

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

INBIO – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

NATHALIA MACEDO SILVA

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA NUCLEAR DE
HEPATÓCITOS DE *Danio rerio* (zebrafish) EXPOSTOS À ÁGUA DE
CÓRREGOS URBANOS, CAMPO GRANDE, MS

Campo Grande, MS

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

INBIO – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA NUCLEAR DE
HEPATÓCITOS DE *Danio rerio* (zebrafish) EXPOSTOS À ÁGUA DE
CÓRREGOS URBANOS, CAMPO GRANDE, MS

NATHALIA MACEDO SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas Bacharelado da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Biologia, sob orientação do
Prof. Carlos Eurico dos Santos Fernandes.

Campo Grande, MS

2023

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha gratidão a Deus pela bênção de cursar a faculdade de Ciências Biológicas - Bacharelado. Em segundo lugar, quero agradecer profundamente à minha mãe, Simone Santos Macedo, pelo constante apoio, dedicação, paciência e amor que me proporcionou ao longo de toda a minha vida, e em especial, durante os últimos quatro anos do meu curso. Quero estender meu agradecimento aos meus familiares e amigos que compartilharam esta jornada comigo, contribuindo significativamente para a minha formação. Meu obrigado também a Professora Alda Maria Teixeira que agregou em minha formação com seus conhecimentos e me apresentou ao LAPEX. Não posso deixar de mencionar a equipe do LAPEX, que desempenhou um papel crucial na minha jornada acadêmica. Agradeço a todos por seu ensinamento, paciência e valiosas contribuições. Quero expressar minha gratidão especial à Professora Carla Letícia Gediél Rivero Wendt e ao Professor Carlos Eurico dos Santos Fernandes, que com grande paciência e dedicação compartilharam seu precioso conhecimento comigo.

RESUMO

A biota aquática está constantemente enfrentando uma crescente exposição a substâncias tóxicas provenientes das atividades humanas, as quais têm provocado alterações nos processos físico-químicos e biológicos das fontes de água. Estas mudanças, por sua vez, contribuem para a degradação da qualidade ambiental, colocando em risco a saúde dos organismos que habitam esses ecossistemas. Neste contexto, a utilização de organismos aquáticos como bioindicadores possibilita estimar os efeitos e o nível de contaminação nos ambientes aquáticos. Com o intuito de avaliar os impactos da água de três córregos urbanos na cidade de Campo Grande, no estado de Mato Grosso do Sul, foi conduzido um estudo utilizando o peixe *Danio rerio* como indicador ambiental. Para essa finalidade, foi adotado o biomonitoramento ativo, e os espécimes foram submetidos a exposições de 3, 6 e 12 dias. Os resultados obtidos revelaram que os espécimes expostos à água dos córregos apresentaram lesões teciduais de baixo a alto grau de irreversibilidade. Além disso, foram observadas diferenças no volume nuclear dos hepatócitos assim como na densidade óptica integrada (DOI). Com base nesses achados, podemos concluir que a água proveniente dos três córregos alterou a organização e estrutura dos hepatócitos, mostrando perfis distintos de acordo com o tempo de exposição. Essa abordagem de biomonitoramento pode ser aplicada em estudos futuros envolvendo outros ambientes aquáticos, aprimorando as técnicas laboratoriais do modelo e fornecendo subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias de conservação e monitoramento ambiental.

Palavras-chaves: Biomonitoramento; Hepatócitos; Densidade óptica integrada; *zebrafish*

ABSTRACT

Aquatic biota is constantly facing increasing exposure to toxic substances from human activities, which have caused changes in the physical-chemical and biological processes of water sources. These changes, in turn, contribute to the degradation of environmental quality, putting the health of the organisms that inhabit these ecosystems at risk. In this context, the use of aquatic organisms as bioindicators makes it possible to estimate the effects and level of contamination in aquatic environments. In order to evaluate the impacts of water from three urban streams in the city of Campo Grande, in the state of Mato Grosso do Sul, a study was conducted using the *Danio rerio* fish as an environmental indicator. For this purpose, active biomonitoring was adopted, and the specimens were subjected to exposures of 3, 6 and 12 days. The results obtained revealed that the specimens exposed to stream water presented tissue injuries of low to high degrees of irreversibility. Furthermore, differences were observed in hepatocyte nuclear volume as well as integrated optical density (DOI). Based on these findings, we can conclude that the water from the three streams changed the organization and structure of hepatocytes, showing different profiles according to the exposure time. This biomonitoring approach can be applied in future studies involving other aquatic environments, improving the model's laboratory techniques and providing support for the development of new conservation and environmental monitoring strategies.

Keywords: Biomonitoring; Hepatocytes; Integrated optical density; *zebrafish*

INTRODUÇÃO

As ações humanas tais como a pecuária, agricultura, construções de usinas perto de rios, córregos e/ou lagos estão exercendo um impacto significativo nos ecossistemas aquáticos, isto porque tais ações causam um desequilíbrio para determinado ambiente, influenciam na qualidade da água, na qualidade dos alimentos, nas funções metabólicas de cada organismo ali presente, ou seja, prejudica o ecossistema aquático como um todo desregulando a forma de vida dos organismos. Estes impactos são progressivamente influenciados não apenas por mudanças globais, mas também pelo crescimento das áreas urbanas e turísticas (Donat-P et al., 2020). A localidade dos córregos é um fator importante visto que é de fácil compreensão que ambientes aquáticos presentes na parte urbana sofrem mais do que aqueles afastados da urbanização, quando em locais muito antropizados são passíveis a lixos, descarte incorreto de substâncias, manipulação humana e afins.

Os córregos Bandeira, Anhanduí e Lagoa situados na cidade de Campo Grande, no estado de Mato Grosso do Sul, sofrem constantemente influência desta antropização, visto que possuem sua localização em bairros mais populosos e vias de transportes muito importantes para acesso aos outros bairros de Campo Grande -MS.

Pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de avaliar o nível de poluição nesses ambientes e entender seu impacto na vida dos organismos aquáticos. Para esse propósito, usamos os próprios organismos como bioindicadores, tais como peixes, girinos, vegetação, e outros, por meio da técnica de biomonitoramento. Essa abordagem permite identificar os efeitos de compostos tóxicos que podem estar presentes nos ecossistemas afetados pelas atividades humanas. Os peixes desempenham um papel de extrema importância nos ecossistemas aquáticos, e sua utilização como bioindicador é de grande importância, uma vez que eles apresentam respostas distintas à contaminação, devido às suas características morfológicas, de mobilidade, história de vida e posição na cadeia alimentar (Freitas, 2009; Chovanec et al., 2003).

O *zebrafish* é frequentemente adotado para estes estudos devido à sua notável sensibilidade a diversos contaminantes, suas alterações características na morfologia, expressão gênica, comportamento e fisiologia, tornando-o um organismo modelo ideal para o monitoramento ambiental. (Dai et al., 2013).

Existem métodos e ferramentas que estabelecem uma conexão entre as informações toxicológicas do ecossistema aquático e os efeitos biológicos evidenciados em organismos específicos (Almeida et al., 2016). Majoritariamente para verificar esses efeitos, analisamos partes do peixe mais sensíveis a tais substâncias tóxicas, como brânquias, rins e fígado.

O fígado além de ser um órgão muito afetado com perturbações externas, desempenha um papel essencial como órgão metabólico, sendo fundamental para a desintoxicação do sangue. Ele atua como um ponto central para a acumulação, biotransformação e excreção de xenobióticos (Zielińska et al., 2020). A morfogênese do fígado é descrita em duas etapas distintas: (1) brotamento, que se subdivide em três estágios com base na morfologia hepática específica, e (2) crescimento. Os três estágios de brotamento envolvem a organização celular, preparando-se para a subsequente formação do órgão. Após a conclusão do processo de brotamento, o fígado se configura como uma estrutura bem definida, aumentando em tamanho e passando por modificações em sua forma e posicionamento. Denominamos essa fase como a etapa de crescimento do fígado (Field et al., 2003). Distribuídos por todo o fígado, os hepatócitos constituem a principal categoria de células hepáticas e são encarregados de executar as diversas funções deste órgão (Pu et al., 2022).

Por serem essenciais para o fígado, os hepatócitos sofrem alterações nucleares durante o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação celular. Essas modificações são processos dinâmicos que influenciam no tamanho do núcleo, visando estabelecer proporções adequadas entre o volume nuclear e o volume citoplasmático (Jevtic et al., 2014). O modo como o tamanho e a forma do núcleo afeta a fisiologia celular é ainda pouco claro, mas é possível que a morfologia nuclear tenha impacto na organização da cromatina e na expressão gênica (Vuković et al., 2016). Neste sentido, variações no tamanho e na compactação da cromatina podem refletir mudanças homeostáticas metabólicas

associadas a estágios degenerativos em organismos aquáticos expostos a estressores ambientais.

Nesse contexto, o biomonitoramento ativo é uma abordagem que utiliza peixes como bioindicadores para avaliar a qualidade da água. No presente estudo, essa metodologia foi empregada em laboratório, utilizando sistemas de microcosmos constituídos por amostras do ecossistema natural, como água e sedimento, em uma escala reduzida (Magalhães et al., 2008).

Assim, o objetivo central deste estudo consistiu na avaliação dos impactos da água dos córregos Anhanduí, Bandeira e Lagoa, nos hepatócitos de *zebrafish*. Nesse sentido, foi investigada a densidade óptica integrada (DOI), o volume nuclear e a presença de lesões histopatológicas após diferentes períodos de exposição às águas dos referidos córregos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais biológicos utilizados neste estudo foram extraídos da dissertação intitulada "Biomarcadores Histopatológicos em *Zebrafish* (*Danio rerio*)", de autoria da MSc Bianca Marques Segura (2023).

Nós realizamos a coleta de amostras de água em pontos previamente demarcados conforme ilustrado no mapa (Fig. 1) com as seguintes coordenadas geográficas: 20°33'32.1"S 54°39'57.3"W (Córrego Anhanduí), 20°30'09.4"S 54°37'16.7"W (Córrego Bandeira) e 20°31'20.7"S 54°40'33.9"W (Córrego Lagoa). A seleção destes pontos de coleta foi feita com base na sua localização, ou seja, por estarem dentro da urbanização e pela sua acessibilidade. Foram coletados aproximadamente 20 litros de água de cada um dos córregos e posteriormente transportados para a Estação de Piscicultura da FAMEZ/UFMS.

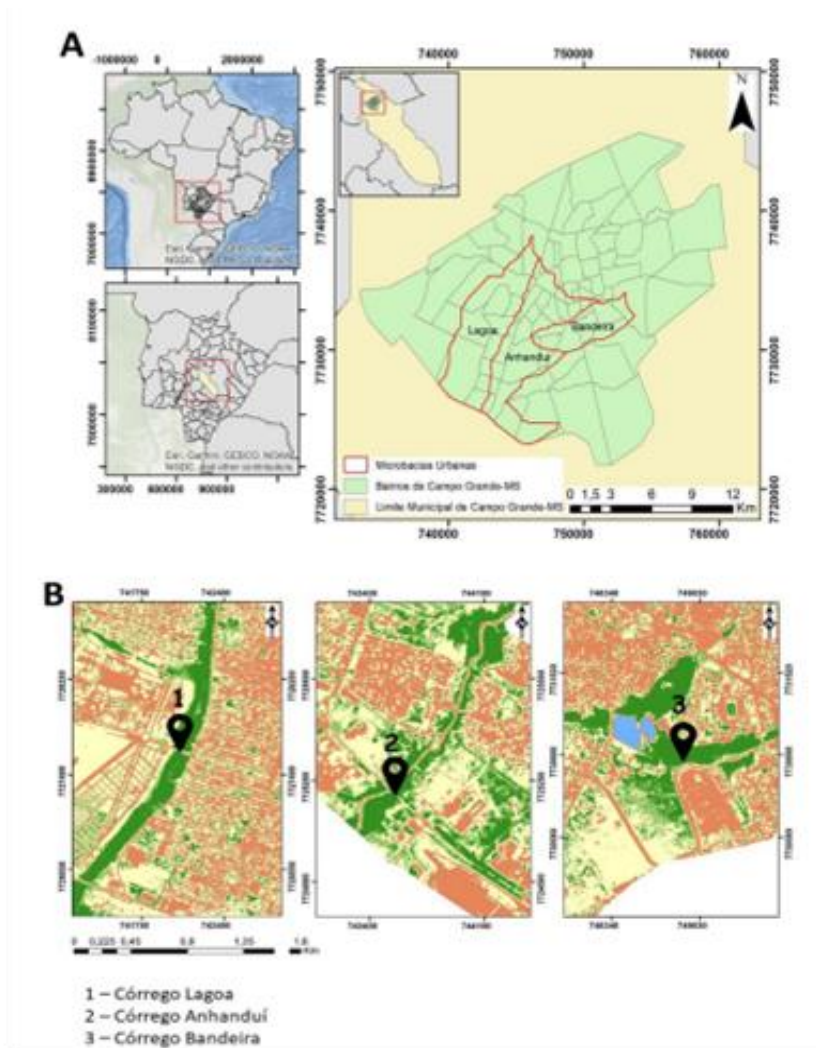


Figura 1. (A). Localização das microbacias urbanas Lagoa, Anhanduí e Bandeira. (B) Localização dos pontos de coleta, sendo o ponto 1 para o córrego Lagoa; Ponto 2, córrego Anhanduí e ponto 3, córrego Bandeira. Confecção: LabGIS – Laboratório de Geoprocessamento para Aplicações Ambientais, UFMS.

Zebrafish

Indivíduos adultos de *zebrafish* (n = 120) foram adquiridos de um fornecedor devidamente credenciado, a Ogawa e Sato LTDA, localizada em Campo Grande, MS. Esses peixes foram submetidos a um período de aclimação em um aquário contendo 50 litros de água dechlorada, com a temperatura mantida entre 25 e 28 °C. O ambiente do aquário contou com um sistema de aeração artificial, limpeza dos sedimentos, renovação de 25% do volume total de água a cada 48 horas, e um fotoperíodo controlado de 12 horas

de luz e 12 horas de escuridão. Durante esse período de aclimação, os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração floculada (AquaFish 32% 5 mm, Supra®).

Grupos experimentais

Foram expostos dez espécimes por 3, 6 e 12 dias, para cada córrego, enquanto os demais foram reservados para constituir o grupo controle, servindo como referência para os três córregos.

Montamos um sistema de fluxo contínuo fechado para cada córrego, onde colocamos a água coletada, este possuía uma taxa de 100 litros por hora e uma potência de 8 watts. Esse sistema compreendia três aquários de 4 litros cada (um para cada período de exposição), que eram artificialmente oxigenados, e estavam conectados a um aquário estoque de 8 litros (Fig. 2).

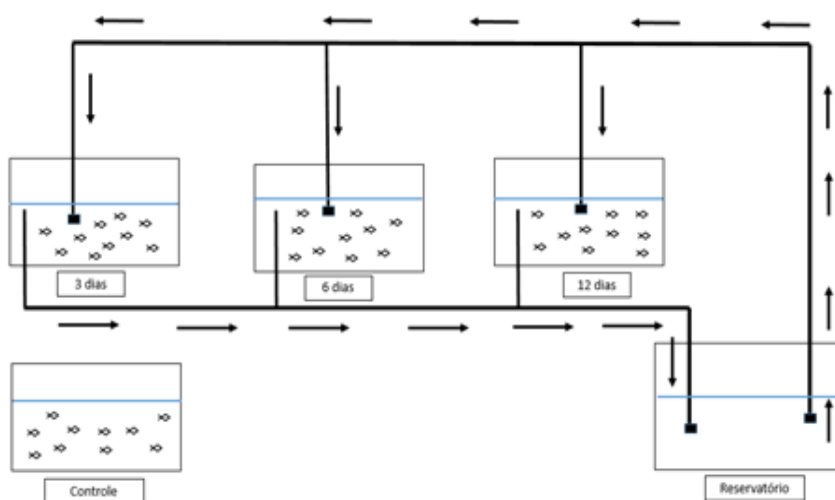


Figura 2. Sistema fechado de fluxo contínuo constituído por 3 aquários de 4L, contendo 10 indivíduos expostos, um reservatório de água de 8L na parte inferior e um aquário individual para os espécimes controle. As setas indicam o fluxo de água gerado pela bomba de água.

Após a eutanásia, os exemplares foram imersos em uma solução de Davidson (fixação), conforme descrito por (Fournie et al., em 2000), durante um

período de 24 horas. Posteriormente, foram transferidos para uma solução de EDTA a 10%, onde permaneceram por no mínimo 4 dias para descalcificação. Após a conclusão deste processo, as amostras foram seccionadas sagitalmente, a fim de passarem por procedimentos de processamento histológico de rotina, e finalmente foram incluídas em Paraplast (Sigma Aldrich®) em cortes de 4 micrômetros e coradas com hematoxilina e eosina (HE).

As análises histopatológicas foram realizadas por meio de microscopia de campo claro, seguindo a classificação estabelecida anteriormente por (Poleksic et al., 1994) e (Bernet et al., 1999). Ao observar o grau de alteração, levamos em consideração as características das lesões, bem como seu nível de reversibilidade (w), sendo lesões reversíveis (W1), lesões parcialmente reversíveis (W2) e lesões irreversíveis (W3) e comparamos aos controles.

Para calcular a densidade óptica integrada (DOI) dos núcleos dos hepatócitos, foram capturadas aleatoriamente três imagens de cada lâmina, com resolução RGB de 4096 x 3286 pixels, sob uma ampliação de 400x, utilizando microscopia de campo claro (Opticam 500R®), equipada com a óptica LOPT1001®. As imagens foram posteriormente convertidas para o formato de 8 bits, e a ferramenta limiar no software ImageJ, versão 1.53a (Ferreira & Rasband, 2012), foi empregada para a análise de imagem. No menu "Analyze/Set Measurements" foram medidos a área (μm^2), a circunferência (μm), o arredondamento (0-1) e o diâmetro de Ferret (μm) de 30 núcleos selecionados aleatoriamente por imagem. O cálculo da DOI seguiu a equação 1 descrita por (Hardie et al., 2002), como segue:

$$\sum_{i=0}^n -\log_{10} \left(\frac{IF_i}{IB_i} \right)$$

Em que n = número total de *pixels* no núcleo; IF_i = intensidade dos *pixels* nucleares; e IB_i = intensidade do *pixel* da imagem de fundo.

O volume nuclear do hepatócito (V_n) foi estimado pela equação 2 V_n = (4/3 π) x r³, na qual V_n representa o volume nuclear (μm^3) e representa o raio

nuclear (diâmetro de Ferret / 2). Calculado considerando os mesmos núcleos utilizados para a DOI, com base na seguinte equação:

$$VN = 4/3\pi \times r^3$$

Em que: VN = volume nuclear (μm^3), $\pi = 3,1416$ e r = raio do diâmetro de Ferret.

Análise Estatística

A DOI foi comparada por meio de histogramas (distribuição normal) de acordo com o período de exposição para cada córrego. Para o volume nuclear, os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), modelo linear misto generalizado, com o teste de Bonferroni para comparação entre pares. As análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS versão 23 (IBM, USA), GraphPrism 8.0 (San Diego, CA, USA) e OriginPro, V2022b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

RESULTADOS

De acordo com a figura 3 é possível verificar que as lesões parcialmente reversíveis (W2) mostram tendência no aumento frequência ao longo do tempo de exposição. Dentre as lesões parcialmente reversíveis identificadas nós temos a picnose que é a condensação da cromatina, caracterizada como uma alteração nuclear. E dentre as lesões histopatológicas irreversíveis identificamos a necrose dos hepatócitos (Fig. 3).

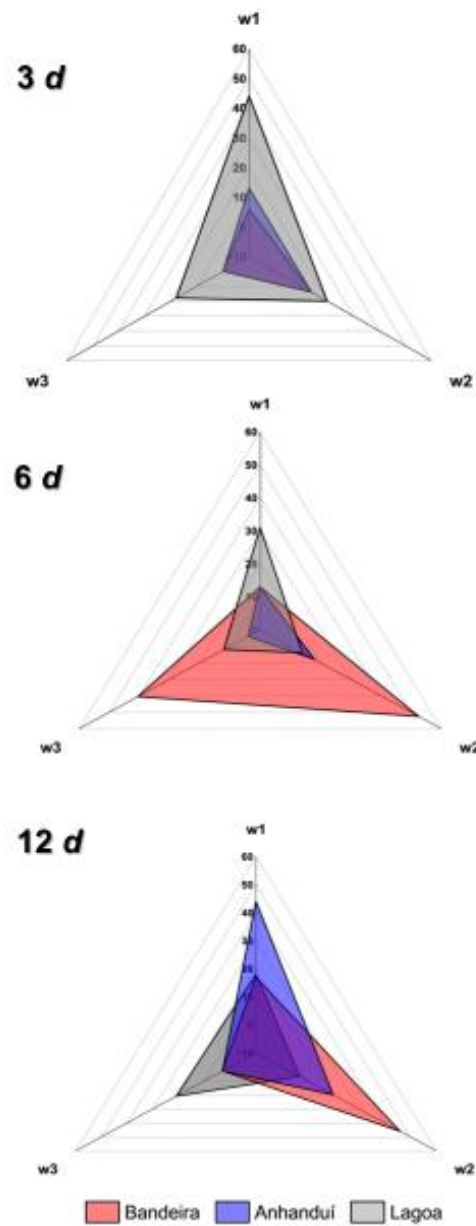


Figura 3. Frequência de lesões histopatológicas dos três córregos por tempo 3, 6 e 12 dias e por tipo de lesão. Lesões reversíveis (W1), lesões parcialmente reversíveis (W2) e lesões irreversíveis (W3).

Na figura 6, é possível observar imagens do tecido hepático do grupo controle e do grupo exposto por 12 dias a água do córrego Bandeira no aumento de 40x, observadas no microscópio de campo claro e no programa ImageJ.

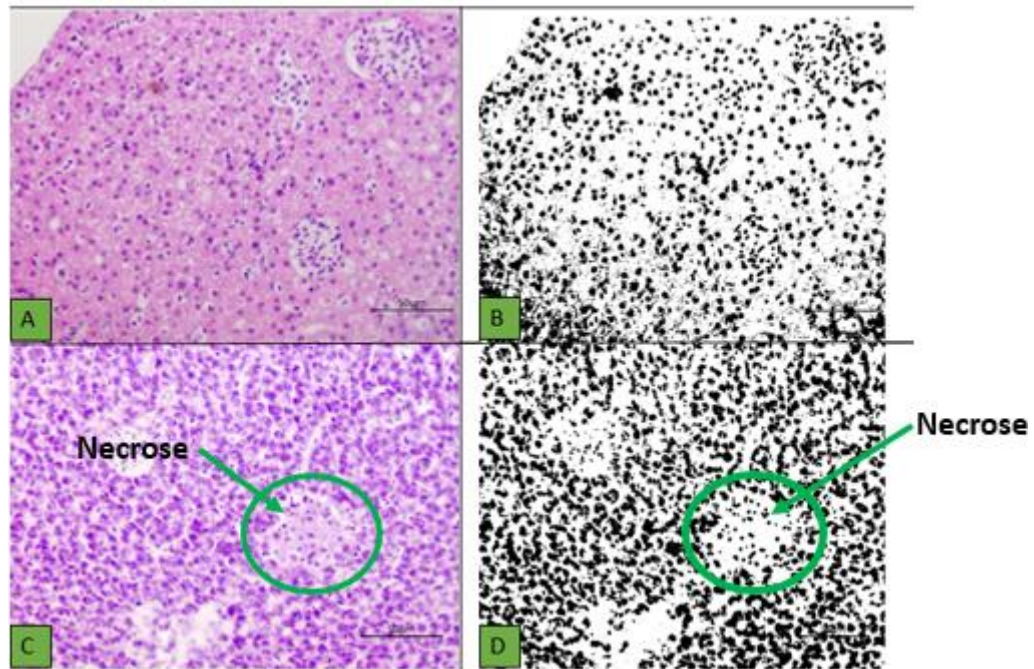


Figura 6. Imagens do tecido hepático do grupo controle e do grupo exposto por 12 dias a água do córrego Bandeira no aumento 40x. A e C observadas no microscópio de campo claro e B e D no programa ImageJ.

Na Figura 4, são apresentadas as curvas de *pixels* que indicam as densidades ópticas integradas (DOI) dos núcleos de hepatócitos de zebrafish nos três córregos após os tempos de exposição. No córrego Bandeira, é notável que as curvas dos grupos de tratamento se deslocam para a direita em comparação com o grupo controle. Quanto mais à direita no gráfico, maiores são as densidades ópticas integradas identificadas, que significa que estes núcleos estão muito compactados. A linha vermelha representa o tempo de exposição de 3 dias, destacando uma DOI maior em comparação com os outros grupos. Nos períodos de 6 e 12 dias, representados pelas linhas azul e verde, respectivamente, observa-se DOI menor em relação ao tempo 3. Esses resultados indicam uma diminuição progressiva e significativa das densidades ao longo dos tempos de exposição.

No córrego Anhanduí, ambas as curvas estão deslocadas mais para a esquerda, indicando DOI menor. A curva do tempo 3 está mais à esquerda em

comparação com os outros grupos, evidenciando uma menor DOI. A linha azul (tempo 6) está levemente deslocada para a direita em relação aos outros grupos, e a linha verde (tempo 12) assemelha-se mais ao controle (linha preta).

No último gráfico (Fig. 4), as densidades ópticas integradas (DOI) do córrego Lagoa são ilustradas. Notamos que no tempo 12, representado pela linha verde, a curva está no meio da reta, indicando uma heterogeneidade maior de células neste período. As linhas vermelha e azul, representando os tempos 3 e 6, estão mais deslocadas para a esquerda em relação aos outros grupos, evidenciando densidades ópticas integradas menores.

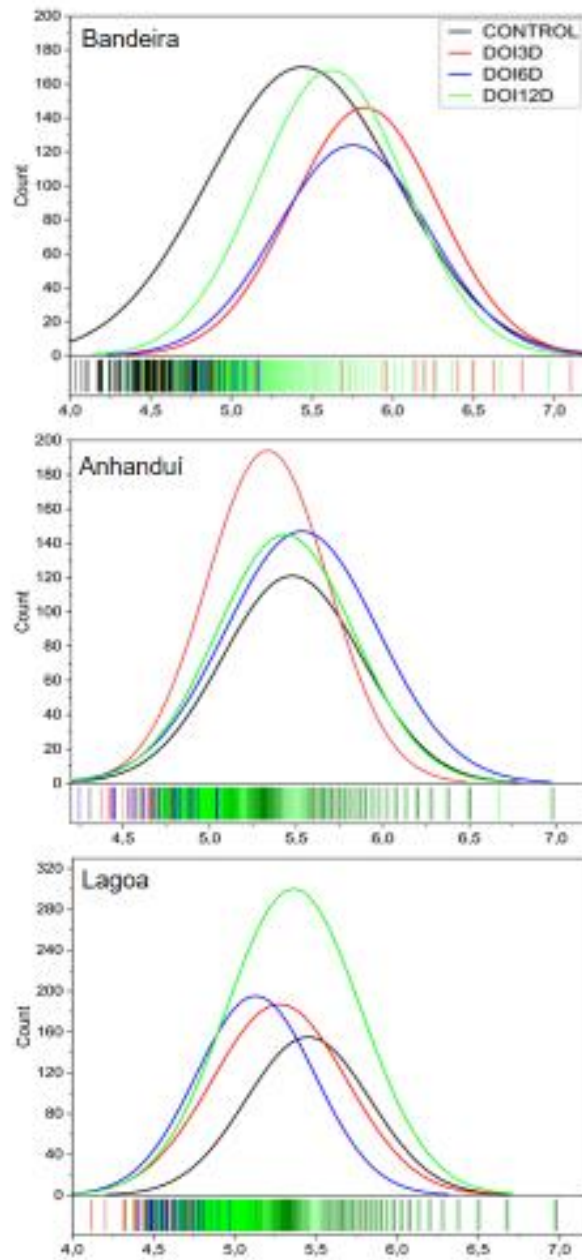


Figura 4. Densidade óptica integrada (Count) dos núcleos de hepatócitos de *zebrafish* expostos a água dos córregos Bandeira, Anhanduí e Lagoa por 3, 6 e 12 dias.

Estes resultados podem significar a relação da densidade com o volume dos núcleos dos hepatócitos. Quanto mais densos os núcleos, menor o volume calculado (fig. 5).

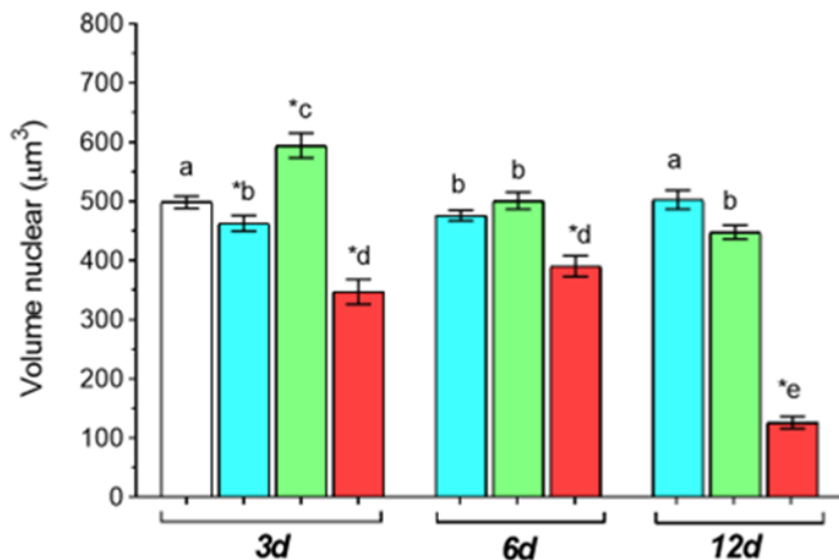


Figura 5. Representação dos volumes nucleares dos hepatócitos de *zebrafish*, expostos a água dos córregos Bandeira, Anhanduí e Lagoa por 3, 6 e 12 dias.

■ Bandeira ■ Anhanduí ■ Lagoa

DISCUSSÃO

No contexto geral, os córregos urbanos sofrem uma grande influência da ação humana, sendo afetados por uma diversidade de produtos químicos de diferentes origens, os quais exercem impactos no ecossistema aquático e consequentemente nos organismos ali presentes (Paul et al., 2001; Ribeiro-Brasil et al., 2020). Para os córregos usados para este estudo, não foi diferente observamos que por estarem localizados em ambientes muito urbanizados sofrem influência constante das ações humanas e por tabela seus organismos são afetados.

Como dito, uma forma de analisarmos esses efeitos nos organismos, é a análise de seus órgãos principais, os quais sofrem os impactos com maior magnitude. O fígado, após sofrer qualquer lesão apresenta capacidade e mecanismos de regeneração, sendo a proliferação de hepatócitos o mecanismo celular dominante (Pu et al., 2022). Por isso, sempre teremos hepatócitos em estágios iniciais e hepatócitos já maduros. A maturação é marcada pelo aumento

do núcleo, seu alongamento e pela diminuição no número de nucléolos. O que conseguimos observar nos hepatócitos do tempo 3 do córrego Anhanduí (Fig. 5), em contraste, os hepatócitos do Lagoa estão relacionados ao grau de lesão parenquimatosa, especialmente os de 12 dias de exposição (Fig.3). Essas alterações sugerem que as lesões no parênquima hepático modulam o tamanho e a densidade da cromatina nuclear, como um processo contínuo de remodelação, adaptação e renovação celular a (Madakashira et al., 2021). O efeito da exposição diária, estimula o fígado à proliferação de novos hepatócitos a fim de manter a homeostase tecidual (Pu et al., 2022). Conforme os hepatócitos amadurecem vão adquirindo nova forma e tamanho, sendo os mais recentes de tamanho menor e os mais maduros de tamanho maior. (Madakashira et al., 2021). Essa dinâmica resulta em diferentes compactação das cromatinas evidenciadas pela variação na densidade óptica integrada e conseqüentemente refletindo no volume nuclear. O tempo de exposição é um fator de extrema influência nesse funcionamento, como observado no tempo 12 do córrego Lagoa (Fig. 3). À medida que o tempo de exposição progredia, as lesões histopatológicas se tornavam mais evidentes, indicando a ocorrência de uma remodelação desses núcleos. Os hepatócitos em processos degenerativos apresentam com frequência redução no tamanho e compactação nuclear, um fenômeno conhecido como picnose e frequentemente associado a lesões irreversíveis (Walling & Janovitz, 2018).

CONCLUSÃO

Esses resultados ilustram uma notável mudança na organização do fígado e estrutura nuclear dos hepatócitos de acordo com o tempo de exposição em diferentes ecossistemas aquáticos. Há relação entre o grau de alterações teciduais e a compactação da cromatina nuclear dos hepatócitos. O biomonitoramento ativo pode ser uma alternativa simples e mais acessível para o estudo das relações entre peixes e ecossistemas aquáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. A; de OLIVEIRA, C. A. R. Introduction—Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems. In *Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems*, 22, 7-20, 2016.

BERNET, D; SCHMIDT, H; MEIER, W; BURKHARDT-HOLM, P; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22, 25–34, 1999.

CHOVANEC, A; HOFER, R; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In *Trace metals and other contaminants in the environment*, 6, 639-676, 2003.

COX, A. G; GOESSLING, W. The lure of zebrafish in liver research: regulation of hepatic growth in development and regeneration. *Curr Opin Genet Dev*, 32, 153-61, 2015.

DAI, Y-J; YONG-FANG, J; NA, C; WAN-PING, B; QIN-KAI, L; YAN-BO, M; YAN-LING, C; DE-SHENG, P. *Zebrafish* as a model system to study toxicology, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33, n. 1, 11–17, 2014.

DONAT-P, H; ANASTAZIA, T; BANASZAK, V. E; VILLAFAÑE, M. A. N; RAÚL, A. G; HELBLING, E. W. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implication. *Science of The Total Environment*, 713, 2020.

FERREIRA, T; RASBAND, W. ImageJ user guide-IJ1.46r. - 2012.

FIELD, H. A; OBER, E. A; ROESER, T; STAINIER, D. Y. Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Dev Biol*, 15; 253(2), 279-90, 2003.

FOURNIE, J. W; KROL, R. M; HAWKINS, W. E. Fixation of Fish Tissues. *The Laboratory Fish*, 569–578, 2000.

FREITAS, C. E. C; SIQUEIRA-SOUZA, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. *Revista Agrogeoambiental*, v. 1, n. 2, 2009.

MADAKASHIRA, B.P; ZHANG, C; MACCHI, F; MAGNANI, E; SADLER, K. C. Nuclear Organization during Hepatogenesis in Zebrafish Requires Uhrf1. *Genes* (Basel), 16; 12(7):1081, jul, 2021.

MAGALHÃES, D. de P; FERRÃO, A. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras*, 12, n.3, 355-381, 2008.

PAUL, M. J; MEYER, J. L. Streams in the urban landscape. *Annual review of ecology and systematics*, 32, n. 1, 333-365, 2001.

POLEKSIC, V; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller, R., Lloyd, R. (Eds.), *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Fishing News Books, Oxford, 339–352, 1994.

PU, W; ZHOU, B. Hepatocyte generation in liver homeostasis, repair, and regeneration. *Cell Regen*, jan, 6, 11(1):2, 2022.

RIBEIRO-BRASIL, D. R. G. TORRES, N.R; PICANÇO, A. B; SOUSA, D. S; RIBEIRO, V. S; BRASIL, L. S, MONTAG, L. F. de A. Contamination of stream fish by plastic waste in the Brazilian Amazon. *Environmental Pollution*, 266, 2020.

SEGURA, B. M. Biomarcadores histopatológicos em zebrafish (*Danio rerio*) usados no biomonitoramento em córregos urbanos de Campo Grande – MS. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal) - Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2023.

VUKOVIC, L. D; JEVTIC, P; EDENS, L. J; LEVY, D. L. New insights into mechanisms and functions of nuclear size regulation. *International review of cell and molecular biology*, 322, 1-59, 2016.

WALLING, M. A; JANOVITZ, E. B. Morphological manifestations of toxic cell injury. In.: Wallig MA, Bolon B, Haschek WM, Rousseaux CG (eds) *Fundamentals of toxicologic pathology*, Academic Press, 59-81, 2018.

ZIELINSKA, K. A; GREALY, M; DOCKERY, P. A stereological study of developmental changes in hepatocyte ultrastructure of zebrafish (*Danio rerio*). *J Anat*, jun, 236(6), 996-1003, 2020.