (ZELAZNA et al., 2011).

As espécies do gênero *Astyanax* demonstram maior sensibilidade para a presença de MN do que as demais espécies coletadas neste estudo. A análise de espécies de peixes distintas que habitam o mesmo ambiente é indicado por demonstrar sensibilidade diferente, assim, ampliando as respostas aos genotóxicos (GRISOLIA et al., 2007). Entre as espécies coletadas, o *Astyanax* sp. apresentou as maiores frequências de MN, nos P1, P2, P3 e P5 (Figura 6), que reforça ser um organismo sensível para a presença de substâncias genotóxicas e ser bom bioindicador já que desempenha importante função ecológica possuindo ampla alimentação, oportunista (AGOSTINHO; GOMES, 1997), habitar diferentes ecossistemas aquáticos e possuir populações naturais numerosas (SANCHEZ-GALAN et al., 1999).

O mesmo não ocorre quando é analisada a presença de AN. Os indivíduos da espécie *Astyanax* sp não apresentam diferença em relação às outras espécies avaliadas, o que reforça o fato de que não há correlação entre os dois eventos (MN e AN), embora surjam através dos mesmos erros nos processos do ciclo celular. Diante disso, os dados corroboram a proposta de usar peixes desse gênero como organismo bioindicador, já que eles possuem versatilidade ecológica, capacidade de ajuste a diversas situações ambientais, competência adaptativa exploratória e utiliza estratégias diferenciadas na estrutura populacional (SANCHEZ-GALAN et al., 1999).

Os baixos índices de MN e altos de AN, indicam que, nos pontos do rio em estudo há presença de fatores que interagem com células eucarióticas, influenciando principalmente os eventos do ciclo celular.

5 Conclusão

Todos os cinco pontos do Rio Ijuí mostram sinais de antropização, sem mata ciliar, presença de agricultura, agropecuária e área urbana.

Nos peixes analisados nos cinco pontos do Rio Ijuí, não houve presença significativa de MN, exceto no Ponto 3, na primavera, em que o índice se mostra superior ao esperado.

Os dados coletados de células com AN, mostram que seus valores são maiores que o índice de células com MN.

A presença de anormalidades nucleares é maior nos peixes do Ponto 2 em três estações (primavera, verão e outono), fornecendo indícios de que os fatores de antropização deste local favorecem o surgimento dessas alterações.

Não há correlação entre a presença de MN e AN nas células analisadas.

A espécie *Astyanax* sp. se mostra mais sensível à qualidade da água do que as outras espécies coletadas.

No intervalo de tempo desse estudo, as águas do Rio Ijuí não apresentam potencial genotóxico significativo para induzir MN, mas sim AN. Isso não exclui o fato de que o rio esteja antropizado e em curso de proporcionar aumento de MNs em eucariotos num futuro próximo.

Referências

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo. Maringá: **EDUEM**, 1997.

AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after water-borne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85C, p.5-9, 1986.

ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. *In vivo* cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74, p. 50-156, 2011.

Ayllon, F.; Garcia-Vazquez, E. Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 49, 221-225, 2001.

BUSS, F. D.; BAPTISTA, F. D.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, mar-abr, 2003.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123–2136, 1990.

CARROLA, J.; SANTOS N.; ROCHA, J. M.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; PARDAL, M. A.; MONTEIRO, R. A. F. ; ROCHA, E. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries--Portugal. **Environ Sci Pollut Res Int**, 2014. **21**(9): p. 6057-68.

CONAMA, CONSELHO NACIONAL DE DEFESA DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, 2005.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**. v. 455, p. 81-95. 2000.

GOUVEIA, N. Solid urban waste: socio-environmental impacts and prospects for sustainable management with social inclusion. **Ciência & Saúde Coletiva**, 17(6):1503-1510, 2012.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 235-239, 2000.

GRISOLIA, C. K.; RIVERO, C. L. G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I. C. R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, 32, p. 138-143, 2009.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**, v. 18, p. 277 – 291, 1991.

HOOFTMAN, R. N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygnaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Res**. n. 104, p. 147-152, 1981.

LOWRANCE, R.; ALTIER, L. S.; NEWBOLD, J. D.; SCHNABEL, R. R.; GROFFMAN, P. M.; DENVER, J. M.; CORRELL, D. L.; GILLIAM, J. W.; ROBINSON, J. L.; BRINSFIELD, R. B.; STAVELAND, K. W.; LUCAS, W.; TODD, A. H. Water Quality Functions of Riparian Forest Buffers in Chesapeake Bay Watersheds. ***Environmental Management***. 1997. 687-712 doi.10.1007/s002679900060

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M.; *Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment*. ***Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.***, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, out./dez. 2010

MAÑAS, F.; PERALTA, L.; RAVIOLO, J.; OVANDO, H. G.; WEYERS, A.; UGNIA, L.; CID, M. G.; LARRIPA, I.; GORLA, N. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. ***Environmental Toxicology and Pharmacology***. 28, 37e41.

MATOZO, F.; TUREK, J. A.; NOLETO, R. B. Avaliação dos efeitos genotóxicos do fungicida ridomil em *Astyanax altiparanae* (PISCES, CHARACIFORMES). ***Luminária*** União da Vitória – PR, v.17 n.01 p. 121-131 jan-jun. 2015.

MOREIRA, T. N.; NUNES, E. A.; LEAL, M. A.; SCHULZ, U. H.; DE LEMOS, C. T. Influência dos Métodos de Captura de Peixes na Avaliação Genotóxica Utilizando Diferentes Tecidos de *Astyanax fasciatus* (Osteichthyes, Characidae). ***J. Braz. Soc. Ecotoxicol.***, v. 5, n. 1, 2010.

OBIAKOR, M.; OKONKWO, J.; EZEONYEJIAKU, C. Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***. 775–776. 20-30. 2014. Doi.10.1016/j.mrgentox.2014.09.010.

PALHARES, D.; GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. ***Genet. Mol. Biol.***, São Paulo , v. 25, n. 3, p. 281-284, 2002 .

SALEH, K.; SARHAN, M. Clastogenic analysis of chicken farms using micronucleus test in peripheral blood, ***J. Appl. Sci.*** 3 (2007) 1646–1649.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A.R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: Differential sensitivity to heavy metals. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, v. 43, p. 301-304, 1999.

SILVA, C. A.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**. Patos de Minas-MG. UNIPAM, n. 7, vol. 1: 167-179, ago. 2010

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on Some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. Bull. **Environ. Contam. Toxicol.** (2006) 76:505–511. Inc. DOI: 10.1007/s00128-006-0949-3

SISINNO, C. L. S.; FILHO-OLIVEIRA, E. C. **Princípios de Toxicologia Ambiental**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Interciência. 2013.

ZELAZNA, K.; RUDNICKA, K.; TEJS, S. In vitro micronucleus test assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons, **Environ. Biotechnol.** 7 (2011) 70–80.

CAPÍTULO 2

HISTOPATOLOGIA EM PEIXES DE ÁGUA DOCE EXPOSTOS A AMBIENTES ANTROPIZADOS

HISTOPATOLOGIA EM PEIXES DE ÁGUA DOCE EXPOSTOS A AMBIENTES ANTROPIZADOS

Resumo

Avaliação histopatológica em peixes tem demonstrado ser um valioso instrumento para detectar a presença de xenobióticos em um corpo hídrico, pois a existência dos mesmos, podem desencadear uma série de danos a nível tecidual e celular. Tais danos são passíveis de observação através do emprego de técnicas específicas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo, avaliar a ocorrência de lesões no tecido das brânquias e hepático em peixes de água doce, expostos a ambientes antropizados. O corpo hídrico utilizado para esse estudo foi o Rio Ijuí, o qual, está situado em meio a áreas agrícolas e urbanizadas. Os resultados obtidos demonstraram predominância de alterações moderadas em brânquias e severas no fígado, em todos os pontos analisados, revelando a ocorrência de xenobióticos nas águas do Rio Ijuí, capaz de induzir lesões comprometedoras em órgãos vitais para os peixes.

Palavras-chave: bioindicador, xenobióticos, fígado, brânquias.

HISTOPATHOLOGY IN FRESH WATER FISH EXPOSED TO ANTROPHED ENVIRONMENTS

Abstract

Histopathological evaluation in fish has been shown to be a valuable tool to detect the presence of xenobiotics in a water body, since their existence can trigger a series of damages at the tissue and cellular level. Such damages might be observed through the use of specific techniques. Therefore, this study aims to evaluate the occurrence of lesions in the gills and hepatic tissue in freshwater fish exposed to anthropic environments. The water body used for this study was the Ijuí river, which is located in the middle of agricultural and urban areas. The results showed a predominance of moderate changes in gills and severe changes in the liver in all analyzed points, revealing the occurrence of xenobiotics in the waters of the Ijuí river, capable of inducing compromising lesions in fish vital organs.

Keywords: bioindicator, xenobiotic, liver, gill.

1 Introdução

Os peixes possuem importante função ecológica para a manutenção da vida nos ambientes aquáticos e são considerados sensíveis às mudanças no seu habitat. Diariamente, estão expostos à uma complexa carga de poluentes oriundos das atividades humanas, o que se torna um risco constante para esses organismos. Inúmeros estudos apontam que os principais poluentes que podem interagir e afetar a integridade dos organismos aquáticos originam-se dos resíduos industriais, domésticos e agrícolas. Esses poluentes podem ter ação sobre o crescimento, taxa de fecundidade e ainda, possuir ação genotóxica, efeitos sobre fisiologia e o comportamento (MELETTI et al., 2003).

Para avaliar os níveis de contaminação de um ambiente aquático, é indicado, além dos tradicionais parâmetros físico-químicos, o uso de parâmetros biológicos, que baseiam-se na avaliação das respostas biológicas dos organismos em relação ao meio onde vivem (BUSS et al., 2003), evidenciando a presença de xenobióticos no local em que habitam. Com isso, os peixes são excelentes bioindicadores, visto que, um bioindicador ideal deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar resistência relativa aos contaminantes, além de ser abundante, de fácil captura e adaptar-se aos ensaios laboratoriais (AKAISHI, 2004; LINS et al. 2010).

Avaliação histopatológica tem sido um valioso instrumento biomarcador para avaliar a presença de xenobióticos em corpos hídricos. Por definição, os biomarcadores são alterações biológicas que podem estar relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de compostos químicos do ambiente (PEAKALL, 1994; VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996). Essa técnica permite uma análise específica dos órgãos a nível tecidual e celular, visto que eles são afetados por estressores ambientais sob condições *in situ*. Além disso, a histopatologia é um método eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (BERNET et al., 1999).

Em peixes, estudos histológicos são direcionados para órgãos chave, que são alvos da ação dos xenobióticos, como as brânquias e o fígado. As brânquias exercem funções vitais nos peixes. Através da sua atividade ocorrem os processos de trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados (LIMA et al. 2011; MACHADO; FANTA, 2003). São afetadas por estarem

em contato direto com substâncias através da água, como também, constituir uma das vias de entrada dos xenobióticos.

Já o fígado dos peixes possui função similar aos demais vertebrados, desse modo, é responsável pelo metabolismo de proteínas, lipídeos, carboidratos, pela biotransformação de substâncias tóxicas com o objetivo de eliminá-las do organismo (PARIS-PALACIOS et al., 2000) além de apresentar propriedades de bioacumulação, podendo estocar substâncias tóxicas quando presentes em altas concentrações. As principais células são os hepatócitos, os quais, são responsáveis pela síntese, secreção, armazenamento, biotransformação e metabolismo de substâncias, (COSTA et al. 2012).

O contato desses órgãos com os xenobióticos, desencadeia uma série de danos estruturais nas células que os compõem, afetando assim, as atividades desempenhadas acarretando em um risco para a vida desses organismos (MELETTI et al., 2003).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de lesões no tecido branquial e hepático em peixes de água doce, expostos a ambientes antropizados e possível deposição de cobre em fígado e brânquias.

2 Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), sob o protocolo nº 23205.000642/2018-45.

2.1 Local de estudo e coleta dos peixes

O corpo hídrico utilizado para este trabalho foi o Rio Ijuí, cuja localização transpõe a região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, sob as coordenadas 27°45' e 26°15' de latitude Sul e 53°15' e 56°45' de longitude Oeste, no qual, foram delimitados cinco pontos de coleta (Figura 1). Onde, P1 localiza-se sob as coordenadas 28°19'10,81" S e 53°58'54,52" W, nas margens da RS 342, próximo à cidade de Ijuí-RS. É o ponto mais próximo da nascente (± 50 Km) entre a junção dos rios Palmeira, Caxambu e Fiúza; P2 localiza-se sob as coordenadas 28°18'50.74"S e 54°18'38.39"W, após a cidade de Santo Ângelo-RS; P3 localiza-se sob as coordenadas 28°11'53.20"S e 54°41'25.47"W, próximo a cidade de Cerro Largo-RS;

P4 localiza-se sob as coordenadas 28°08'13.35"S e 55°03'50.77"W, próximo a cidade de Roque Gonzales-RS; P5 localiza-se sob as coordenadas 28°03'29,0"S e 55°07',39,0"W, é o ponto próximo do Rio Uruguai.

Foram realizadas quatro coletas uma em cada estação sazonal anual, compreendendo a primavera de 2017, verão, outono e inverno de 2018, capturando 10 espécimes de peixe por estação, totalizando 40 peixes por ponto independente da espécie. A captura foi efetuada com anzóis e isca viva.

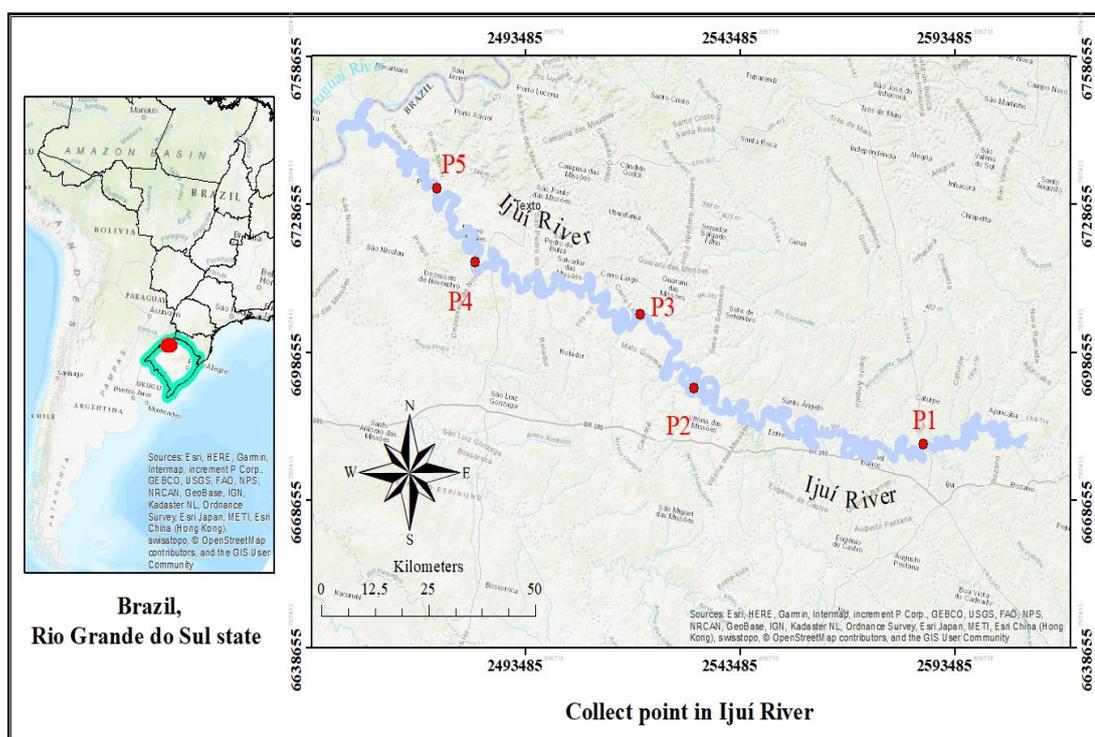


Figura 1 – Localização dos pontos de coleta do estudo. **Fonte:** elaborado pelo autor através do ArcMap®.

Foram realizadas quatro coletas, uma em cada estação sazonal anual (Primavera, Verão, Outono e Inverno), capturando 10 espécimes de peixe por estação, totalizando 40 peixes por ponto. A captura foi efetuada com anzóis e isca viva. Posteriormente, os peixes foram anestesiados por imersão em solução de Eugenol 3% e sacrificados por decapitação para a retirada das amostras.

2.2 Parâmetros Físico-químicos da água e Determinação de Cu em brânquias fígado

Os parâmetros físico-químico temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade (COD), sólidos dissolvidos totais (SDT) e salinidade (SAL) foram aferidos através de sonda multiparâmetro em todos os pontos de coleta.

Para a análise de Cu, amostras de fígado e das brânquias de cada peixe foram armazenado em tubos Falcon, previamente esterilizados e identificados, após, acondicionados em caixa térmica com gelo e encaminhado para o laboratório e mantido em freezer até procedimento de determinação do metal. A determinação de cobre nas amostras foi realizada em Espectrômetro de Absorção Atômica com chama modelo SavantAA – GBC, no Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Cerro Largo, RS.

2.3 Processamento e análise histológica

Para a análise histológica, as brânquias e o fígado dos peixes foram extraídos e dimensionado em tamanho de 2 cm x 2 cm, acondicionados em cassete histológico, emergidos em formol 10% para fixação por 48 horas e encaminhados para o Laboratório de Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Cerro Largo, RS. Após a fixação, as brânquias foram descalcificadas em solução de ácido etilondiaminotetracético (EDTA 10%) por 96 horas. Posteriormente, ambas amostras passaram pelas seguintes etapas: desidratação alcoólica em concentrações crescente de etanol 70% a 100%, imerso em Xilol, e impregnação em parafina. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo na espessura de 5 µm, alocados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram observadas em microscópio óptico trinocular Olympus® CX31.

As alterações histológicas em tecido hepático e branquial foram observadas seguindo a classificação proposta por Poleksic e Mitrovictutundzic (1994) de acordo com o estágio de severidade, onde, o estágio I corresponde às alterações consideradas leves, aquelas que alteram a função do tecido; o estágio II condiz às alterações moderadas, isto é, aquelas que alteram parcialmente a função do tecido, já o estágio III representa as alterações severas, aquelas que alteram totalmente a função do tecido (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação das alterações histopatológicas do fígado e das brânquias quanto a severidade das lesões de acordo com Poleksic e Mitrovic-tutundzic (1994) com adaptações.

Estágio	Alterações histológicas em fígado	Alterações histológicas em brânquias
I	Núcleo na periferia da célula	Hipertrofia do epitélio lamelar
	Deformação do contorno celular	Elevação do epitélio lamelar
	Deformação do contorno nuclear	Hiperplasia do epitélio lamelar
	Hipertrofia celular	Desarranjo lamelar
	Hipertrofia nuclear	Dilatação do seio sanguíneo
	Atrofia celular	Constricção do seio sanguíneo
	Atrofia nuclear	Congestão vascular
	Centros de melanomacrófagos	
	Vacuolização citoplasmática	
	Vacuolização nuclear	Fusão incompleta das lamelas
II	Degeneração citoplasmática	Fusão completa de algumas lamelas
	Degeneração nuclear	Fusão completa de várias lamelas
	Rompimento celular	Ruptura do epitélio
	Estagnação biliar	Aneurisma lamelar
	Hiperemia	
III	Necrose focal	Destrução do epitélio lamelar
		Congestão vascular Necrose

Com base nessa classificação, calculou-se o Índice de Alterações Histológicas (IAH), através da seguinte equação: $IAH = 10^0 \cdot \sum SI + 10^1 \cdot \sum SII + 10^2 \cdot \sum SIII$ onde, $\sum SI$, $\sum SII$ e $\sum SIII$ = somatório do número de alterações de estádios I, II e III; 10^0 = múltiplo da fase I; 10^1 = múltiplo da fase II; 10^2 = múltiplo da fase III.

Obtidos os valores do IAH classificou-se as lesões do órgão em quatro categorias: funcionamento normal IAH de 0 a 10; alterações leves IAH de 11 a 20; alterações moderadas IAH de 21 a 50; lesões severas IAH de 51 < 100.

2.4 Análise estatística

As médias dos valores do IAH, foram comparados entre os pontos e entre as estações, através do teste t de comparação das médias de amostras independentes, adotando $p \leq 0,05$ como significativo.

3 Resultados

Os parâmetros físico-químicos (Tabela 1), das quatro coletas sazonais e nos cinco pontos, apresentam-se em conformidade com a resolução nº 357 (CONAMA, 2005) enquadrando-se em classe 2 para água doce.

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos parâmetros Físico-Químico das quatro estações sazonais nos cinco pontos de coleta.

Ponto	Média e desvio padrão dos parâmetros Físico-Químicos					
	OD mg/L	pH	COND µS/cm	SLDT mg/L	SAL %	T°C
P1	6,1±0,3	7,18±0,1	87,6±10,1	60,85±9,2	0,04±0,01	20,1±2,3
P2	6,6±0,8	7,24±0,3	115,1±12,0	81,2±5,9	0,06±0,01	17,5±5,9
P3	6,5±0,9	6,8±0,01	124,5±2,6	90,3±15,1	0,06±0,01	19,2±9,5
P4	6,3±1,7	7,4±0,1	119,4±17,6	83±20,6	0,06±0,01	17,6±8,1
P5	6,3±1,6	7,4±0,05	194±1,6	128,9±7,1	0,09±0,04	17,6±10,3
CONAMA 3357/2005	>5,0	6,0 a 9,0	60>	<500	<0,5	

*OD=oxigênio dissolvido; COND=condutividade; SLDT=sólidos dissolvidos totais; SAL= salinidade.

A análise de Cu nas brânquias e nos fígados dos peixes coletados, indicam valores dentro dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde de no máximo 30 µg g⁻¹ (Figura 2). Embora os valores encontrados estejam abaixo do estabelecido, é possível observar uma variação sazonal nos níveis do metal, com destaque para o

verão do P3, onde os níveis de Cu nas brânquias chegaram a 26 $\mu\text{g/g}$ e nos fígados coletados na primavera do P4, o qual, foi o maior nível de Cu detectado para o órgão.

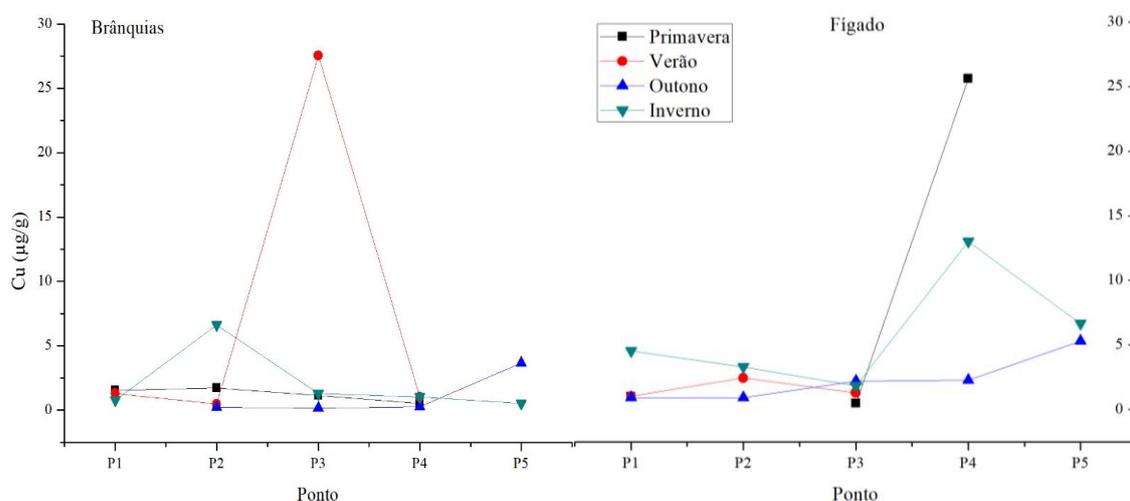


Figura 2 – Variação sazonal de cobre identificado nas brânquias e fígado dos peixes em cada ponto de coleta.

O IAH das brânquias variou de 10 no P5 a 90 no P1, indicando que as lesões foram de grau leve a severas (Figura 3). As lesões severas foram observadas nos P1 na estação verão e no P5 na estação inverno.

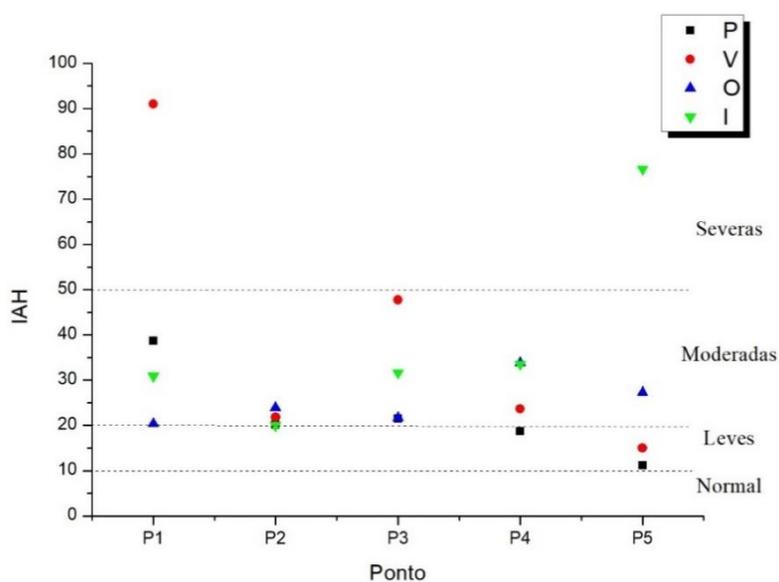


Figura 3 – Média do IAH (Índice de Alteração Histológica) observado em brânquias nas quatro coletas sazonais; P – primavera; V – verão; O – outono; I - inverno (10 peixes por coleta). **Parâmetros IAH:** 0-10 = funcionamento normal do órgão; 11-20 = alterações leves; 21-50 = alterações moderadas; 51-<100 = lesões severas.

O IAH dos fígados variou entre 30 no P4 a 115 no P2 indicando que as lesões foram de moderadas a severas. As lesões de grau moderado, foram observadas na estação do verão nos pontos P2 e P4 e as demais estações apresentaram IAH de grau severo, indicando que a função do tecido hepático dos peixes analisados está totalmente comprometida (Figura 4).

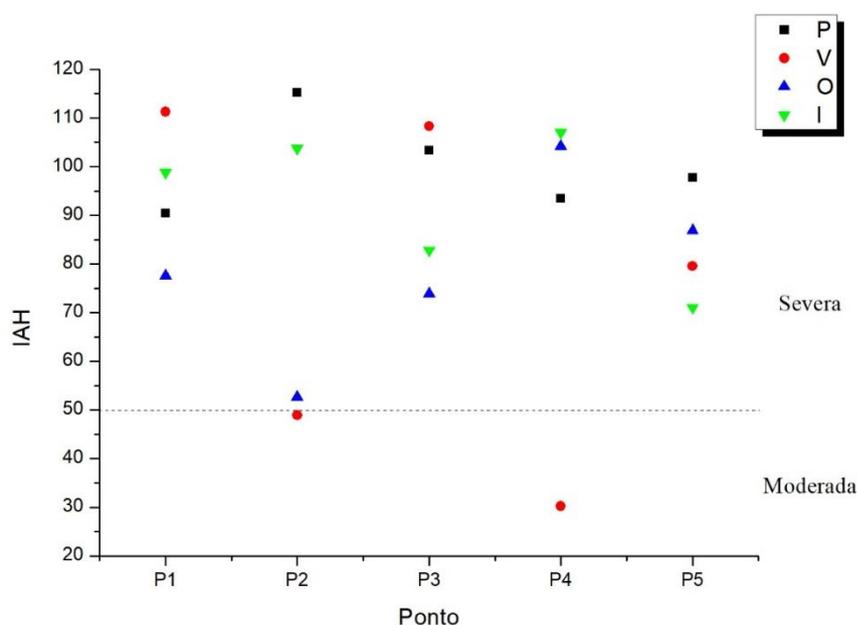


Figura 4 – Média do IAH (Índice de Alteração Histológica) observado nos fígados nas quatro coletas sazonais; P – primavera; V – verão; O – outono; I - inverno (10 peixes por coleta). **Parâmetros IAH:** 0-10 = funcionamento normal do órgão; 11-20 = alterações leves; 21-50 = alterações moderadas; 51-<100 = lesões severas.

O teste estatístico (teste t) aplicado para IAH das brânquias, indicou que houve diferença significativa entre os pontos P1 e P2; P1 e P4; P2 e P3; P2 e P4 (Tabela 3). Já os fígados, não apresentaram diferença significativa entre as médias (Tabela 3).

Tabela 3 – Tabela dos valores de p gerado pelo teste t entre os pontos de coleta referente as médias do IAH das brânquias e fígado.

Fator ponto de coleta	Brânquias $p=$	Fígado $p=$
P1xP2	0,002*	0,142
P1xP3	0,127	0,130
P1xP4	0,031*	0,291

P1xP5	0,315	0,254
P2xP3	0,029*	0,211
P2xP4	0,012*	0,320
P2xP5	0,101	0,210
P3xP4	0,475	0,165
P3xP5	0,783	0,122
P4xP5	0,453	0,173

*Significativo = $p < 0,05$

Entre as estações, em relação às brânquias, houve diferença significativa no P1 entre: verão e primavera; verão e outono; verão e inverno; outono e inverno. No P3, apenas o outono e verão obtiveram diferença significativa. No P5, o Inverno diferiu significativamente das demais estações e Primavera e verão diferem significativamente do outono (Tabela 4). Em relação aos fígados, no P2 houve diferença significativa entre primavera e verão; primavera e outono; inverno e verão; inverno e outono. No P4, a primavera, outono e inverno diferem significativamente com o verão (Tabela 4).

Tabela 4 – Tabela dos valores de p , gerado pelo do teste t entre as estações nos pontos de coleta referente as médias do IAH das brânquias e do fígado.

Estações	Brânquias - Ponto de Coleta					Fígado – Ponto de coleta				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
P x V	0,042*	0,179	0,212	0,593	0,219	0,154	0,002*	0,164	0,003*	0,124
P x O	0,690	0,449	0,150	0,131	0,021*	0,176	0,001*	0,275	0,385	0,187
P x I	0,277	0,101	0,531	0,124	0,029*	0,241	0,182	0,387	0,497	0,253
O x V	0,003*	0,585	0,007*	0,102	0,002*	0,195	0,912	0,115	0,009*	0,327
O x I	0,012*	0,349	0,038	0,964	0,052*	0,168	0,024*	0,167	0,317	0,419
V x I	0,007*	0,559	0,286	0,100	0,021*	0,127	0,031*	0,152	0,003*	0,771

*Significativo/ P=primavera, V=verão, O=outono, I=inverno

As brânquias localizam-se na cavidade opercular e são divididas em arcos de onde surgem os filamentos branquiais com suas fileiras de lamelas secundárias. As lamelas são compostas por células pilar e canais sanguíneos e, revestidas por células epiteliais (Figura 5).

Os danos observados com maior frequência nas brânquias foram do estágio I: elevação do epitélio (Figura 6A), proliferação de células cloreto (Figura 6B); do estágio II: fusão parcial (Figura 6C) e fusão completa das lamelas (Figura 6D).

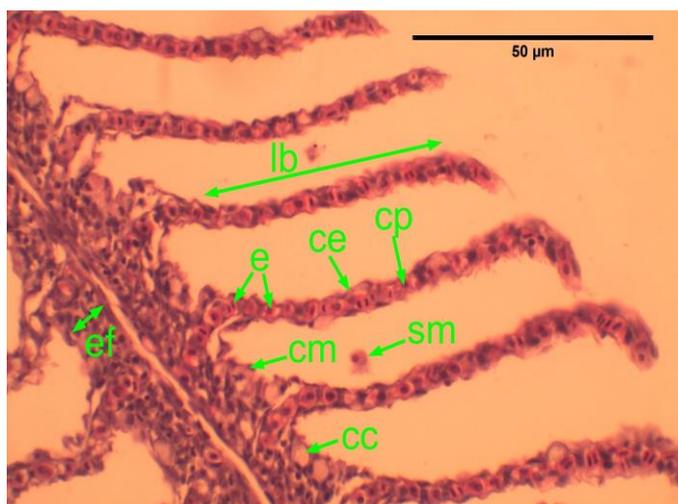


Figura 5 – Brânquia normal (lb – lamela branquial; ef – epitélio filamento; e – eritrócito; ce – célula epitelial; cp – célula pilar; cm – célula mucosa; sm – secreção de muco; cc – célula cloreto)

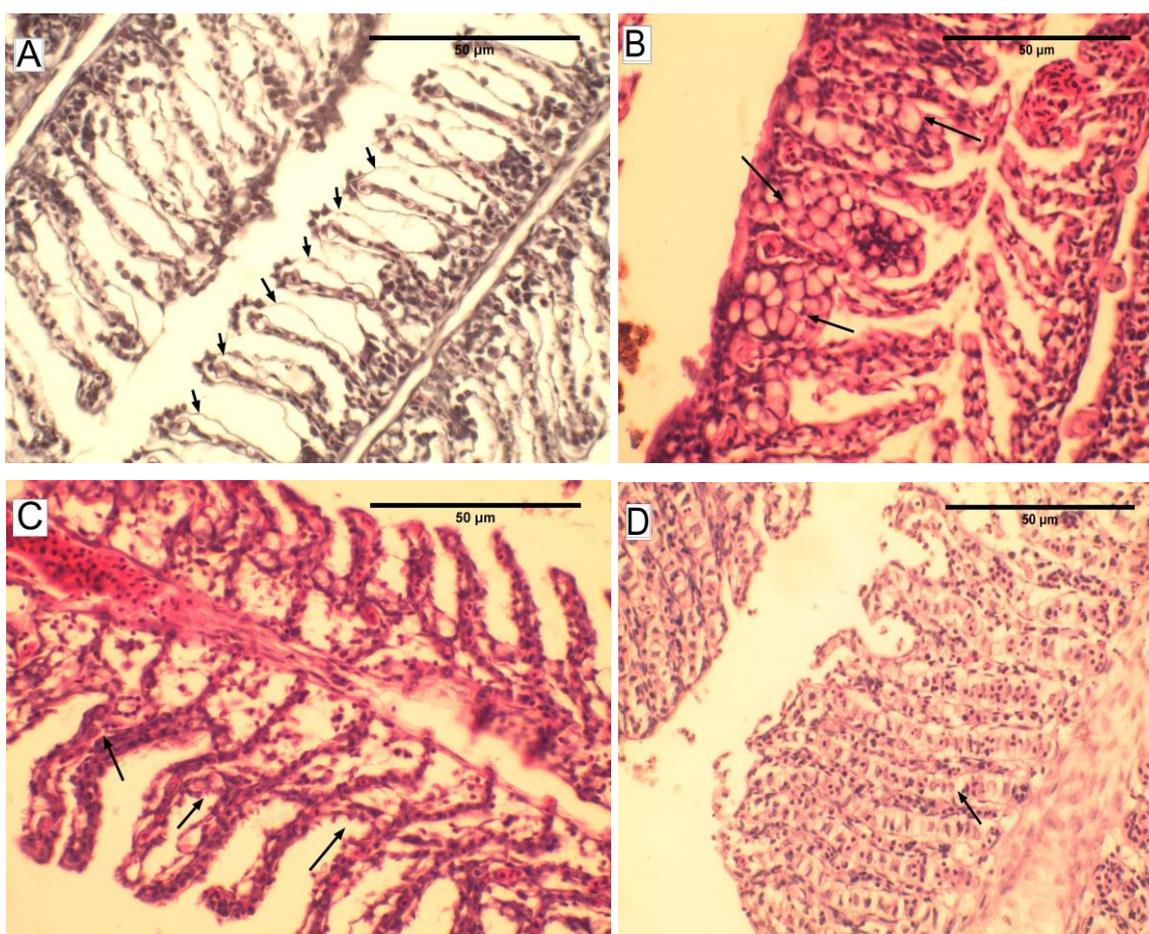


Figura 6 - Alterações histológicas observadas em brânquias dos peixes do Rio Ijuí. Elevação epitelial – A; proliferação de cc – B; fusão parcial – C; fusão completa – D. **Fonte:** elaborado pelo autor.

A Figura 7 evidencia as características histológicas normais do tecido hepático, com a estrutura dos cordões e disposição dos hepatócitos, os vasos e o hepatopâncreas. Nos fígados, os danos mais observados foram a vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, vacuolização citoplasmática, estagnação biliar e hiperemia, que compreendem o estágio II, e o dano necrose focal, de estágio III (Figura 8).

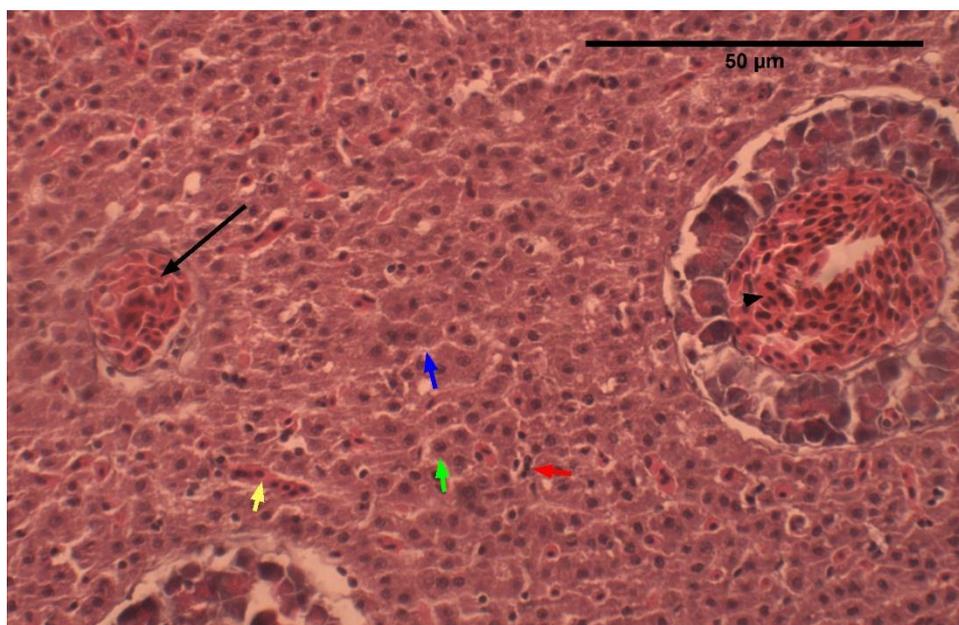


Figura 7 – (A) Fígado normal – hepatócito – seta verde; capilar sinusóide – seta azul; célula de kupffer – seta vermelha; eritrócito – seta amarela; veia porta – cabeça da seta; artéria hepática – seta preta.

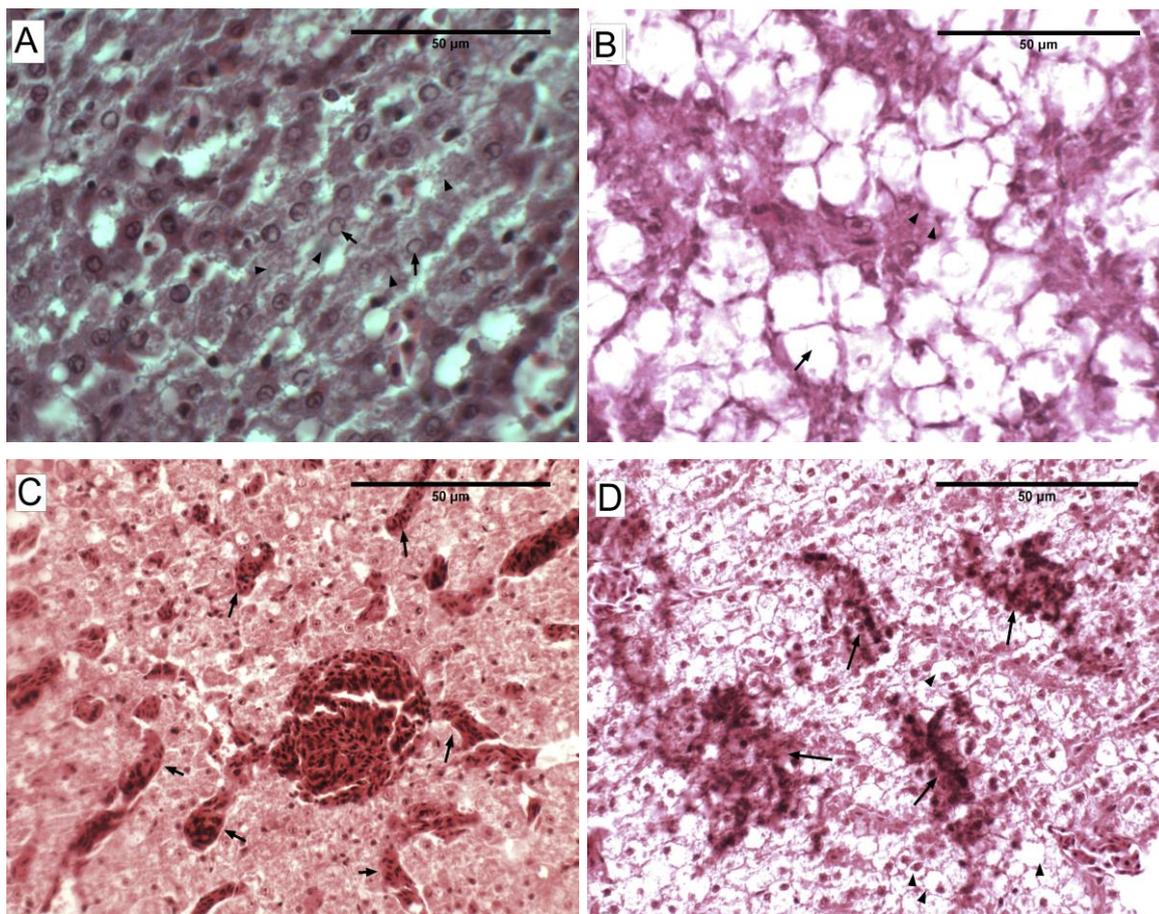


Figura 8 - Alterações histológicas observadas nos fígados dos peixes do Rio Ijuí (A) vacuolização nuclear – seta e degeneração citoplasmática – cabeçada seta; (B) degeneração nuclear – cabeça da seta e vacuolização citoplasmática – seta; (C) hiperemia – seta; (D) necrose focal – seta e vacuolização citoplasmática – cabeça da seta. **Fonte:** elaborado pelo autor.

As alterações de grau moderado foram as mais observadas, compreendendo 48% (Figura 9) das espécimes analisadas no estudo, ou seja, 48% das espécies estão com as funções hepáticas parcialmente comprometidas.

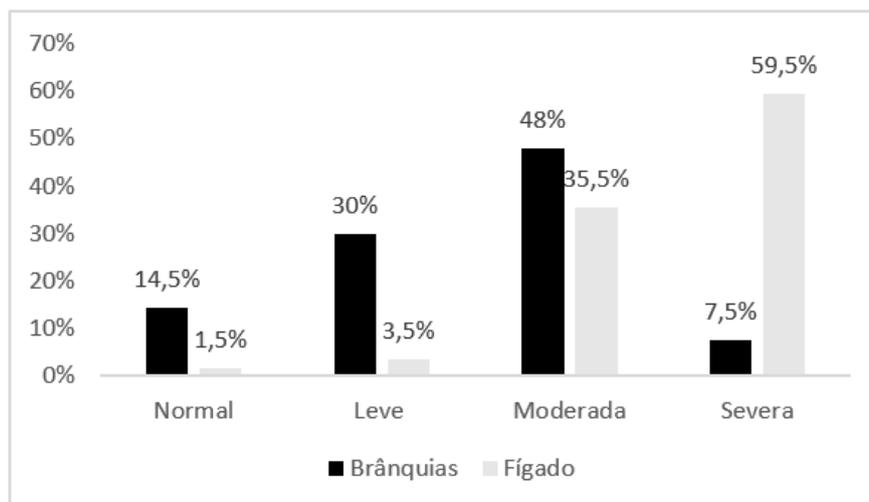


Figura 9 – Visão geral da Porcentagem de peixes e o total de severidades observada nas brânquias e fígado, considerando todo o estudo que envolveram 200 indivíduos.

Nos pontos P1, P3 e P4, mais de 50% dos peixes apresentaram severidade de grau moderada nas brânquias (Figura 10-A), ou seja, os peixes estavam com a funcionalidade das branquiais parcialmente comprometida. Já nos fígados, foram as alterações de grau severo que predominaram, com os pontos P1, P3 e P5 ultrapassando os 50% dos peixes analisados (Figura 10-B)

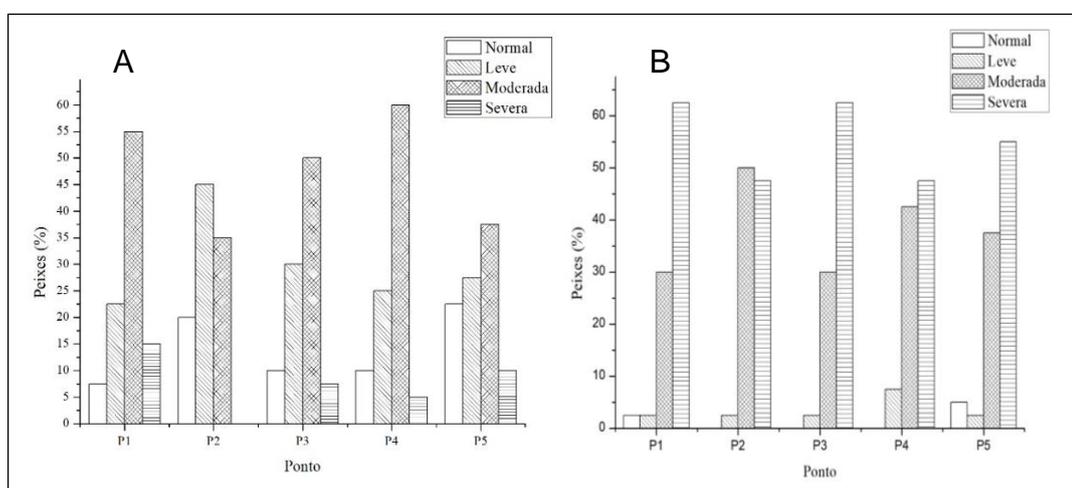


Figura 10 - Porcentagem de peixes e as severidades observadas por ponto (A – brânquias e B – fígado).

4 Discussão

A partir dos dados coletados e analisados pode-se observar que os danos hepáticos e brânquias são significativos e trazem uma leitura da situação do ambiente em questão.

A utilização de parâmetros biológicos em conjunto com as análises físico-químico sugere uma resposta mais precisa da qualidade dos ambientes aquáticos, visto que, o uso de parâmetros biológicos, baseia-se nas respostas dos organismos em relação a interferências provocadas por estressores no meio aonde vivem (BUSS et al., 2003). Os valores obtidos referentes aos parâmetros físico-químico da água encontram-se dentro dos padrões em todos os pontos analisados. Entretanto, apesar dessa normalidade fica evidente que houve alterações nas brânquias e no fígado de grau moderado a severo, sugerindo que compostos presentes no ambiente podem induzir danos dessa qualidade.

O cobre é um dos metais mais abundantes na natureza e essencial para o funcionamento do metabolismo dos organismos, agindo como cofator de enzimas, biossíntese de neurotransmissores, homeostase de ferro e apresentando papel importante na respiração celular (GROSELL, 2011). O Cu quando se torna um poluente em potencial, está presente em elevadas concentrações e tem origem como muitos poluentes aquáticos, através de resíduos industriais, domésticos e agrícolas, sendo esse último um dos principais.

No presente estudo, os níveis de Cu detectados estão dentro dos limites estabelecidos (Figura 2) pelo Ministério da Saúde, ainda que, observado um aumento nos níveis em brânquias dos peixes do P3 na estação do verão e nos fígados dos peixes do P4 na primavera. É importante salientar que, as amostras analisadas foram de órgãos e não de todos os tecidos, que incluiria os músculos, parte comestível de interesse econômico. O intuito da proposta foi focar nos dois tecidos de maior contato com xenobióticos. Cabe ainda pontuar que, o Cu é um elemento essencial para o organismo animal e parte dele é utilizado nas vias metabólicas para auto sustento fisiológico (FERRARI et al., 2004)

A qualidade do ambiente aquático afeta diretamente a estrutura branquial, pois estão em contato com a água, logo, em contato direto com poluentes solubilizados, o que se torna uma das vias de entrada no organismo dos peixes. As alterações provocadas no tecido branquial, nada mais são, do que uma tentativa de defesa do

organismo em resposta a presença dos mesmos (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2006), como a elevação epitelial, hiperplasia, fusão parcial e completa das lamelas (Figura 6), as quais estão identificadas nos peixes de todos os pontos desse estudo. Essas alterações diminuem a área de superfície vulnerável das brânquias, assim, aumentando a barreira de difusão aos poluentes, entretanto, essa barreira dificulta também a realização das trocas gasosas e o balanço hidromineral (ERKMEN; KOLANKAYA, 2000).

A proliferação de células cloreto (CC), que também é uma reação à presença de estressores, provocando a liberação de catecolaminas e cortisol na corrente sanguínea (BONGA; LOCK, 2008), é um marcador importante. A catecolamina liberada provoca um aumento da perfusão lamelar e da permeabilidade de íons, já o cortisol, induz a proliferação de CC com o objetivo de reestabelecer o balanço iônico e em consequência da proliferação de CC, ocorre um aumento da espessura da membrana lamelar prejudicando as trocas gasosas entre a água e o sangue (BONGA; LOCK, 2008).

As alterações encontradas nas brânquias dos peixes do rio Ijuí, nos pontos P1, P2, P3 e P4 apresentaram as maiores médias de IAH (Figura 3), concentrando-se nas alterações de grau moderado. Os únicos indivíduos que apresentaram danos leves, ou seja, as menores médias de IAH foram no P4 e no P5. Nos pontos P1, P3 e P4, mais de 50% dos peixes apresentam alterações moderadas, evidenciando que o estágio de antropização, encontrado nesses pontos, pode exercer papel na indução dessas alterações, seja pela presença de xenobióticos, seja pela alteração do ambiente, mudança na dieta, presença de parasitas e/ou indutores de efeitos epigenéticos (SIMONATO *et al.* 2007).

Essas lesões identificadas nas brânquias, não são específicas de um único contaminante, mas sim, de uma complexa variedade de substâncias estressoras. Estudos demonstraram que em elevadas concentrações, os metais cádmio, níquel e cobre (GARCIA-SANTOS *et al.* 2007; PANE *et al.* 2004; ARELLANO *et al.* 1999), os agroquímicos (à base de acefato, difenoconazol, sulfluramida, glifosato, diflubenzuron) (VIRGENS *et al.* 2015; SHIOGIRI, 2012; MADUENHO *et al.* 2007) e o óleo diesel (SIMONATO *et al.*, 2007) provocaram as mesmas alterações que as encontradas no presente estudo.

Quando se trata do fígado, os dados mostram que em todos os peixes coletados em todos os pontos apresentam médias de IAH do fígado elevada (Figura

4), configurando as alterações de grau severo e moderado. Mais de 45% dos peixes analisados em todos os pontos demonstraram lesões severas, indicando, a ocorrência de fatores que estão afetando o funcionamento deste órgão.

As lesões hepáticas, documentadas na literatura com maior frequência são: vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, estagnação biliar e hiperemia, que compreendem o estágio II, e o dano necrose focal, de estágio III. Tais alterações são comumente relatadas em estudos de monitoramento de ambientes aquáticos ou em análise de substâncias em laboratório (MILETTI et al., 2002; ROCHA et al., 2010; FILHO et al., 2014; PINHEIRO et al., 2017) e são as mesmas encontradas nas amostras analisadas nesse estudo.

Alterações como degeneração nuclear e celular podem indicar disfunções induzidas por agente tóxico, uma vez que áreas metabolicamente ativas do fígado ficam reduzidas, levando a uma possível redução geral nas funções desempenhadas por este órgão (HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON et al., 1992). A hiperemia, por sua vez, pode indicar processo de adaptação que leva ao aumento do fluxo sanguíneo no tecido hepático, facilitando o transporte de macrófagos para as regiões danificadas deste tecido e também melhorando a oxigenação destas áreas ou ainda, pode indicar um mecanismo auxiliar na desintoxicação (SIMONATO et al., 2007).

Nas amostras analisadas, as necroses evidenciam a presença de xenobióticos nos locais do estudo, pois é a única lesão de estágio III e, foi observada em 60% dos peixes analisados. Esse tipo de lesão é considerado irreversível, ocasionando perda parcial ou total da função do órgão (SIMONATO et al., 2007). Esses xenobióticos podem estar presentes no ambiente influenciando a qualidade do alimento disponível, seja de origem animal ou vegetal, que por sua vez impacta a fisiologia e metabolismo hepático.

A análise histológica das brânquias e do fígado, revelam uma situação preocupante em relação ao estado de conservação do Rio Ijuí nos pontos amostrados. Até o momento, as ações antrópicas não resultaram mortalidade de peixes; contudo, o impacto na fisiologia dos órgãos estudados é evidente e indica a presença de poluentes derivados da antropização.

5 Conclusão

A análise de Cu realizada nas amostras de brânquias e fígado dos peixes analisados se apresentam dentro dos valores estabelecidos pelo Ministério da Saúde através do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965, bem como os parâmetros físico-químicos da água estão de acordo com a resolução CONAMA 357/2005.

Através dos resultados obtidos na análise histológica das brânquias, concluiu-se, que os peixes dos pontos P1, P2, P3 e P4, apresentam as maiores médias de IAH, concentrando-se nas alterações de grau moderado.

Os únicos indivíduos que apresentam danos leves, ou seja, as menores médias de IAH pertencem ao P5.

Nos pontos P1, P3 e P4, mais de 50% dos peixes apresentam mal funcionalidade das brânquias.

Esses dados condizem com a situação ambiental desses pontos, que se apresentam com a mata ciliar degradada, presença de áreas agrícolas próximo das margens, como também o lançamento de rejeitos urbano e industrial que ocorre diretamente no rio, ou em seus tributários.

Na análise histológica do fígado demonstra que os peixes na sua grande maioria, apresentaram alterações de grau severo, ou seja, com a função comprometida do órgão.

No P4, apenas os peixes coletados no verão apresentam alterações de grau moderado, sendo os restantes de grau severo.

Em nível de comparação, dos 200 espécimes analisados o estágio de dano mais comum em brânquias foi de grau moderado, que correspondeu a 48% dos indivíduos, e de grau severo no fígado, aproximadamente 60% dos peixes coletados. Isso indica que, apesar das brânquias estarem em contato direto com a água, o fígado é o órgão que mais apresenta danos por sua função detoxificadora.

Pode-se concluir que os peixes analisados estão em contato com xenobióticos que têm potencializado patologias de ordem significativa, com comprometimento da qualidade de vida desses indivíduos.

Referências

- AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Atyanax* sp.) after water-borne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.
- ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. (1999) Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology Environmental Safety** 44: 62-72.
- BERNET, D. , SCHMIDT, H. , MEIER, W. , BURKHARDT-HOLM, P. AND WAHLI, T. (1999), Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, 22: 25-34. doi:[10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x)
- BONGA, S.E.W; LOCK, R.A.C. The osmoregulatory system. In: DI GIULIO, R.T.: HINTON, D.E (Ed.). **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRR Press, Taylor and Francis Group. 2008. P401-416.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto 55.871 de 26 de março de 1965, **Diário Oficial da União**: Brasília, 1965 (09 de abril de 1965). Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/>>.
- BUSS, F. D.; BAPTISTA, F. D.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, mar-abr, 2003.
- CONAMA, CONSELHO NACIONAL DE DEFESA DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, 2005.
- COSTA, G.M.; ORTIS, R.C.; LIMA, M.G.; CASALS, J.B.; LIMA, A.R.; JR KFOURY, J.R. Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(9), 947-950, 2012.
- ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.64, p.418-425, 2000.
- Ferrari, J. E. C.; Barros, M. M.; Pezzato, E. L.; Gonçalves, G. S.; & Hisano, H.; Kleemann, G. K. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* - **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. 2004, 26. 10.4025/actascianimsci.v26i4.1713.
- GARCIA-SANTOS, S.; FONTAÍNHAS-FERNANDES A.; WILSON J.M. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. **Environmental Toxicology** 21:33-46, 2006.

GROSELL, M. **Copper**. In: WOOD, C. M.; FARREL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. 1. ed. London: Elsevier, 2011. p. 54–135.

HINTON, D. E., BAUMAN, P. C., GARDNER, G. R., HAWKINS, W. E., HENDRICKS, J. D., MURCHELANO, R. A. OKIHIRO, M. S. **Histopathologic biomarkers**. In: HUGGETT, R. J., KIMERLE, R. A., MEHRLE, P. M. JR, BERGMAN, H. L. (eds.) *Biomarkers: bio-chemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publ., Boca Raton, p. 155-209, 1992.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, n. 8, p. 51- 66, 1990.

LINS J.A.P.N.; KIRSCHNIK P.G.; QUEIROZ V.S.; CIRIO S.M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista da Academia de Ciências Agrárias e Ambientais** 8: 469-484, 2010.

LIMA, F.; DEL CARMEN, B.; DÍAZ, A.; PINHEIRO, C.J.; GUIMARÃES, A. G. C. (2011). Morfologia das brânquias de *Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) (Characiformes, Curimatidae). **Biotemas**. 22, 2011.

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 (3), 361-372.

MADUENHO, L. P. **Parâmetros morfo-funcionais de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda ao inseticida Dimilin**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2007.

MELETTI, P. C.; ROCHA. O.; MARTINEZ C. B. R. **Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio MogiGuaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. In: Brigante J, Espindola ELG (eds) *Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. RiMa Editora, São Carlos, pg 149–180, 2003.

FILHO, M.S.; ANDREWS, E.; MOREIRA, L.; BARRETTO V.; MORAES B.; PRESSINOTTI, L. Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **Atas de saúde ambiental**. v. 2. n.1, 2014

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformations, genotoxic, and histopathological affects of environmental contaminants in European eel (*Anuilla Anguilla L.*). **Ecotoxicology an Environmental Safety**, v.53, n.3, p.331-147, nov.2002.

PANE E.F.; HAQUE A, WOOD C.M. Mechanistic analysis of acute, Ni induced respiratory Toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*):an exclusively branchial phenomenon. **Aquatic Toxicology** 69: 11-24, 2004.

PARIS-PALÁCIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p.109-124, 2000.

PEAKALL, D.B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). **Introduction. Ecotoxicology**, 3: 157-160. 1994.

PINHEIRO, K.; FERREIRA, R.; MOTA, J.; CUNHA, P.; VIDEIRA, M. HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO DE *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 PROVENIENTE DE ÁREA SOBRE INFLUÊNCIA DE MINERAÇÃO NA AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 7(3), 74-78. (2017).

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution**. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, cap. 30. Pp.339-352, 1994.

ROCHA, Rossineide Martins et al. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO DE *Brachyplatystoma rousseauxii* (CASTELNAU, 1855) DA BAÍA DO GUAJARÁ, BELÉM, PARÁ. **Ciência Animal Brasileira**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 101 - 109, abr. 2010. ISSN 1809-6891.

RODRIGUES PINTO, Y. **Ecotoxicidade do cobre e possíveis biomarcadores no reservatório Guarapiranga**. 101 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P.; BARALDI, F. G.; CRUZ, C.; FERNANDES, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 34, p. 388-396, 2012.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. In press. Biochemical, physiological, and histological changes in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 01.012, 2007.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, 5: 217-225. 1994.

VIRGENS, A.C.; CASTRO R.L.; CRUZ Z.M.A. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapiado-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfuramida. **Natureza on line** 13 (1): 26 31. (2015)

Considerações finais

Através dos resultados obtidos neste estudo, fica evidente e se faz necessário a utilização de parâmetros biológicos para a avaliação da qualidade dos ambientes aquáticos, bem como, avaliar os níveis de interferência que os ambientes antropizados promovem sobre os organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after water-borne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.

ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. *In vivo* cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74, p. 50-156, 2011.

AVILEZ, I. M. Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, SPIX & AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) exposto ao fenol. 2008, p. 155. Tese (doutorado). Toxicologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

BARROCAS, P.R.G. Metais. IN: **SISINNO, C. L. S.; FILHO-OLIVEIRA, E. C. Princípios de Toxicologia Ambiental**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Interciência. P. 39-73, 2013.

BONGA, S.E.W; LOCK, R.A.C. The osmoregulatory system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E (Ed.). **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRR Press, Taylor and Francis Group. 2008. P401-416.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, v. 1, 2016. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/05/Relatorio-Nacional-de-VSPEA-vol-1.pdf>

BRITO, I. A. **Avaliação da qualidade da água de três reservatórios do rio paraíba do sul através de biomarcadores em *pimelodus maculatus* (siluriformes, pimelodidae) e *oligosarcus hepsetus* (characiformes, Characidae)**. 2010, p. 131. Dissertação. Ecologia e conservação. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BUSS, F. D.; BAPTISTA, F. D.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, mar-abr, 2003.

CABRAL, W. B. M. **Análise da genotoxicidade in vivo dos agrotóxicos ciromazina e mancozeb em baixas doses**. 2014. P. 99. Dissertação. Saúde humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, vitória de santo antão, 2014

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123–2136, 1990.

CANTANHEDE, S.M.; SILVA, C. G.; PEREIRA, N. J.; PINHO, C. J. S.; SILVA, J.; TCHAICKA, L. N. R. N.; SOUZA, T., SANTOS, D. M. ., Evaluation of environmental quality of two estuaries in Ilha do Maranhao, Brazil, using histological and genotoxic biomarkers in *Centropomus undecimalis* (Pisces, Centropomidae). **Environ Science Pollut Res Int**, 2016. 23(20): p. 21058-21069.

CONDESSA, S. S. **Toxicidade subcrônica em lambaris *Astyanax bimaculatus* exposto ao zinco**. 2009, p. 199. Dissertação. Biologia animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CORT, C.; GHISI, N. Uso de alterações morfológicas nucleares em *Astyanax* spp. para avaliação da contaminação aquática. **O Mundo da Saúde**. 31-39. 2014.

COSTA, G.M.; ORTIS, R.C.; LIMA, M.G.; CASALS, J.B.; LIMA, A.R.; JR KFOURY, J.R. Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(9), 947-950, 2012.

DISNER, G.R.; ROCHA, M. V.; MIRANDA, G. B. Avaliação da atividade mutagênica do Roundup® em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii). **Evidência**, Joaçaba. v. 11, n. 1, p. 33-42, 2011.

DSIKOWITZKY, L.; MENGESHA, M.; DADEBO, E.; CARVALHO, C. E. V.; SINDERN, S. Assessment of heavy metals in water samples and tissues of edible fish species from Awassa and Koka Rift Valley Lakes, Ethiopia. **Environ Monit Assess** (2013) 185:3117–3131.

EGITO, L. C. M.; SANTOS, P. E.; AMARAL, V. S.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F. Use of native species *Crenicichla menezii* (Ariidae) as a model for *in situ* evaluation

of genotoxicity in surface water. **Science of the Total Environment**, 408, p. 6042-6046, 2010

EISLER, R., GARDNER, G. R. Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of cadmium, copper, and zinc salts. **Journal of Fish Biology**, West Kingston, USA: v. 5, n. 2, p. 131-142, 1973.

FILHO, M.S.; ANDREWS, E.; MOREIRA, L.; BARRETTO V.; MORAES B.; PRESSINOTTI, L. Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **Atas de saúde ambiental**. v. 2. n.1, 2014

FIGUEREDO, A. B. **Aspectos sanitários do jundiá (*Rhamdia quelen*) na região litoral centro do estado de Santa Catarina, Brasil**. 2013, p.88. Dissertação. Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S.; ARIAS, A. R.L Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oceanologia Brasiliensis**. 12:347-357, 2008.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. The use of biomarkers in aquatic toxicology studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v.7, n.1, p. 67-86, 2005.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, set./dez. 2008.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**. v. 455, p. 81-95. 2000.

GARCIA-SANTOS, S.; FONTAÍNHAS-FERNANDES A.; WILSON J.M. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. **Environmental Toxicology** 21:33-46, 2006.

GOUVEIA, N. Solid urban waste: socio-environmental impacts and prospects for sustainable management with social inclusion. **Ciência & Saúde Coletiva**, 17(6):1503-1510, 2012.

GRISOLIA, C. K.; RIVERO, C. L. G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I. C. R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, 32, p. 138-143, 2009.

GOLDONI, A.; SILVA, L. B. POTENCIAL MUTAGÊNICO DO FUNGICIDA MANCOZEBE EM *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). **Biosci. J.**, **Uberlândia**, v. 28, n. 2, p. 297-301, Mar./Apr. 2012.

HODGSON, E. A **Textbook of Modern Toxicology**. 3ª edição, John Wiley & Sons. New Jersey, 2004, cap.1

HOOFTMAN, R. N.; DE RAT, W. K. Induction of nuclear abnormalities (micronuclei) in peripheral blood erythrocytes of Eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p. 147-152, 1982.

KUNIYOSHI, L. S. **Bioacumulação de elementos-traço e expressão de micronúcleos em *Cathoro spixi* (biomonitor) como ferramentas de avaliação da influência antrópica em dois setores do complexo em dois setores do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguapé, São Paulo, Brasil**. 2011. p. 127. Dissertação. Oceanográfica Química e Geológica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Volume 554,1:43-64.2003

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 (3), 361-372.

MATOZO, F.; TUREK, J. A.; NOLETO, R. B. Avaliação dos efeitos genotóxicos do fungicida ridomil em *Astyanax altiparanae* (PISCES, CHARACIFORMES). **Luminária União da Vitória – PR**, v.17 n.01 p. 121-131 jan-jun. 2015.

MINELLA, J. P.; MERTEN, G. H.; Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecol. e Desenvol. Rur. Sustent.** Porto Alegre, v.3, n.4, 2002.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL. Sistema Nacional de Informações sobre saneamento (SENIS), **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos - 2016**. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos>>. Acesso em 17 ago. 2017.

MELETTI, P. C.; ROCHA. O.; MARTINEZ C. B. R. **Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio MogiGuaçu por meio de testes de toxicidade com**

sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: Brigante J, Espindola ELG (eds) Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu. RiMa Editora, São Carlos, p.149–180, 2003.

MORAES, F. D. **Respostas bioquímicas, genotóxicas, fisiológicas e histológicas de matrixã (*Brycon amazonicus*, Spix; Agassiz 1829) expostos à cipermetrina (Galgotrin).** 2013, p. 147. Tese (doutorado). Genética evolutiva e biologia molecular. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

MOREIRA, T. N.; NUNES, E. A.; LEAL, M. A.; SCHULZ, U. H.; DE LEMOS, C. T. Influência dos Métodos de Captura de Peixes na Avaliação Genotóxica Utilizando Diferentes Tecidos de *Astyanax fasciatus* (Osteichthyes, Characidae). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 5, n. 1, 2010.

NEVES, M. P. **Biomarcadores histológicos em um peixe loricarideo (*ancistrus mullerae*): relação entre uso antrópico do solo no entorno de riachos neotropicais e histopatologias mais severas.** 2016, p. 54. Conservação e manejo de recursos naturais. Dissertação. Universidade estadual do Oeste do Paraná. Cascavel-PR, 2016.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA, J. J. **Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*.** Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba, v. 17, p. 117-122, 2007.

OLIVEIRA, D. G. S. **Toxicidade em peixes submetidos à fração solúvel de biodiesel de óleo de soja queimado.** 2013. 80 f. Tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, 2013.

PALHARES, D.; GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 281-284, 2002.

PARIS-PALÁCIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**. v.50, p.109-124, 2000.

PORTO, L. C. S. **Avaliação de metais pesados e micronúcleos em peixes da bacia hidrográfica Butuí-Camaquã e análise da água.** 2009. 98 f. Dissertação de mestrado, biblioteca digital da Univates. Centro Universitário Univates. Lajeado-RS, 2009.

PEREIRA, S. F.; LIMA, M. A.; FREITAS, K. H.; MESCOUTO, C. S.; SARAIVA, A. F. Estudo químico ambiental do rio Murucupi – Barcarena, PA, Brasil, área impactada pela produção de alumínio. **Revista Ambiente & Água**. v. 2, n. 3, 2007.

PINTO, Y, R. **Ecotoxicidade do cobre e possíveis biomarcadores no reservatório guarapiranga**. 2016, p. 102. Tese (doutorado). Biologia celular e tecidual. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

PINHEIRO, K.; FERREIRA, R.; MOTA, J.; CUNHA, P.; VIDEIRA, M. Histopatologia do fígado de *colossoma macropomum* cuvier, 1818 proveniente de área sobre influência de mineração na amazônia oriental, brasil. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, 7(3), 74-78. (2017).

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution**. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, cap. 30. Pp.339-352, 1994.

RADOLL, G. P. **Avaliação da genotoxicidade em efluentes líquidos da indústria frigorífica**. 2013, p. 108 . Dissertação. Engenharia Civil, UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, Curitiba, 2013

REZENDE, K. F. O. **Alterações morfológicas de Tilápia do Nílo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) expostas às águas da Represa Billings**. 2011, p. 62. Dissertação. Ciências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ROCHA, R.; COELHO, R.; MONTES, C.; SANTOS, S.; FERREIRA, M. Avaliação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (castelnau, 1855) da baía do Guajará, Belém, Pará. **Ciência animal brasileira**, 11(1), 101 – 109, 2010.

SIJM, D. T. H. M. OPPERHUIZEN, A. Biotransformation of Organic Chemieals by Fish: Enzyme Activities and Reactions **IN: HUTZINGER, O. Reaction and prosses**. The Handbook of Environmental Chemistry V. 2, p. 163, 1989.

SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática**. 2004, p. 80. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

SILVA, M. R. L. R. Avaliação da toxicidade celular do herbicida glifosato em *Astyanax spp*. **Saúde Meio Ambient**. v. 3, n. 2, p. 62-69, jul./dez. 2014.

SILVA, C. A.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba.

Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM. Patos de Minas-MG. UNIPAM, n. 7, vol. 1: 167-179, ago. 2010

SILVA, Daniel Clemente Vieira Rêgo da; MARCELO POMPÊO,; PAIVA, Teresa Cristina Brazil de. A Ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: **Ecologia de reservatórios e interfaces**[S.l: s.n.], p. 460 , 2015.Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/reservatorios/PDF/Cap. 22 Ecotoxicologia.pdf>.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on Some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. Bull. **Environ. Contam. Toxicol.** (2006) 76:505–511. Inc. DOI: 10.1007/s00128-006-0949-3

SIMONATO, J. D. **Biomarcadores Funcionais e Histológicos Associados à Exposição do Peixe *Prochilodus lineatus* ao Óleo Diesel.** 2006. p. 68. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

SISINNO, C. L. S.; FILHO-OLIVEIRA, E. C. **Princípios de Toxicologia Ambiental.** Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Interciência. 2013.

VIRGENS, A.C.; CASTRO R.L.; CRUZ Z.M.A. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapiado-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfluramida. **Natureza on line** 13 (1): 26 31. 2015.

Apêndice

Apêndice 1 – Fotografia dos locais de coleta: Ponto 1 (A e B); Ponto 2 (C e D); Ponto 3 (E e F); Ponto 4 (G e H); Ponto 5 (I e J).

Ponto 1:



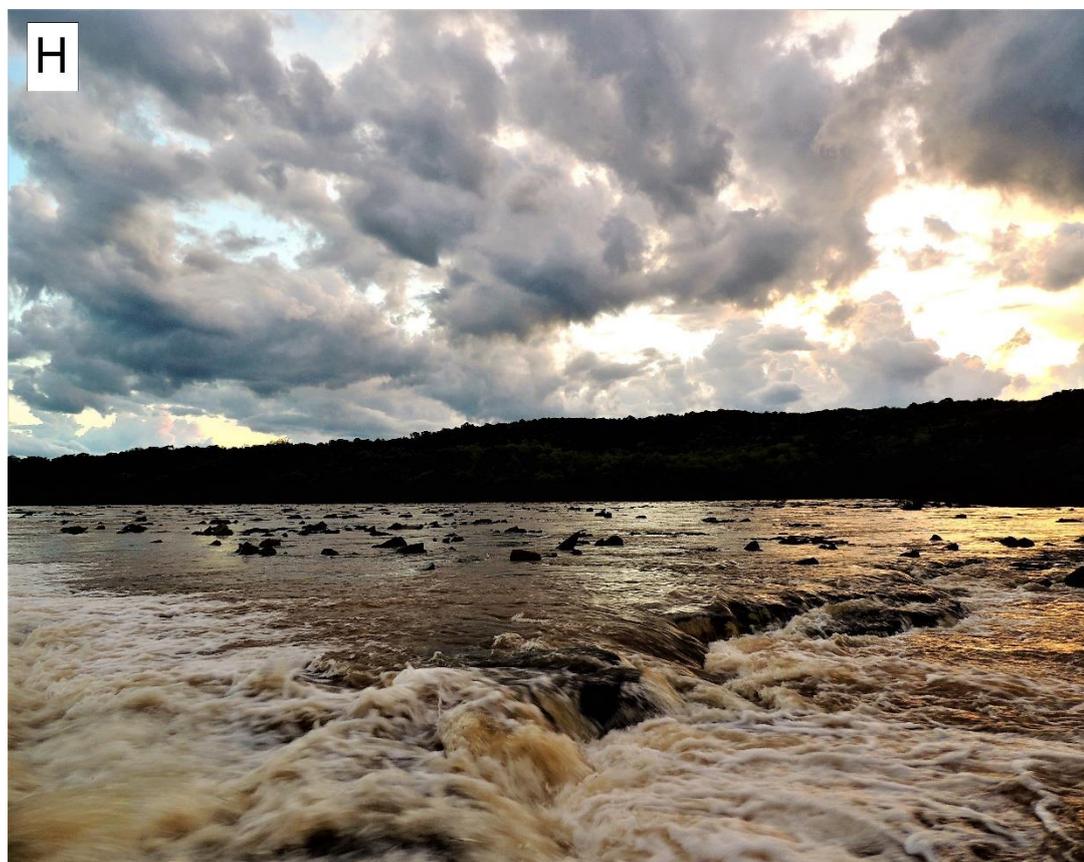
Ponto 2:



Ponto 3:



Ponto 4:



Ponto 5:

