



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Biomarcadores histopatológicos em *zebrafish* (*Danio rerio*) usados no biomonitoramento em córregos urbanos de Campo Grande – MS

Bianca Marques Segura

Dissertação apresentada à Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Letícia Gediél Rivero-Wendt

Campo Grande, MS

Fevereiro, 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Luciana Marques Segura e Valdir Segura, por sempre terem me apoiado nessa jornada, desde o início da minha graduação de biologia até o momento em que finalizo a minha pós-graduação de mestrado em biologia Animal.

Não teria conseguido sem o apoio e a presença deles em minha vida.

À Ana Beatriz Coriguazi Pizzotti, por ter estado do meu lado há tantos anos, e por sempre ter me apoiado e incentivado a continuar essa jornada e todas outras que passamos juntas.

Ao meu orientador, Carlos Eurico dos Santos Fernandes, pela orientação, apoio e paciência durante esses dois anos de mestrado.

À minha coorientadora, Carla Letícia Gediel Rivero Wendt, por ter auxiliado na orientação do projeto.

Ao pessoal do laboratório LAPEX, por terem me auxiliado na colheita de sangue, no preparo e coloração das lâminas e de todas as formas que auxiliaram no meu aprendizado nesses 2 anos de mestrado.

Ao Edgar Sandim de Macedo, por ter concedido o laboratório ANANTECN para realizar as análises físico-químicas da água, e por ter me auxiliado no meu crescimento profissional.

À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, a qual agradeço a todos os professores pelos ensinamentos transmitidos durante essa trajetória, e pela oportunidade de realização desse mestrado.

RESUMO

A biota aquática está constantemente exposta a uma grande quantidade de substâncias tóxicas, provenientes das atividades humanas que vêm alterando os processos físico-químicos e biológicos das fontes de água. No entanto isso contribui para a redução da qualidade ambiental, como também pode comprometer a saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas. Nesse sentido, o biomonitoramento a partir dos organismos aquáticos (bioindicadores), possibilita a detecção dos efeitos de compostos tóxicos que possam estar presentes no ecossistema aquático. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo utilizar o *Danio rerio* como bioindicador ambiental para analisar os efeitos da água de diferentes ambientes aquáticos urbanos da cidade de Campo Grande – Mato Grosso do Sul em um sistema de biomonitoramento passivo, comparando a dinâmica temporal de marcadores morfológicos eritrocitários, histológicos branquiais e hepáticos, e a concentração de tióis não protéicos (fragmento muscular) em espécimes expostos e não expostos por 3, 6 e 12 dias de exposição. Todos os córregos apresentaram características qualitativas diferentes referente aos parâmetros físico-químico. A presença de metais como Mn, Zn, Fe, Cr e Al, além do pH, temperatura e nitrito explicaram 35,1% da variância enquanto que sólidos totais, condutividade elétrica, amônia, nitrito e oxigênio dissolvido explicaram 27,6%, por meio da análise de PCA. Espécimes expostos às águas dos três córregos mostraram diferenças significativas entre os controles para a frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias, perfil histopatológico branquial e hepático, por meio do índice de alterações histológicas (IAH) e alterações das concentrações de tióis não proteicos (TNP). Nossos resultados suportam estudos anteriores que registram efeitos antrópicos no ambiente aquáticos em córregos urbanos. Três dias de exposição foram suficientes para causar danos morfológicos nos núcleos eritrocitários e histopatológicos branquiais que variaram desde a proliferação, descamação e necrose do epitélio lamelar primário até fusão e aneurismas no epitélio lamelar secundário. No fígado, aos três dias de exposição foram observadas figuras nucleares degenerativas, seguidas por hipertrofia hepatocelular, lipidose e necrose aos 12 dias. O modelo empregado de biomonitoramento permitiu comparar a dinâmica temporal de diferentes marcadores de hígidez, utilizando o *zebrafish* como bioindicador ambiental. Estudos futuros podem aperfeiçoar esse modelo para outros ambientes aquáticos a fim de subsidiar novas abordagens aos estudos de biomonitoramento.

Palavras-chave: Bioindicador, citotoxicidade, ecotoxicologia, dinâmica temporal, peixe

ABSTRACT

The aquatic biota is constantly exposed to many toxic substances resulting from human activities that have been altering the physical-chemical and biological processes of water sources. However, this contributes to the reduction of environmental quality, as it can also compromise the health of the living being that inhabit these ecosystems. In this sense, biomonitoring based on aquatic organisms (bioindicators) makes it possible to detect the effects of toxic compounds that may be present in the aquatic ecosystem. Thus, this work aimed to use *Danio rerio* as an environmental bioindicator to analyze the effects of water from different urban aquatic environments in the city of Campo Grande - Mato Grosso do Sul in a passive biomonitoring system, comparing the temporal dynamics of morphological markers erythrocytes, branchial and hepatic histology, and the concentration of non-protein thiols (muscle fragment) in specimens exposed and not exposed for 3, 6 and 12 days. All streams showed different qualitative characteristics regarding physical-chemical parameters. The presence of metals such as Mn, Zn, Fe, Cr, and Al, in addition to pH, temperature, and nitrite, explained 35.1% of the variance, while total solids, electrical conductivity, ammonia, nitrite, and dissolved oxygen explained 27.6%, for through PCA analysis. Specimens exposed to the waters of the three streams showed significant differences between controls for the frequency of erythrocyte nuclear abnormalities, gill and liver histopathological profile, through the histological alterations index (AHI) and concentration of non-protein thiols (NPT). Our results support previous studies that recorded anthropic effects on the aquatic environment in urban streams. Three days of exposure were enough to cause morphological damage in the erythrocyte nuclei and histopathological markers such as proliferation, desquamation, and necrosis of the primary lamellar epithelium; fusion and aneurysms in the secondary lamellar epithelium. In the liver, degenerative nuclear figures were observed after three days of exposure, followed by hepatocellular hypertrophy, lipidosis, and necrosis at 12 days. The employed biomonitoring model allowed comparing the temporal dynamics of different health markers, using zebrafish as an environmental bioindicator. Future studies may improve this model for other aquatic environments in order to support new approaches to biomonitoring studies.

Key-words: Bioindicator, cytotoxicity, ecotoxicology, temporal dynamics, fish.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** (A). Localização das microbacias urbanas Lagoa, Anhandui e Bandeira inseridas na malha urbana de Campo Grande, localizado no estado de Mato Grosso do Sul. (B). Localização dos pontos de coleta, sendo o ponto 1 para o Córrego Lagoa; Ponto 2, córrego Anhanduí e ponto 3, Córrego Bandeira. Fonte de dados vetoriais obtidos em: IBGE (2021), e SEMADUR (2021). Confeção: LabGIS - Laboratório de Geoprocessamento para Aplicações Ambientais, UFMS. 15
- FIGURA 2:** Sistema fechado de fluxo contínuo constituído por 3 aquários de 4 L (3 dep, 6 dep e 12 dep), 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. 17
- FIGURA 3:** Análise de componentes principais (CPA) mostrando parâmetros físico-químicos da água mensurada nos tempos 1, 3, 6 e 12 dias de biomonitoramento em córregos no município de Campo Grande, MS. Sólidos dissolvidos totais (SDT), condutividade (Cond), temperatura (Temp), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), pH, cromo (Cr), alumínio (Al), nitrogênio nitrato (N. Nitrato), nitrogênio amoniacal (N. Amoniacal), nitrogênio nitrito (N. Nitrito) e oxigênio dissolvido (OD). 22
- FIGURA 4:** Frequência de anormalidades nucleares nos eritrócitos de acordo com o tempo de exposição e córregos urbanos. *, $p < 0,05$ entre controles e expostos; letras distintas representam diferença ($p < 0,05$) entre córregos e tempos de exposição. +, média. 23
- FIGURA 5:** Valores médios (\pm erro padrão da média) para o índice de alterações histológicas (IAH) branquiais e hepáticas de acordo com o tempo de exposição e córregos urbanos. *, $p < 0,05$ entre controles e expostos; letras distintas representam diferença $p < 0,05$ entre córregos e tempos de exposição. 24
- FIGURA 6:** Corte histológico sagital de fragmentos branquias. (a) e (b) segmentos em espécimes controle; e, células epiteliais escamosas; lp, lamela principal; ls, lamela secundária; sv, sulco venoso; cp, células pilares; er, eritrócitos; cc, células cloreto; ca, cartilagem lamelar principal; m, macrófagos vasculares; barra = 50 μm em a e 20 μm em b. (c), segmentos lamelares apresentando edema intralamelar com destaque para uma área focal de necrose (\leftrightarrow) em espécime do córrego Anhanduí, 12 d; depósitos de hemossiderina de coloração amarelada são observados; severa deposição de muco (m) podem ser observadas no espaço interlamelar; barra = 100 μm . (d), maior aumento mostrando a presença de edema (ed) intralamelar em espécime do córrego Lagoa, 6 d.; barra = 50 μm . (e), segmento apresentando um aneurisma (an) distal e edema intralamelar em espécime do córrego Anhanduí, 12 d; barra 25

= 50 μm . (f), aspecto morfológico da aderência (ad) lamelar e processo descamativo (d) do epitélio escamoso; sulco venoso apresentase congestionado – espécime do córrego Bandeira, 6 d; barra = 50 μm . (g), aspecto em menor aumento de lamelas apresentando severa fusão com hiperemia e vasodilatação capilar (\leftrightarrow) em espécime do córrego Bandeira, 12 d; barra = 50 μm

FIGURA 7: Corte histológicos hepáticos de zebrafish. (a), (b) e (c), imagens de espécimes controle; em (a), menor aumento mostrando as características gerais do parênquima hepático evidenciando um segmento venoso portal (v), arteríolas (a) hepáticas e ducto biliar (d); intestino anterior (i) e camada muscular lisa; p, pâncreas exócrino; barra = 100 μm . (b), maior aumento evidenciando a característica morfológica do parênquima hepático de um espécime fêmea; v, veia porta; barra = 30 μm ; (c) aspecto em maior aumento do parênquima hepático de espécime macho; barra = 30 μm . (d), aspecto do parênquima hepático de espécime do córrego Bandeira (12 d) evidenciando lipidose focal extensiva; t, parênquima testicular; barra = 100 μm . (e), imagem em maior aumento do espécime observado em (d); nota-se aspecto celular típico de lipidose hepática; núcleos celulares são deslocados para periferia; hepatócitos com citoplasma granuloso e fosco apresentam grau degenerativo aumentado (seta) barra = 30 μm . (f) áreas de necrose (n) focais difusamente distribuídas no parênquima hepático em espécime do córrego Bandeira (12 d); barra = 100 μm ; (g), aspecto em maior aumento da imagem anterior evidenciando duas áreas de necrose parenquimatosa hepática; barra = 30 μm .

26

FIGURA 8: Concentração em $\mu\text{mol/g}$ de tecido muscular de tióis não proteicos encontrados a partir da determinação total de sulfidrilas de acordo com o tempo de exposição e córregos urbanos. *, $p < 0,05$ entre controles e expostos; letras distintas representam diferença $p < 0,05$ entre córregos e tempos de exposição. +, mediana.

27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. <i>Danio rerio</i> como bioindicador ambiental	10
2.2. Biomarcadores histopatológicos em peixes	10
2.3. Análise nuclear eritrocitária	11
2.4. Tióis não proteicos	12
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo Geral	13
3.2. Objetivos Específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Caracterização do local de estudo	14
4.2. Coleta e análise da água	16
4.3. <i>Zebrafish</i>	16
4.4. Grupos experimentais	17
4.5. Colheita de sangue e anormalidades nucleares	17
4.6. Análise histológica	18
4.7. Determinação de tióis não proteicos (TNP)	19
4.8. Análise estatística	20
5. RESULTADOS	21
5.1. Qualidade da água.....	21
5.2. Anormalidades nucleares	22
5.3. Alterações histológicas	23
5.4. Tióis não proteicos	27
6. DISCUSSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	38

1. INTRODUÇÃO

As atividades humanas vêm alterando os processos físico-químicos e biológicos das fontes de água, o que contribui não só para a redução da qualidade ambiental, como também comprometem a saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (ARIAS *et al.*, 2007). O aumento dos compostos orgânicos no ambiente aquático afeta o equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos e, conseqüentemente, gera uma alteração nos fluxos naturais de matéria e energia (MISTURA, 2015). Dentre esses compostos, pode-se citar os dejetos lançados nos rios e córregos que acabam contaminando os corpos d'água, alterando suas propriedades físico-químicas como turbidez, cor, matéria orgânica e nitrogênio total, fazendo com que isso reflita em alterações no índice de qualidade das águas (MISTURA, 2015).

Nesse contexto, a biota aquática está constantemente exposta a uma variedade e misturas de substâncias tóxicas, provenientes de diversas fontes de emissão, assim como a descarga de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais (ARIAS *et al.*, 2007). Portanto, é necessário a realização de monitoramento contínuo destas águas, pois a presença dessas substâncias pode afetar tanto a qualidade ambiental como compromete a saúde dos seres vivos (HADER *et al.*, 2020).

O biomonitoramento a partir dos organismos aquáticos, bioindicadores, possibilita a detecção dos efeitos de compostos tóxicos que possam estar presentes nos ecossistemas impactados pela atividade antrópica.

O monitoramento físico-químico das águas traz algumas vantagens e desvantagens na avaliação dos impactos ambientais, sendo considerado uma vantagem a identificação imediata das modificações das propriedades da água (GOULART, 2003). No entanto, como desvantagem, pode ser citada a descontinuidade temporal e espacial das amostragens, sendo que esse tipo de análise mostra apenas os resultados momentâneos causados pela poluição dessas águas. Além disso, se as medições químicas forem feitas longe da fonte poluente, não serão capazes de detectar perturbações sutis sobre os ecossistemas (RASHED, 2001).

Nesse sentido, as comunidades biológicas utilizadas como bioindicadores podem refletir a integridade ecológica dos ecossistemas, mostrando os resultados a longo prazo e que eventualmente afetariam todo o compartimento aquático (BARBOUR *et al.*, 1999).

Outra maneira de avaliar estes impactos é utilizar espécies como bioindicadores, e isso pode ser estudado de duas formas: *i*) associar os impactos em níveis superiores de organização como populações, comunidades e ecossistemas, ou *ii*) avaliá-las no nível individual, a partir das alterações comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimento e reprodução, assim como alterações bioquímicas e fisiológicas, que incluem alterações estruturais em órgãos-alvo (ARIAS *et al.*, 2007; LIEBEL *et al.*, 2013).

Os indicadores biológicos são úteis por sua especificidade em relação a certos tipos de impacto, sendo que muitas espécies são sensíveis a alguns tipos de poluente e mais tolerantes a outros (CHOVANEK *et al.*, 2003). Os índices da qualidade ambiental podem ser criados especificamente, de acordo com o tipo de impacto, tais como poluentes fósseis, orgânicos, ácidos

e pesticidas (FREITAS, 2009). De forma geral, quanto mais rápida for a identificação dos fatores que ocasionam condições adversas ao ambiente, maior serão as chances de mitigação deste impacto aos níveis superiores de organização biológica como comunidades e ecossistemas (ARIAS *et al.*, 2007).

Com isso, os peixes são um componente comum e importante nos ecossistemas aquáticos, e podem ser utilizados como bioindicadores, pois eles refletem os distúrbios em diferentes escalas e respondem de maneira diferente à contaminação, devido as características de mobilidade, história de vida e sua posição na cadeia alimentar (CHOVANEC *et al.*, 2003; FREITAS, 2009;).

Assim, existem métodos e ferramentas que ligam as informações químicas do ecossistema aquático aos efeitos biológicos evidenciados em organismos alvo (MARKERT *et al.*, 2003). Do ponto de vista ecotoxicológico, o biomonitoramento pode ser ativo, sendo desenvolvido utilizando os peixes como espécimes que são transplantados (sentinelas) em diferentes ambientes a fim de se obter análises orgânico-funcionais (ALMEIDA *et al.*, 2016). Além disso, o biomonitoramento passivo visa avaliar a água utilizando peixes como bioindicadores e é realizado em laboratório com sistemas de microcosmos, constituídos de amostras do ecossistema natural (água e sedimento) em pequena escala (MAGALHÃES *et al.*, 2008), sendo está a forma de metodologia adotada no presente trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Danio rerio* como bioindicador ambiental

Danio rerio (HAMILTON, 1822), conhecido popularmente como *zebrafish*, é uma espécie de peixe de água doce pertencente à ordem Cypriniformes, da família Danionidae (FRICKE *et al.*, 2022). Esses indivíduos possuem uma série de atributos que o tornam particularmente fáceis para uma manipulação experimental, uma vez que são pequenos e robustos, portanto, podem ser mantidos em uma quantidade grande de indivíduos de forma fácil e econômica no laboratório. (SPENCE *et al.*, 2007).

O *zebrafish* pode ser usado para estudos de monitoramento ecoambiental e avaliações de poluentes, como metais, desreguladores endócrinos e poluentes orgânicos (DAI YU-JIE *et al.*, 2014). Sua sensibilidade a diferentes contaminantes, faz com que essa espécie seja um modelo ideal para o biomonitoramento ambiental, de forma que estudos realizados com embriões e adultos seja bastante comum (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015; BABIC *et al.*, 2017). Assim, alterações na morfologia, na expressão genética, comportamento e fisiologia, são observados nesta espécie como indicadores biológicos no monitoramento ambiental (DAI YU-JIE *et al.*, 2014).

2.2. Biomarcadores histopatológicos em peixes

A histopatologia envolve o exame microscópico de células e tecidos de um organismo e a determinação semiquantitativa de anormalidades histológicas (YANCHEVA *et al.*, 2016). Assim, alterações histopatológicas vêm sendo usadas como biomarcadores da avaliação da saúde de peixes expostos a contaminantes, tanto em laboratório quanto em campo (CAMARGO *et al.*, 2007).

Uma das vantagens do uso de biomarcadores é a possibilidade de examinar os órgãos-alvo específicos, incluindo brânquias, rins e fígado, que são responsáveis pelas funções vitais dos indivíduos, como a respiração, excreção e a acumulação e biotransformação de xenobióticos em peixes (GERNHOFER *et al.*, 2001).

Dessa forma, as brânquias participam de funções como a respiração, a osmorregulação e a excreção, além de permanecerem em contato direto ao ambiente externo, o que as torna particularmente sensíveis às mudanças na qualidade da água, sendo consideradas o principal alvo dos contaminantes (CAMARGO *et al.*, 2007). Assim, alterações como descamação epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais, além da fusão parcial ou total de algumas lamelas secundárias são exemplos de mecanismos de defesa, pois é uma forma de aumentar a distância entre o meio externo e o sangue, servindo como uma barreira contra os contaminantes (ROBERTS, 1989; POLEKSIC & MITROVIC-TUTUNDZIC., 1994; CAMARGO *et al.*, 2007).

O órgão associado ao processo de desintoxicação e biotransformação de xenobióticos é o fígado, o qual, devido a sua função, posição e irrigação sanguínea, é também um dos órgãos mais afetados pelos contaminantes presentes na água (RODRIGUES & FANTA, 1998; VAN DER OOST *et al.*, 2003;). Além disso, possui como funções hepáticas a excreção de metais nocivos, a digestão e armazenamento de alimentos e metabolismo de hormônios sexuais (PARURUCKUMANI *et al.*,

2015). Portanto, alterações ultraestruturais e morfológicas no fígado têm sido usadas como biomarcadores de substâncias químicas tóxicas na avaliação de risco ambiental, uma vez que provaram ser um indicador sensível para lesões induzidas por substâncias tóxicas (BRAUNBECK & VOLKL, 1991; PARURUCKUMANI *et al.*, 2015).

O fígado é capaz de evidenciar anomalias como hepatócitos de formato irregular, vacuolização do citoplasma e núcleo em posição lateral, próximo a membrana celular (FANTA *et al.*, 2003). Além disso, é possível avaliar a quantidade de glicogênio nos hepatócitos, o qual é geralmente encontrado em animais estressados, pois ele atua como reserva de glicose para suprir a maior demanda energética que ocorre nessas situações (HINTON & LAURÉN, 1990; WILHELM F *et al.*, 2001; CAMARGO *et al.*, 2007).

2.3. Análise nuclear eritrocitária

Os eritrócitos são as células sanguíneas mais numerosas nos peixes, e são similares aos de outros vertebrados, com exceção dos mamíferos, por possuírem um formato elipsoide e possuírem núcleo (WITESKA, 2013). A contagem de eritrócitos depende fortemente das condições ambientais, como por exemplo alterações na temperatura e oxigênio dissolvido e dessa forma, ocorrem mudanças sazonais no seu número de células, o que dificulta o estabelecimento de valores de referência hematológicos (LUSKOVA, 1997).

Essas células são sensíveis às condições ambientais, sendo assim, substâncias tóxicas podem causar alterações morfológicas nos eritrócitos, tanto nos núcleos como no citoplasma (WITESKA, 2013). Assim, as anormalidades nucleares em eritrócitos são consideradas potenciais biomarcadores de exposição genética, que podem ser causadas por compostos tóxicos em indivíduos que permanecem nos ambientes sob efeitos de agentes genotóxicos (GONÇALVES *et al.*, 2020).

Dessa forma, existem diversos estudos utilizando técnicas citogenéticas que permitem a identificação de agentes mutagênicos os quais podem induzir a formação de anomalias nucleares (ARALDI *et al.*, 2015; FENECH *et al.*, 2020; CANEDO *et al.*, 2021.), além da presença de poluentes que podem induzir danos ao DNA e proteínas envolvidas no processo de divisão celular, o que pode causar a perda da integridade do genoma e levar a formação de anomalias nucleares (FENECH *et al.*, 2019).

Dentre essas anomalias nucleares, pode-se destacar os núcleos entalhados, que segundo Carrasco *et al.* (1990), é um tipo de anomalia onde ocorre a formação de fendas que se estendem para dentro do envoltório nuclear. Os núcleos binucleados são também um tipo de anomalia caracterizada pela presença de dois núcleos principais, separados ou em contato entre si, dentro de uma única célula, podendo ter tamanho e intensidade de coloração semelhantes (JINDAL & VERMA, 2015). Essa anomalia ocorre quando não há uma divisão citoplasmática durante a mitose e no processo de divisão celular, a citocinese de uma célula diploide falha após a correta replicação

do DNA, e, dessa forma, faz com que os blastômeros binucleados sejam tetraploides e possuam dois núcleos diploides (PERA & SCHWARZACHER, 1968).

Um outro tipo de anomalia nuclear conhecida é o núcleo multilobulado, descrita por Jindal e Verma (2015), que é caracterizado pela presença de várias evaginações no envoltório nuclear.

Os micronúcleos são outra anomalia nuclear frequentemente observados e são pequenos corpos extranucleares que podem se originar de cromossomos acêntricos ou fragmentos de cromátides formados durante a anáfase. Esses fragmentos de cromossomos são incapazes de aderir às fibras do fuso mitótico e se integrar ao núcleo principal na telófase, o que faz com que sejam circundados por uma membrana e deem a origem ao micronúcleo (Fenech *et al.*, 2020).

Assim, espécies de peixes, como o *D. rerio*, têm sido utilizadas em estudos ecotoxicológicos como modelo experimental para investigar a formação de micronúcleos e outras anormalidades nucleares (CANEDO *et al.*, 2021).

2.4. Tióis não proteicos

Os tióis ou grupos sulfidríla (-SH) estão presentes em toda a célula, e suas propriedades únicas como excelente nucleofilicidade, facilidade de oxidação e a capacidade de quelar metais, são a base no desempenho de seus papéis nas funções celulares. Eles podem servir como um grupo funcional envolvido em reações catalíticas enzimáticas, terminação de eletrófilos reativos tóxicos, terminação de espécies reativas de oxigênio ou espécies reativas de nitrogênio (ALQAHTANI *et al.*, 2019).

Assim, os grupos tióis são divididos em duas categorias: os tióis proteicos e os tióis não proteicos, de modo que este último possa ser composto por cisteína, homocisteína e peptídeos de moléculas pequenas contendo tióis, como a glutatona, que é o tiol não proteico mais abundante nas células (ALQAHTANI *et al.*, 2019), além de ser um composto antioxidante não enzimático que mantém a homeostase redox intracelular (DAL SANTO *et al.*, 2014).

O aumento intracelular dos grupos dos níveis de tióis não proteicos é frequentemente observado em animais expostos a compostos tóxicos ou a condições que induzem o estresse oxidativo (DAL SANTO *et al.*, 2014). Isso foi evidenciado em um estudo com *zebrafish* onde os indivíduos foram mantidos em tubos de microcentrífuga de 2 mL, com um espaço limitado, e que foi evidenciado níveis altos de grupos de tióis não proteicos devido ao aumento do estresse agudo de contenção desses indivíduos.

Devido ao papel significativo que os tióis desempenham nas funções celulares, métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação dos níveis de tiol nas células, e dentre estes estão o método do ensaio enzimático (MAEDA *et al.*, 2005), o ensaio colorimétrico (WEI *et al.*, 2011), a eletroforese em gel (HURD *et al.*, 2007), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CHEN *et al.*, 2008) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CHEN & CHANG, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar os efeitos da água de diferentes córregos urbanos do município de Campo Grande, MS, utilizando *D. rerio* como bioindicador ambiental em sistema de biomonitoramento.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a qualidade da água de três córregos urbanos por meio de análises físico-químicas;

Comparar a dinâmica temporal de marcadores histológicos branquiais, hepáticos e eritrocitários assim como de compostos tóxicos não protéticos em espécimes de *zebrafish* sob condições de biomonitoramento passivo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização do local de estudo

O município de Campo Grande (Fig. 1.A) está localizado no estado do Mato Grosso do Sul (MS), situado sobre a bacia hidrográfica do alto do Rio Paraná. A cidade se situa na região geomorfológica chamada “Região dos Planaltos Arenítico-Basálticos Interiores” que é caracterizada por um relevo plano com baixas altitudes, com média de 532 metros ao longo do município (PLANURB, 2017). O clima predominante da cidade é tropical, caracterizado por duas estações bem definidas, a seca no inverno, entre os meses de abril e setembro, e a úmida no verão, entre os meses de outubro a março (PLANURB, 2017). O principal rio do município é o Anhanduí, que é banhado por vários córregos ao longo de sua rede hidrográfica, como o córrego Lageado, Guariroba, Cachoeira e entre outros (PLANURB, 2017).

Foram analisados três córregos urbanos de Campo Grande – MS. O córrego Lagoa, que atravessa os bairros União, Santo Amaro, Caiobá, e se estende até os bairros Tijuca e Leblon; o córrego Anhanduí, que está inserido entre os bairros Sobrinho e Coopavila II se estendendo até os bairros Amambaí e Monte Líbano; e o córrego Bandeira, que nasce no bairro Rita Vieira e passa pelos bairros Jardim Paulista e Pioneiros, atingindo até o bairro Dr. Albuquerque.

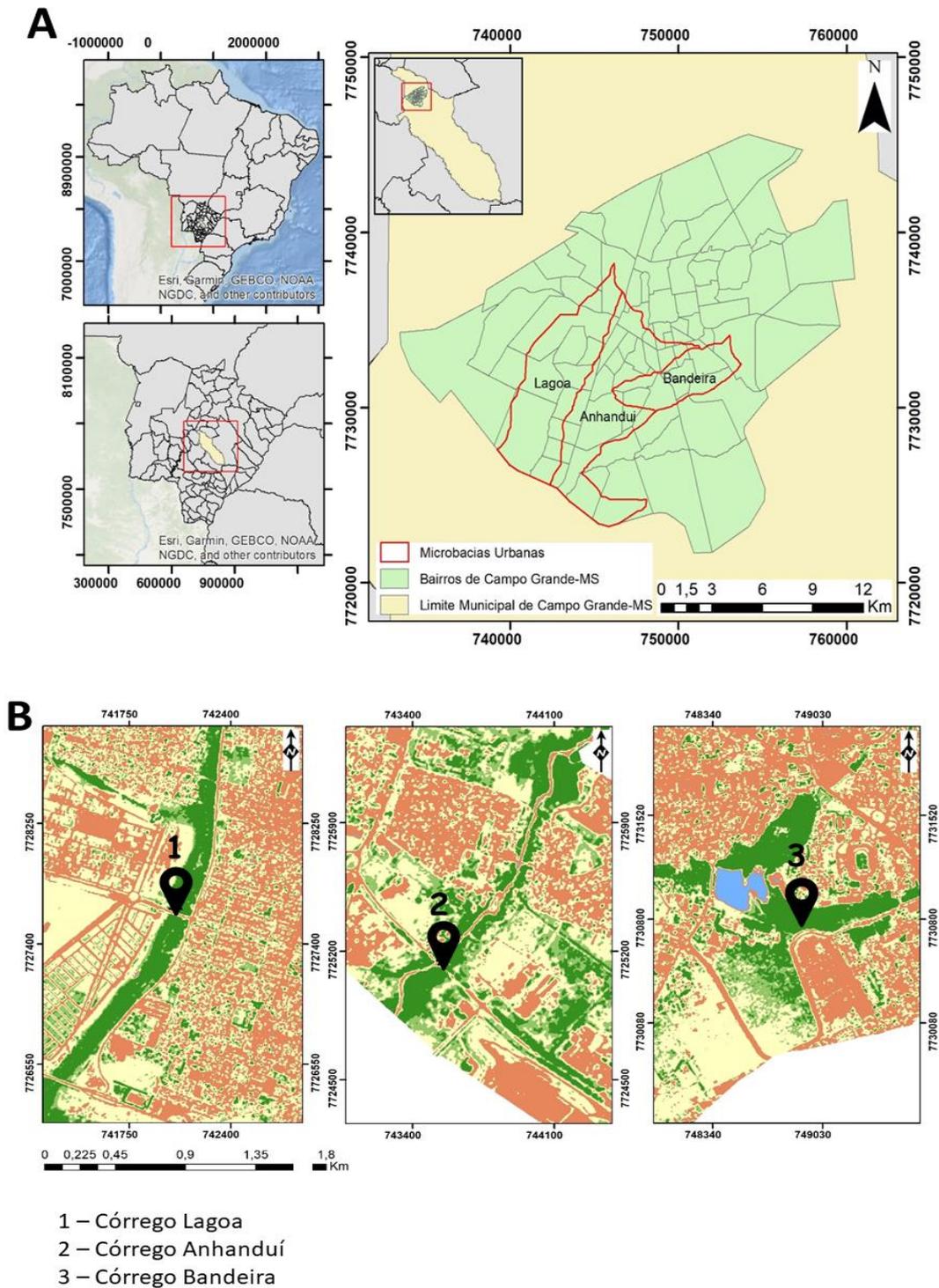


Figura 1. (A). Localização das microbacias urbanas Lagoa, Anhanduí e Bandeira inseridas na malha urbana de Campo Grande, localizado no estado de Mato Grosso do Sul. (B). Localização dos pontos de coleta, sendo o ponto 1 para o córrego Lagoa; Ponto 2, córrego Anhanduí e ponto 3, córrego Bandeira. Fonte de dados vetoriais obtidos em: IBGE (2021), e SEMADUR (2021). Confeção: LabGIS - Laboratório de Geoprocessamento para Aplicações Ambientais, UFMS.

4.2. Coleta e análise da água

As amostras de água foram coletadas nos pontos determinados pelo mapa (Fig 1.B) nas coordenadas 20°31'20.7"S 54°40'33.9"W (Córrego Lagoa), 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 sendo estes pontos determinados com base em sua localização e acessibilidade para a realização da coleta.

Foram realizadas 3 coletas entre os meses de setembro a novembro de 2021, sendo feita uma coleta para cada córrego. Foi colhido aproximadamente 20L de água de cada córrego e transportados até a Estação de Piscicultura/FAMEZ/UFMS. Uma amostra da água de cada córrego foi separada e acondicionada em frascos de polietileno para as análises físico-químicas, preservados com uma solução de ácido nítrico 50% para as análises de metais, e com ácido sulfúrico 50% para a análise de Nitrogênio amoniacal. Os parâmetros temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg O₂/L), condutividade elétrica (µS/cm) e sólidos totais (SDH, mg/L) foram mensurados no local das coletas por meio de um equipamento de multiparâmetro (Snxin—Model SX751A). Além dessas análises, novas medições foram realizadas em laboratório, utilizando método 4500-O C, 4500 H+ B, 2510 B e 2540 C para oxigênio dissolvido, pH, condutividade elétrica e sólidos dissolvidos totais, respectivamente; considerando-se estas últimas para o estudo. As demais análises físico-químicas foram realizadas em parceria com o Laboratório ANANTECN - Análise Tecnológica Ltda. Brevemente, a determinação dos níveis de nitrato foi conduzida de acordo com o método 4500-NO₃- D utilizando-se um eletrodo de íons seletivos (ISE) de nitrato HI4113 (HANNA®). A determinação do nitrito foi feita pelo método de sulfanilamida diazotizada com dicloridrato de N-(1-naftil) - etilenodiamina, em pH 2,0 a 2,5. A leitura dos valores obtidos foi feita por espectrofotometria de absorvância (UV/Vis 600 µplus, Femto®) em 543 nm. A concentração de nitrogênio amoniacal também foi obtida por espectrofotometria (UV-Vis), mediante a reação entre amônia (presente na amostra), hipoclorito e fenol, catalisada por nitroprussiato de sódio, com a absorvância no comprimento de onda de 640 nm (SMEWW, 2017).

Para as determinações das concentrações de metais, como alumínio, cromo, manganês, ferro e zinco, as amostras passaram por prévia digestão em ácido nítrico e ácido sulfúrico, para conversão da matéria orgânica em inorgânica para leitura em espectrofotometria UV/vis. As leituras de absorvância foram feitas nos comprimentos de onda 535 nm para alumínio, 540 nm para cromo, 470 nm para manganês, 510 nm para ferro e 620 nm para zinco.

4.3. Zebrafish

Espécimes adultos de *zebrafish* (n = 120) foram obtidos de fornecedor credenciado (Ogawa e Sato LTDA, Campo Grande, MS) e aclimatados em um aquário com 50 L de água dechlorada, com temperatura entre 25 e 28 °C, em um sistema de aeração artificial com limpeza dos sedimentos, renovação de 25% do volume total de água a cada 48 h e fotoperíodo controlado de 12: 12h (período

claro – escuro). Durante esse período os peixes foram alimentados com ração floculada (AquaFish 32% 5 mm, Supra®) uma vez ao dia.

4.4. Grupos experimentais

Os espécimes foram aleatoriamente divididos entre os córregos ($n = 3$). Para cada córrego, foram expostos 10 espécimes por 3, 6 e 12 dias de exposição (*dexp*), sendo que para cada período de exposição, 10 espécimes foram alocados para composição do grupo controle.

A água obtida de cada córrego foi transferida para um sistema fechado de fluxo contínuo (8 W, 100 L/h), contendo 3 aquários de 4 L (um para cada tempo de exposição), oxigenados artificialmente, conectados a um aquário estoque de 8 L (Fig. 2). Nos dias 1, 3, 6 e 12 após introdução dos espécimes nos aquários, foi colhida uma amostra da água para as análises físico-químicas.

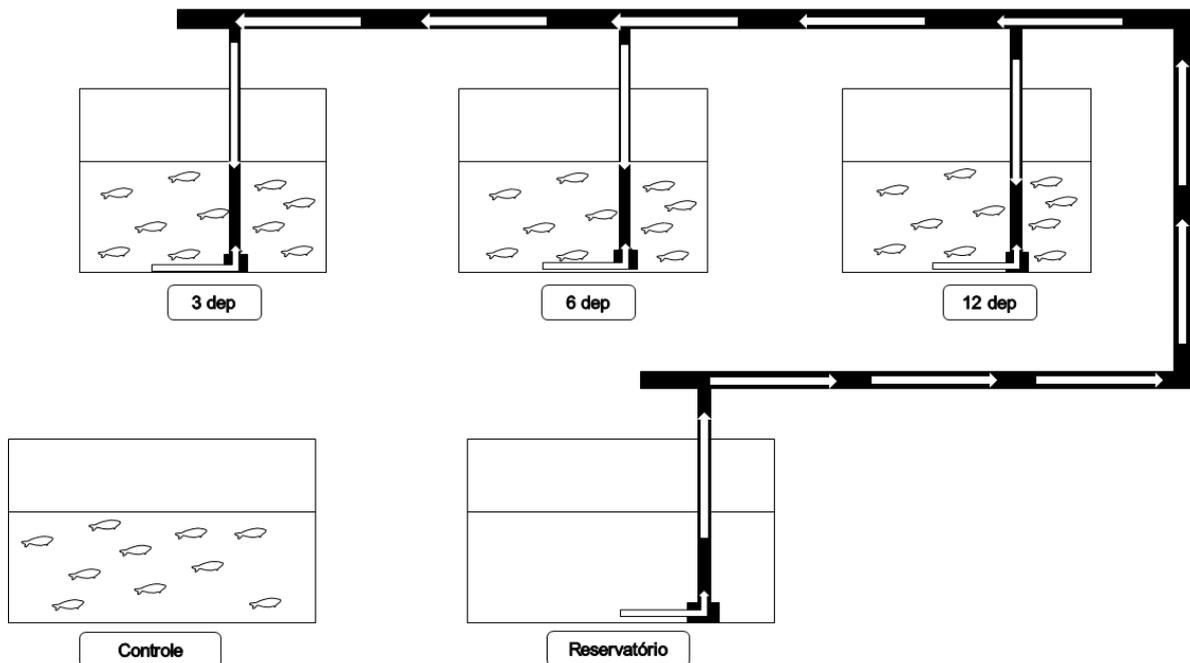


Figura 2. Sistema fechado de fluxo contínuo constituído por 3 aquários de 4 L (3 dep, 6dep e 12 dep), contendo 10 indivíduos expostos, um reservatório de água de 8L na parte inferior e um aquário individual para os espécimes controle. As setas indicam o fluxo de água gerado pela bomba de água.

4.5. Colheita de sangue e anormalidades nucleares

Após cada período de exposição, os espécimes eram eutanasiados por resfriamento rápido (0 a 4 °C), conforme MATTHEWS & VARGA (2012) e logo em seguida, era feita a colheita do sangue, por corte peduncular caudal em uma micropipeta previamente banhada em EDTA 3%. Uma extensão em lâmina foi corada por *May-Grunwald-Giemsa-Wright* (MGGW), seguindo o

procedimento descrito por AYLLON & GARCIA-VAZQUEZ (2000, 2001) e RODRIGUEZ-CEA *et al.* (2003).

Após a montagem das lâminas (Entellan Merck®), foi analisado 1000 eritrócitos de cada indivíduo em microscopia de campo claro (1000 x de magnitude) para contagem das anormalidades nucleares. Em seguida, calculou-se a frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias dos tipos classificados como micronúcleos, núcleos binucleares, núcleos entalhados, núcleos bolhosos e núcleos lobados, de acordo com CARRASCO *et al.* (1990) e CESTARI (2014).

4.6. Análise histológica

Após colheita do sangue, os espécimes foram fixados em solução de Davidson, conforme Fournie *et al.* (2000) por 24 horas e, em seguida, transferidos para solução de EDTA 10%, permanecendo por, no mínimo, 4 dias para descalcificação. Após esse período, as amostras foram seccionadas sagitalmente, separando a cabeça do corpo dos indivíduos, para ser realizado o processamento histológico de rotina e inclusão em Paraplast (Sigma Aldrich®) em cortes de 4 µm corados em hematoxilina e eosina (HE).

As análises histopatológicas foram conduzidas em microscopia de campo claro conforme classificação previamente estabelecida por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e Bernet *et al.* (1999). O grau de alteração, quando observado, considerou as características da reação padrão (*a*), assim como seu grau de reversibilidade (*w*). As Tabelas 1 e 2 apresentam as alterações histológicas branquiais e hepáticas, respectivamente, e seus graus de reversibilidade. A seguinte equação foi usada para estimar o índice de alterações histológicas (IAH):

$$IAH = \sum alt (a \times w)$$

Onde, *a*, representa a distribuição do dano (0, ausente; 1, menor; 2, moderado/focal; e 3, severa/difusa), e *w* representa o grau de reversibilidade do dano (1, facilmente reversível; 2, alterações moderadas com provável reversão após exposição; e 3, alterações irreversíveis).

Tabela 1. Alterações histológicas branquiais de acordo com o grau de reversibilidade

Alterações Histológicas *	Grau
Descamação do Epitélio lamelar secundário	1
Aneurisma	1
Atrofia lamelar	1
Proliferação celular epitelial	1
Edema das lamelas secundárias	1
Hiperemia	1
Fusão das lamelas secundárias	2
Fusão completa das lamelas secundárias	2
Ruptura do Epitélio lamelar secundário	2
Necrose ou fibrose epitelial das lamelas secundárias	3

* segundo Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e Bernet *et al.* (1999)

Tabela 2. Alterações histológicas hepáticas de acordo com o grau de reversibilidade.

Alterações Histológicas *	Grau
Esteatose/Lipidose	1
Hipertrofia dos hepatócitos	1
Edema sinusoidal/ Hiperemia Vascular	1
Infiltrado leucocitário focal	1
Infiltrado leucocitário difuso	2
Picnose/Cariólise/Cariorréxia	2
Megalocitose	2
Necrose ou fibrose focal ou difusa	3

* Bernet *et al.* (1999)

4.7. Determinação de tióis não proteicos (TNP)

Após a eutanásia, uma amostra muscular do pedúnculo caudal foi armazenada em – 20 °C para determinação dos agrupamentos de tióis não proteicos, seguindo o procedimento descrito por ELLMAN (1959). As amostras foram clivadas e homogeneizadas em uma solução de 250 µM de DTNB [ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzóico)] com tampão de fosfato de potássio 500 mM em pH 8,0 e em seguida desproteinizadas com uma solução 20% de ácido tricloroacético. A solução final, foi lida em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384 Microplate Spectrophotometer - Molecular

Devices) a uma absorbância de 412 nm. Uma curva padrão com cisteína (0,075 - 0,4 $\mu\text{mol SH}$) foi construída para calcular a concentração final de tióis não proteicos ($\mu\text{mol de SH /g de tecido}$) nas amostras.

4.8. Análise Estatística

Para os dados da qualidade da água foram estimados por um modelo multivariado de análise de componentes principais (PCA – *principal componentes analysis*) com método de correlação entre grupos (córregos), com auxílio do *software* PAST 3.0. Dados referentes aos IAHS, anormalidades dos núcleos eritrocitários e valores de tióis não proteicos (TNP), foram comparados entre os grupos (períodos de exposição) e ambientes (córregos) pela análise de variância não paramétrica (Kruskal Wallis, 1952), comparando-se as médias obtidas pelo teste de Mann Whitney. Os *softwares* SPSS v.23 (IBM®, USA) e GraphPrism 8.0 (San Diego, CA, USA) foram utilizados para estas análises.

5. RESULTADOS

5.1. Qualidade da água

De acordo com o modelo de análise, aproximadamente 60,5 % da variância pode ser explicado pelo componente 1 (CP 1), representado pelos parâmetros de pH (0,92), Manganês (0,83), Zinco (0,76), temperatura (0,72), Ferro (0,70), Alumínio (0,56), Cromo (0,50) e nitrogênio nitrato (0,48), conforme demonstrado na figura 3. Esses parâmetros foram responsáveis pela diferença na qualidade da água especialmente no córrego Bandeira. O CP 2 (componente principal 2), reteve 39,4 % da variância, representado pelos parâmetros de sólidos dissolvidos totais (0,96), condutividade elétrica da água (0,90), nitrogênio amoniacal (0,84), nitrogênio nitrito (0,63), Manganês (0,40), Zinco (0,37), oxigênio dissolvido (0,18) e nitrogênio nitrato (0,15), responsáveis pela diferença encontrada no ambiente aquático do córrego Anhanduí.

Com exceção do córrego Anhanduí, os demais apresentaram valores próximos de retenção da variância entre os períodos de exposição dos espécimes (1, 3, 6 e 12 dias). O córrego Anhanduí, apresentou discrepância entre os períodos 1 e 3 quando comparado com os dias 6 e 12, sugerindo que períodos mais prolongados possam ser um fator de risco maior para os peixes expostos neste ambiente.

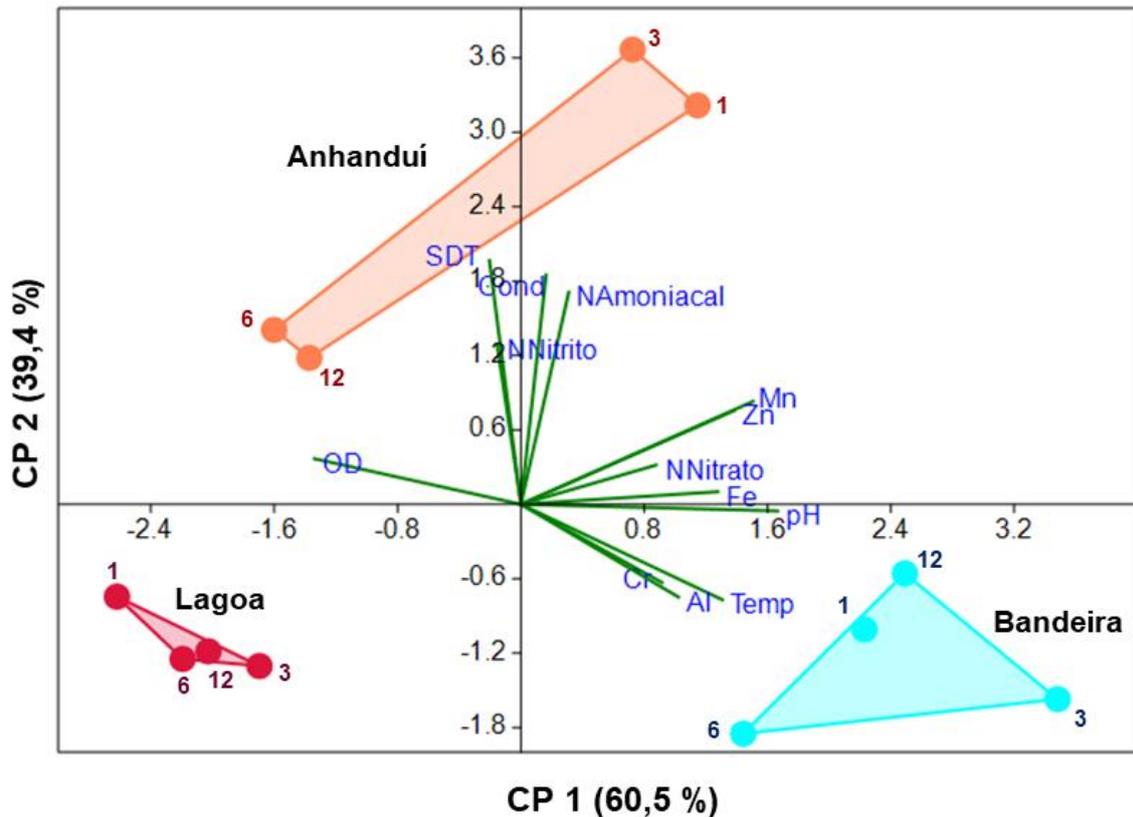


Figura 3. Análise de componentes principais (CPA) mostrando parâmetros físico-químicos da água mensurada nos tempos 1, 3, 6 e 12 dias de biomonitoramento em córregos no município de Campo Grande, MS. Sólidos dissolvidos totais (SDT), condutividade (Cond), temperatura (Temp), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), pH, cromo (Cr), alumínio (Al), nitrogênio nitrato (N. Nitrato), nitrogênio amoniacal (N. Amoniacal), nitrogênio nitrito (N.Nitrito) e oxigênio dissolvido (OD).

5.2. Anormalidades nucleares

Após as análises e contagem de anormalidades nucleares dos eritrócitos, as observadas foram: núcleos entalhados, núcleos lobados, núcleos bolhosos e micronúcleos. Os resultados obtidos estão demonstrados na Fig. 4, comparando os indivíduos controle (não expostos) com os indivíduos expostos, para cada tempo de exposição.

A análise de anormalidades nucleares eritrocitárias apresentou maior frequência de alterações para os indivíduos expostos à água do córrego Bandeira, no dia 12 de exposição. Nos demais córregos e períodos os valores encontrados foram diferentes dos controles, de modo que os indivíduos expostos às águas dos córregos apresentassem uma frequência maior de anormalidades quando comparado com os indivíduos controles, sendo que o córrego Lagoa apresentou maior contagem de formas anormais no dia 6.

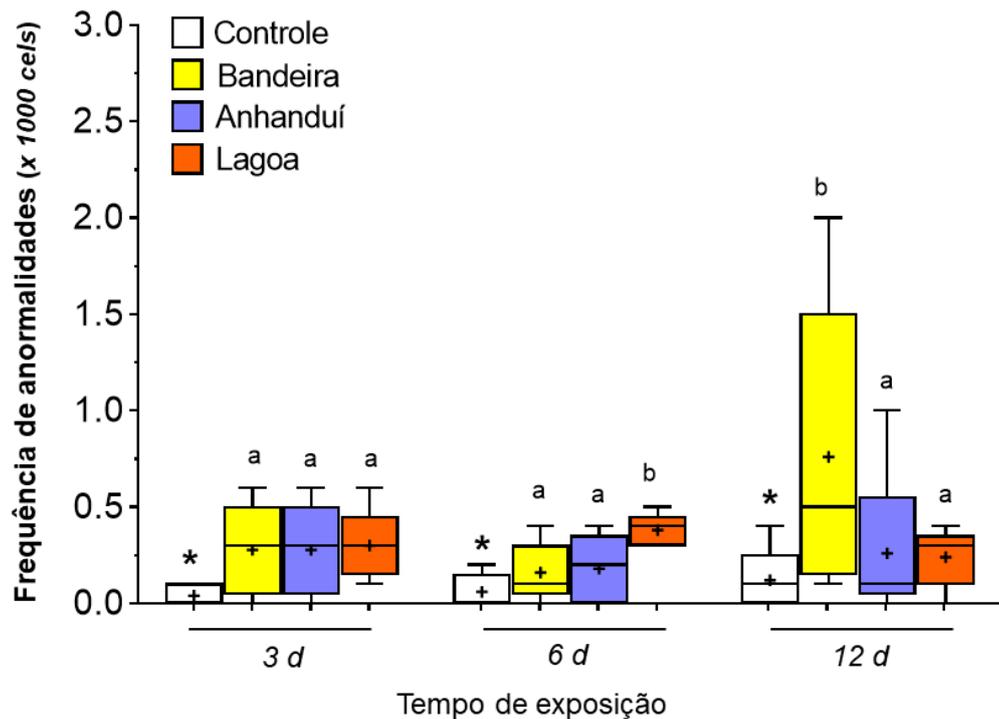


Figura 4. Frequência de anormalidades nucleares nos eritrócitos de acordo com o tempo de exposição e córregos urbanos. *, $p < 0,05$ entre controles e expostos; letras distintas representam diferença ($p < 0,05$) entre córregos e tempos de exposição. +, média.

5.3. Alterações Histológicas

As alterações histológicas estiveram presentes nos peixes expostos às águas dos três córregos estudados e nos três tempos de exposição. Em todos os indivíduos expostos, foram identificadas lesões branquiais como necrose das células epiteliais, proliferação e ruptura do epitélio lamelar secundário, fusão das lamelas secundárias, atrofia lamelar e descamação do epitélio lamelar secundário e aneurisma. Necrose epitelial das lamelas, foram mais frequentes aos 12 dias de exposição para o córrego Bandeira e Anhanduí. Para as alterações hepáticas, foram observadas lesões do tipo picnose, cariólise, cariorrexia e megalocitose como alterações nucleares, presentes nos indivíduos expostos nos 3 tempos. No entanto, houve maior frequência dessas alterações nucleares aos 12 dias. Lipidose e necrose focal ou difusa e hipertrofia dos hepatócitos foram observadas nos indivíduos expostos para os três córregos amostrados, ocorrendo em maior frequência também após 12 dias. Alterações circulatórias tais como hiperemia vascular, edema sinusoidal e infiltrado leucocitário focal e difuso, foram encontradas nos indivíduos expostos ao córrego Bandeira, e as inflamatórias, para os indivíduos aos córregos Anhanduí e Lagoa. Os resultados do IAH branquial e hepático estão demonstrados na Fig. 5 e algumas lesões encontradas com maior frequência estão representadas nas Fig. 6 e 7.

Ao comparar o IAH (Índice de alteração histológica) branquial entre os indivíduos expostos, foi observado que no período de 3 dias, os indivíduos do córrego Bandeira e Lagoa, apresentaram

valores bem próximos, diferentemente do que ocorreu com os espécimes expostos ao córrego Anhanduí, os quais apresentaram índices inferiores. No período de 6 dias, não houve diferença do IAH branquial entre os córregos Bandeira e Lagoa. No entanto, após o período de 12 dias, observou-se aumento do IAH para o córrego Lagoa e Anhanduí, quando comparado aos períodos anteriores. O índice observado no córrego Bandeira, permaneceu próximo aos valores observados aos 3, 6 e 12 dias de exposição. Além disso, todos os indivíduos expostos apresentaram um IAH branquial maior quando comparado com os indivíduos controles.

Para o fígado, com exceção dos indivíduos do córrego Anhanduí aos 3 e 6 dias de exposição, todos os demais apresentaram valores superiores do IAH em relação aos respectivos controles. O IAH observado nos indivíduos expostos a água do córrego Lagoa, foi maior quando comparado com os outros córregos aos 12 dias.

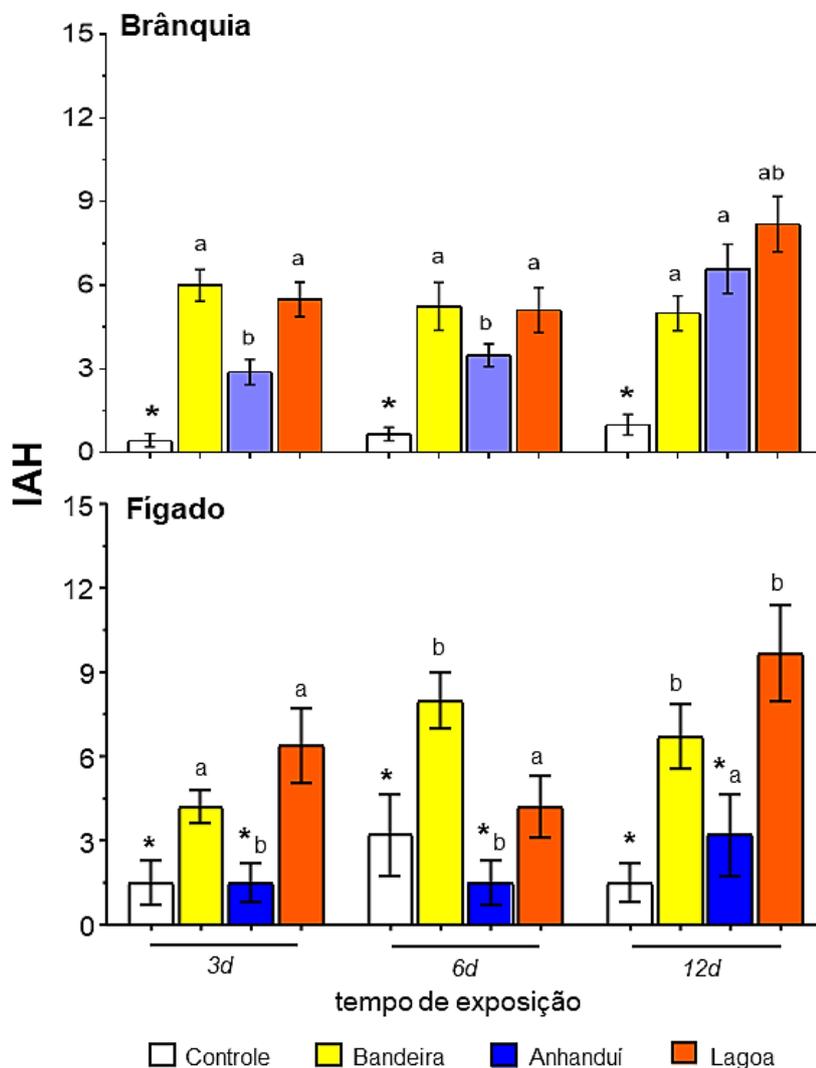


Figura 5. Valores médios (\pm erro padrão da média) para o índice de alterações histológicas (IAH) branquiais e hepáticas de acordo com o tempo de exposição e córregos urbanos. *, $p < 0,05$ entre controles e expostos; letras distintas representam diferença $p < 0,05$ entre córregos e tempos de exposição.

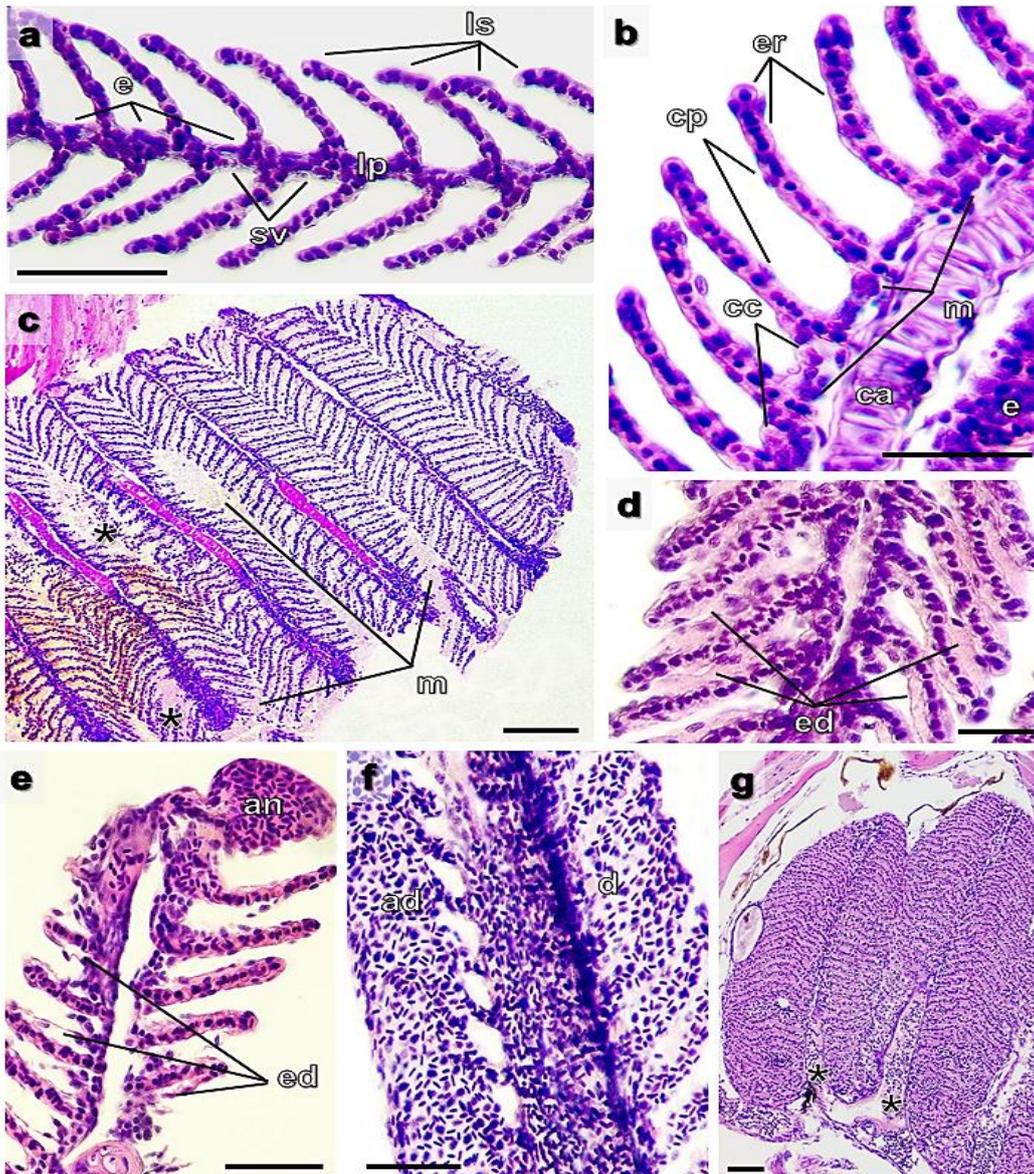


Figura 6. Corte histológico sagital de fragmentos branquias. **(a)** e **(b)** segmentos em espécimes controle; **e**, células epiteliais escamosas; **lp**, lamela principal; **ls**, lamela secundária; **sv**, sulco venoso; **cp**, células pilares; **er**, eritrócitos; **cc**, células cloreto; **ca**, cartilagem lamelar principal; **m**, macrófagos vasculares; *barra* = 50 μm em **a** e 20 μm em **b**. **(c)**, segmentos lamelares apresentando edema intralamelar com destaque para uma área focal de necrose (\star) em espécime do córrego Anhanduí, 12 d; depósitos de hemossiderina de coloração amarelada são observados; severa deposição de muco (**m**) podem ser observadas no espaço interlamelar; *barra* = 100 μm . **(d)**, maior aumento mostrando a presença de edema (**ed**) intralamelar em espécime do córrego Lagoa, 6 d.; *barra* = 50 μm . **(e)**, segmento apresentando um aneurisma (**an**) distal e edema intralamelar em espécime do córrego Anhanduí, 12 d; *barra* = 50 μm . **(f)**, aspecto morfológico da aderência (**ad**) lamelar e processo descamativo (**d**) do epitélio escamoso; sulco venoso apresenta-se congestionado – espécime do córrego Bandeira, 6 d; *barra* = 50 μm . **(g)**, aspecto em menor aumento de lamelas apresentando severa fusão com hiperemia e vasodilatação capilar (\star) em espécime do córrego Bandeira, 12 d; *barra* = 50 μm .

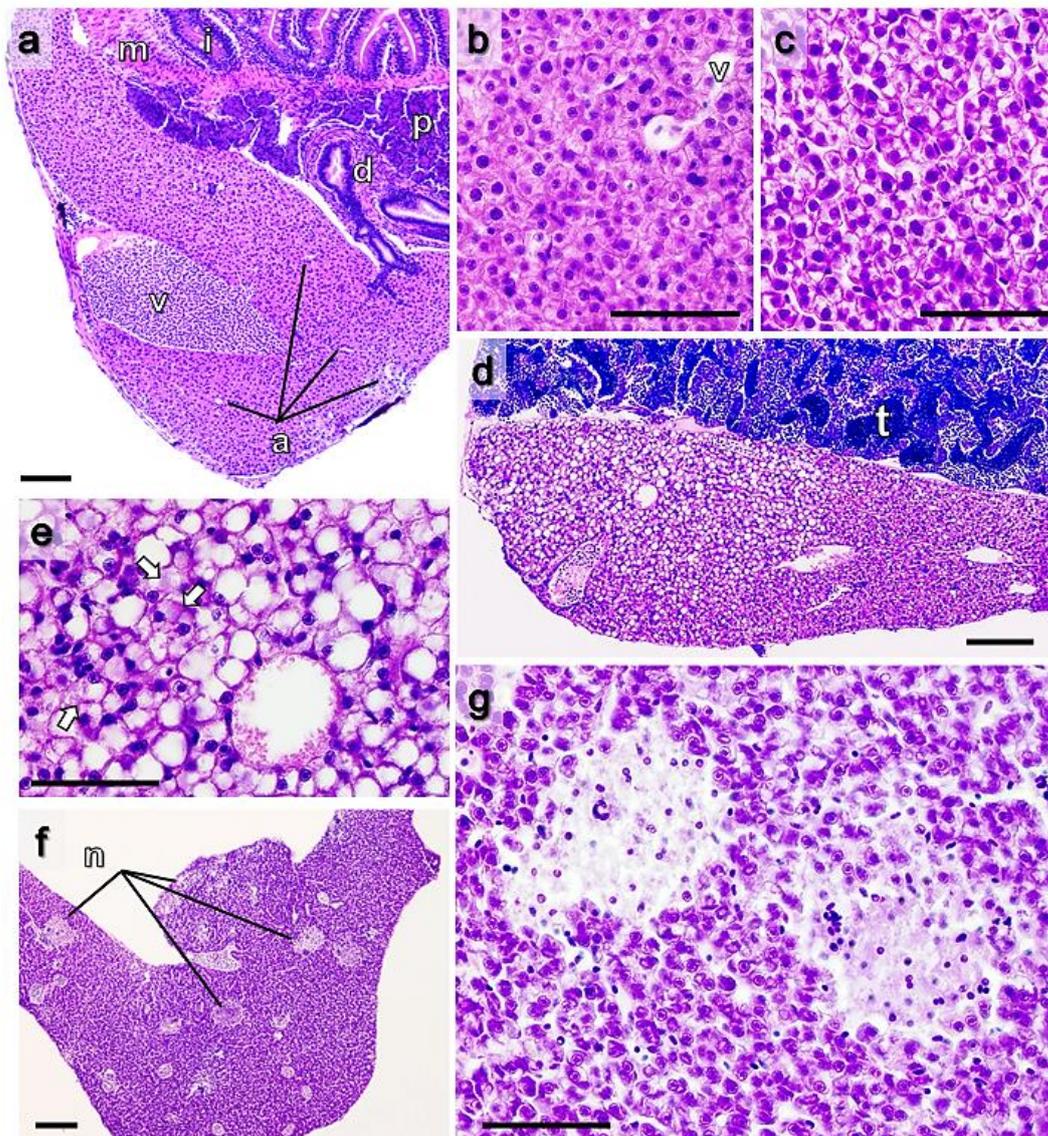


Figura 7. Corte histológicos hepáticos de *zebrafish*. **(a)**, **(b)** e **(c)**, imagens de espécimes controle; em **(a)**, menor aumento mostrando as características gerais do parênquima hepático evidenciando um segmento venoso portal (**v**), arteríolas (**a**) hepáticas e ducto biliar (**d**); intestino anterior (**i**) e camada muscular lisa; **p**, pâncreas exócrino; *barra* = 100 μm . **(b)**, maior aumento evidenciando a característica morfológica do parênquima hepático de um espécime fêmea; **v**, veia porta; *barra* = 30 μm ; **(c)** aspecto em maior aumento do parênquima hepático de espécime macho; *barra* = 30 μm . **(d)**, aspecto do parênquima hepático de espécime do córrego Bandeira (12 d) evidenciando lipidose focal extensiva; **t**, parênquima testicular; *barra* = 100 μm . **(e)**, imagem em maior aumento do espécime observado em **(d)**; nota-se aspecto celular típico de lipidose hepática; núcleos celulares são deslocados para periferia; hepatócitos com citoplasma granuloso e fosco apresentam grau degenerativo aumentado (seta) *barra* = 30 μm . **(f)** áreas de necrose (**n**) focais difusamente distribuídas no parênquima hepático em espécime do córrego Bandeira (12 d); *barra* = 100 μm ; **(g)**, aspecto em maior aumento da imagem anterior evidenciando duas áreas de necrose parenquimatosa hepática; *barra* = 30 μm .

5.4. Tióis não proteicos (TNP)

Os resultados obtidos para o TNP foram demonstrados na Fig. 8. As concentrações foram diferentes dos grupos controles quando comparadas com os córregos e em todos os períodos de exposição. No entanto, com exceção do córrego Anhanduí, no período de 12 dias, as demais concentrações não diferiram entre os indivíduos expostos.

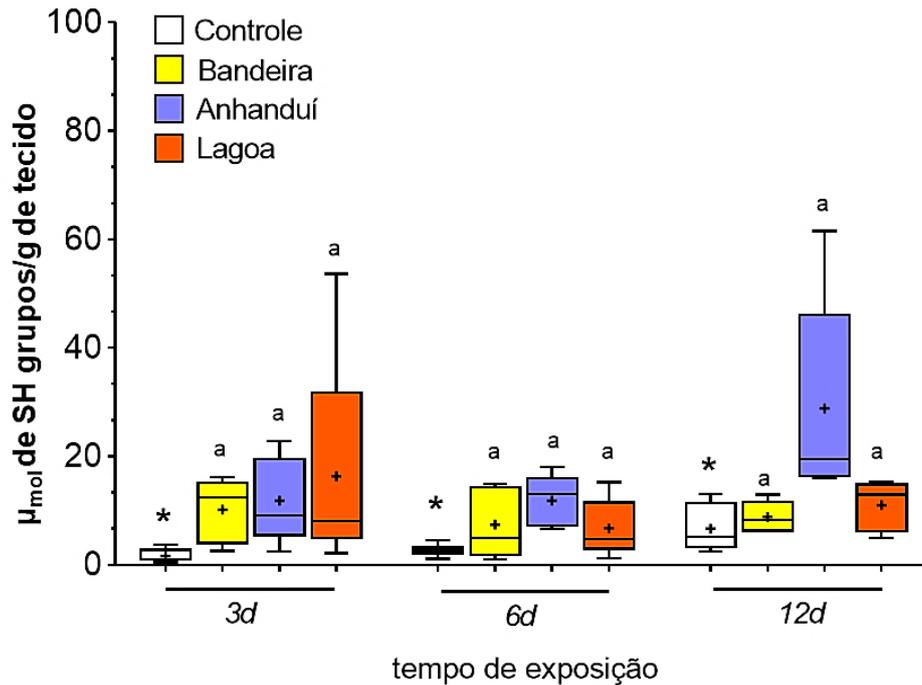


Figura 8. Concentração em $\mu\text{mol/g}$ de tecido muscular de tióis não proteicos encontrados a partir da determinação total de sulfidrilas de acordo com o tempo de exposição e córregos urbanos. *, $p < 0,05$ entre controles e expostos; letras distintas representam diferença $p < 0,05$ entre córregos e tempos de exposição. +, mediana.

6. DISCUSSÃO

Em geral, córregos urbanos são antropizados por uma ampla gama de produtos químicos de diversas naturezas, os quais impactam o ambiente aquático e a cadeia trófica piscívora (PAUL & MEYER, 2001; LISI *et al.*, 2018; RIBEIRO-BRASIL *et al.*, 2020). Neste sentido, esforços têm sido feitos com o objetivo de desenvolver métodos práticos de biomonitoramento a fim de se estimar as perdas e efeitos sobre a biota, minimizando os impactos sobre o ambiente aquático. Esta abordagem, no entanto, usualmente observa padrões ecológicos e efeitos trópicos nas comunidades de peixes diretamente no seu habitat (PERESSIN & CETRA, 2014; PERESSIN *et al.*, 2020). No presente estudo, o método de biomonitoramento passivo foi aplicado a um modelo *in vivo* para comparação de ambientes aquáticos em áreas com altas taxas de urbanização (BOOTH *et al.*, 2016; ALESCI *et al.*, 2022). Este modelo mostrou-se eficaz para demonstrar que além do ambiente, o tempo de exposição é um fator importante para o estudo das respostas orgânicas em peixes bioindicadores.

A presença de metais como zinco, manganês, ferro, alumínio e cromo foram determinantes para as diferenças entre os ambientes estudados, sugerindo diversidade na origem dos resíduos assim como dos fluxos episódicos de escoamento das águas fluviais para os três córregos (TURPIN-NAGEL & VADAS, 2016). Por outro lado, a presença de resíduos amoniacais, além do nitrato e nitrito sugere condições anormais provenientes de fontes biológicas poluidoras, conforme observado no córrego Anhanduí. Porém, todos os ambientes avaliados demonstram condições potenciais de antropização, conforme revisado por Walsh *et al.* (2014) em um processo conhecido como “síndrome do córrego urbano”. Assim, é razoável supor que a absorção e biotransformação desses poluentes causem alterações em períodos relativamente curtos de exposição. Com poucas exceções, praticamente todos os biomarcadores analisados apresentaram-se significativamente elevados no terceiro dia de exposição, período suficiente para induzir respostas orgânicas nocivas aos bioindicadores. O grau de toxicidade dos metais, depende da espécie, idade e tamanho do organismo, além da caracterização do metal, condição ambiental e química da água, tais como pH, temperatura, alcalinidade, dureza, sólidos totais e entre outros, as quais influenciam a biodisponibilidade e bioacumulação destes elementos no organismo (NORDBERG *et al.*, 2015). Embora, não se tenha determinado a bioacumulação dos metais nos espécimes, a distribuição destes junto às variações do pH entre os ambientes, sugere condições ambientais adversas resultando em mudanças no perfil metabólico a partir da elevação das reações oxidativas teciduais (GARAI *et al.*, 2021; PASCHOALINI & BAZZOLI, 2021; SHAHJAHAN *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo pode ter efeitos em cascata em vários processos fisiológicos em peixes. Por exemplo, pode induzir alterações na atividade das enzimas antioxidantes, danos ao DNA e comprometimento da função imunológica (BILLER & TAKAHASHI, 2018; NUNES *et al.*, 2018). Esses efeitos afetam a higidez e a sobrevivência das populações de peixes em riachos urbanos (MADEIRA *et al.*, 2013). Nossos resultados demonstraram que esses efeitos foram críticos para o

aparecimento de formas anormais morfológicas tanto nos núcleos eritrocitários quanto em órgãos alvo como nas brânquias e no fígado em associação ao aumento do TNP nos espécimes expostos. TNP são moléculas envolvidas na coordenação dos sistemas de defesa antioxidante e podem ser encontradas no plasma, grupos sulfidríla de proteínas e de dissulfetos, ligados à cisteína, cisteinilglicina, homocisteína e glutatona (BABA & BHATNAGAR, 2018). Esses tióis também estão disponíveis na forma de dissulfetos de baixa massa molecular, tais como homocisteína, cistina e glutatona disulfídica (KÜKÜRT *et al.*, 2021). Portanto, o conjunto de efeitos observados neste estudo indicam que as alterações observadas se relacionam aos efeitos diretos do estresse oxidativo, estimulado pelas características dos ambientes aquáticos. Por exemplo, variações nos níveis de cromo em um ambiente aquático pode induzir o surgimento de anormalidades nucleares eritrocitárias devido ao seu potencial genotóxico nos organismos aquáticos (Citação). As alterações nucleares, assim como os micronúcleos, também são consideradas indicadores de danos genotóxicos para complementar os resultados da frequência de micronúcleos (CAVAS & ERGENGOZUKARA, 2005; DOMINGUES *et al.*, 2010; SHAW *et al.*, 2020). Além do cromo, a presença do alumínio nos compartimentos aquáticos também está relacionada as atividades antrópicas. Em média, a concentração de alumínio no ambiente aquático está entre 0,001 e 0,05 mg/L em pH perto da neutralidade (WHO, 2013) sendo que sua toxicidade nos peixes se relaciona à perda da osmorregulação na superfície branquial (Mc DONALD *et al.*, 1989). Entretanto, este metal é pouco encontrado no sangue ou órgãos internos (MONACO *et al.*, 2017). Por outro lado, o aumento das alterações nucleares podem significar suscetibilidade do material genético dos peixes, a partir da exposição direta aos metais ou a metabólitos gerados como resposta pelos organismos a outros poluentes emergentes relacionados as práticas antropogênicas (STANKEVIČIŪTĖ *et al.*, 2018; GUIMARÃES *et al.*, 2021).

Em relação às alterações histológicas, tanto a brânquia quanto o fígado apresentaram alterações proporcionais sem que tenha havido progressão de acordo com o tempo de exposição. Com exceção dos achados hepáticos nos peixes expostos à água do córrego Anhanduí, todos os demais apresentaram aumento nos IAH, sugerindo perfis adaptativos distintos. É importante ressaltar que não houve mortalidade em nenhum dos tempos e córregos estudados, o que, a princípio, descarta respostas típicas de intoxicação aguda de evolução irreversível (WANTZEN *et al.*, 2008; AGOSTINHO *et al.*, 2021). Por outro lado, a estratégia de biomonitoramento adotado impede que os espécimes entrem em contato direto com outros fatores abióticos naturais do meio ambiente aquático como sedimento e matéria orgânica, além da exposição às variações naturais de temperatura, luminosidade, escoamentos pontuais provenientes da água da chuva e entre outros (BESSE *et al.*, 2012; DALZUCHIO & GEHLEN, 2016). Mesmo assim, os efeitos observados podem afetar as funções homeostáticas de ambos órgãos além de alterar o perfil metabólico dos espécimes (de OLIVEIRA RIBEIRO & NARCISO, 2016).

As alterações teciduais observadas estão de acordo com outros estudos que demonstram as brânquias e o fígado como órgãos-alvo para análise da histopatologia (CAMARGO & MARTINEZ,

2007; Van DYK *et al.*, 2012). Em relação as brânquias, os processos histopatológicos ocorreram nos espécimes expostos aos três córregos e em todos os tempos, com predomínio dos graus I e II; ou seja, as lesões podem ser reversíveis à medida que a qualidade da água melhora. Porém, a permanência dos processos descamativos, hiperplásicos e de fusão epitelial podem resultar na necrose do epitélio lamelar tanto primário quanto secundário (de OLIVEIRA RIBEIRO & NARCISO, 2016), um achado de baixa ocorrência, conforme observado nos córregos Anhanduí e Bandeira. Estas alterações ocorrem de forma inespecífica, uma vez que não foi possível estabelecer qual o agente físico, químico ou tóxico específico foi o responsável. Córregos urbanos podem apresentar graus variados de contaminação que afetam também de forma variada os níveis de oxigenação da água, condutividade elétrica e pH, assim como mudanças abruptas devido a matéria orgânica em suspensão (NORDBERG *et al.*, 2015; HILL *et al.*, 2022), a exemplo do que pode ter ocorrido no córrego Anhanduí. Níveis elevados de nitrito, nitrato e amônia são tóxicos para o tecido branquial e cursam com redução da capacidade de absorção do oxigênio, além de atuarem como fatores estressores diretos no epitélio branquial (RANDALL & TSUI, 2002; IP & CHEW, 2010; SOLER *et al.*, 2021).

Em relação ao fígado, os IAHS foram diferentes entre os córregos, embora tenham sido mais elevados que dos controles. Nos espécimes expostos a água do córrego Anhanduí, o tempo foi um fator importante para a manifestação das alterações. E aqueles expostos ao córrego Lagoa apresentaram valores superiores aos 12 dias de exposição. Estas diferenças possivelmente estão relacionadas além das características da água, ao perfil metabólico dos espécimes durante o período de exposição, tendência semelhante encontrada em peixes nativos de regiões antropizadas (CAMARGO & MARTINEZ, 2007; NIMET *et al.*, 2018).

O fígado concentra funções críticas relacionadas a função metabólica energética, além dos processos de biotransformação e bioexcreção do organismo (HINTON *et al.*, 2008). Ademais, o metabolismo hepático influencia a toxicidade dos xenobióticos, seja por meio do seu acúmulo tecidual ou devido a geração de metabólitos pelas vias de desintoxicação dos compostos originais (SCHULTZ & HAYTON, 1999; PAULINO *et al.*, 2020). No presente estudo, o conjunto de alterações histológicas hepáticas revelou um aumento progressivo de acordo com o tempo de exposição, pelo menos nos córregos Bandeira e Lagoa. Nos dias 6 e 12, os espécimes apresentaram maior frequência de lipidose hepática, de forma focal e focal extensiva, associada à hipertrofia celular. Estas alterações, embora sejam consideradas reversíveis (W2), demonstram falhas no metabolismo dos ácidos graxos, como reflexo da sobrecarga ou deficiência na detoxicação de metabólitos originados nos processos de biotransformação resultando em hipertrofia e vacuolização citoplasmática (HINTON *et al.*, 1992; WOLF & WOLFE, 2005). Como consequência, hepatócitos podem necrosar, formando “nichos” compactos de restos celulares, caracterizados por citoplasma fosco eosinofílico (WOLFE & WOLFE, 2005; SILVA *et al.*, 2021), conforme observado em espécies expostas a água do córrego Bandeira. Para esse córrego, poderíamos inferir que a presença dos metais ou de outros poluentes orgânicos resistentes no ambiente aquático tenham participação

nesse processo a exemplo de outros estudos (DANE & ŞIŞMAN, 2015; CASTILHOS GHISI *et al.*, 2020; WEBER *et al.*, 2020).

Nossos resultados demonstraram que os córregos estudados apresentaram grau moderado de antropização, mensurados através das análises físico-químicas da água, que foram capazes de afetar a homeostasia dos peixes. A estratégia empregada permitiu-nos obter resultados mais homogêneos e controlados do ponto de vista experimental além de favorecer a dinâmica temporal de diferentes biomarcadores de higidez, utilizando o *zebrafish* como bioindicador ambiental. Com esse experimento, foi observado que três dias de exposição foram suficientes para encontrarmos alterações histológicas branquiais e hepáticas, além de alterações nucleares eritrocitárias em peixes expostos, ainda que essas alterações não tenham aumentado gradativamente de acordo com o tempo de exposição. Portanto, com esse estudo, foi possível utilizar o *zebrafish* (*Danio rerio*) como bioindicador de qualidade ambiental dos córregos urbanos da cidade de Campo Grande – MS.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A., ALVES, D. C., GOMES, L. C., DIAS, R. M., PETRERE JR, M., & PELICICE, F. M. (2021). Fish die-off in river and reservoir: A review on anoxia and gas supersaturation. *Neotropical Ichthyology*, 19.
- ALMEIDA, E. A., & DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. (2016). Introduction—Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems. In *Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems* (pp. 7-20). CRC Press.
- ALESCI, A., CICERO, N., FUMIA, A., PETRARCA, C., MANGIFESTA, R., NAVA, V., & LAURIANO, E. R. (2022). Histological and chemical analysis of heavy metals in kidney and gills of boops boops: melanomacrophages centers and rodlet cells as environmental biomarkers. *Toxics*, 10(5), 218.
- ALQAHTANI, Yahya *et al.* Thiol-specific fluorogenic agent for live cell non-protein thiol imaging in lysosomes. (2019). *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 411, p. 6463-6473.
- ARALDI, R.P., de Melo, T.C., Mendes, T.B., de S´a Júnior, P.L., Nozima, B.H., Ito, E.T., de Carvalho, R.F., de Souza, E.B., de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. *Biomed. Pharmacother.* 72, 74–82.
- ARELLANO-AGUILAR, Omar *et al.* (2015). Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. *Journal of Fisheries Sciences*. com, v. 9, n. 4, p. 52.
- ARIAS, A. R. L. *et al.* (2007). Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, p. 61-72.
- AYLLON, F & GARCIA-VAZQUEZ, E. (2000). Introduction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Research*, 467:177-186.
- AYLLON F & GARCIA-VAZQUEZ E (2001) Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ Safety*, 49:221- 225.
- BABA, S. P., & BHATNAGAR, A. (2018). Role of thiols in oxidative stress. *Current opinion in toxicology*, 7, 133-139.
- BABIC, SANJA *et al.* (2017). Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. *Water Research*, v. 115, p. 9-21.
- BARBOUR, M. T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B. D. & STRIBLING, J. B. (1999). *Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish*, 2a ed. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T., (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Diseases* 22, 25–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>.
- BESSE, J. P., GEFFARD, O., & COQUERY, M. (2012). Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 36, 113-127.
- BILLER, J. D., & TAKAHASHI, L. S. (2018). Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 3403-3414.
- BOOTH, D. B., Roy, A. H., Smith, B., & Capps, K. A. (2016). Global perspectives on the urban stream syndrome. *Freshwater Science*, 35(1), 412-420.
- BRAUNBECK, T., VOLKL A., (1991). Induction of biotransformation in the liver of Eel (*Anguilla anguilla* L.) by sublethal exposure to dinitro-o-cresol: ultrastructural and biochemical study. *Ecot. Environ. Saf.*, 21, 109–127.
- CAMARGO, M. M., & MARTINEZ, C. B. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3), 327-336.

- CAMARGO, M. M., & MARTINEZ, C. B. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical ichthyology*, 5, 327-336.
- CANEDO, A., DE JESUS, L. W. O., BAILÃO, E. F. L. C., & ROCHA, T. L. (2021). Micronucleus test and nuclear abnormality assay in *zebrafish* (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. *Environmental Pollution*, v. 290, 118019.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. (1990). 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.
- CASTILHOS GHISI, N., LARENTIS, C., DE OLIVEIRA, E. C., NEVES, M. P., ZAVASKI, A. G., DE ALMEIDA ROQUE, A., & DELARIVA, R. L. (2020). Environmental assessment of Neotropical streams using fish as bioindicators: a multibiomarker and integrated approach. *Hydrobiologia*, 1-18.
- CAVAS, T., & ERGENE-GÖZÜKARA, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*, 74(3), 264-271.
- CESTARI, M. M. (2013). Genotoxicity and mutagenicity. *Pollution and fish health in tropical ecosystems*, 132163.
- ALMEIDA, E.A.; RIBEIRO, C.A.O. (2014). Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystem. CRC Press, p.132-163.
- CHEN, S. J, CHANG, H. T. (2004). Nile red-adsorbed gold nanoparticles for selective determination of thiols based on energy transfer and aggregation. *Anal Chem*. v. 76(13): 3727–34.
- CHEN W, ZHAO Y, SEEFELDT T, GUAN X. (2008). Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *J Pharm Biomed Anal.*, v. 48(5):1375–80.
- CHOVANEC, A., HOFER, R., & SCHIEMER, F. (2003). Fish as bioindicators. In Trace metals and other contaminants in the environment (Vol. 6, pp. 639-676). Elsevier.
- DANE, H., & ŞIŞMAN, T. (2015). Histopathological changes in gill and liver of *Capoeta capoeta* living in the Karasu River, Erzurum. *Environmental toxicology*, 30(8), 904-917.
- DAI, YU-JIE *et al.* (2014). *Zebrafish* as a model system to study toxicology. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 33, n. 1, p. 11-17.
- DAL SANTO, GLAUCIA *et al.* (2014). Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the *zebrafish* brain. *Neuroscience Letters*, v. 558, p. 103-108.
- DALZUCHIO, T., & GEHLEN, G. (2016). Confounding factors in biomonitoring using fish. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 11(1), 53-61.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., & NARCISO, M. F. (2016). Histopathological markers in fish health assessment. In *Pollution and fish health in tropical ecosystems* (pp. 216-252). CRC Press.
- DOMINGUES, I., OLIVEIRA, R., LOURENÇO, J., GRISOLIA, C. K., MENDO, S., & SOARES, A. M. V. M. (2010). Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in *zebrafish* early life stages and adults. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(3), 338-345.
- ELLMAN GL. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. v. May;82(1):70-7. PMID: 13650640.
- FANTA, E., F. S. RIOS, S. ROMÃO, A. C. C. VIANNA & S. FREIBERGER. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 119-130.
- FENECH, M *et al.*, (2020). Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 786, p. 108342.

- FENECH, M., (2019). Mechanisms by Which and Other Nuclear Anomalies, pp. 8–23.
- FERNANDES, C., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., MONTEIRO, S. M., & SALGADO, M. A. (2007). Histopathological gill changes in wild leaping grey mullet (*Liza saliens*) from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Environmental Toxicology: An International Journal*, v. 22(4), 443-448.
- FOURNIE, J. W., KROL, R. M., & HAWKINS, W. E. (2000). Fixation of Fish Tissues. *The Laboratory Fish*, 569–578.
- FREITAS, Carlos Edwar C.; SIQUEIRA-SOUZA, Flávia K, (2009). O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. *Revista Agrogeoambiental*, v. 1, n. 2.
- FRICKE, R, Eschmeyer, W. N, Fong JD. (2022). Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera/Species By Family/Subfamily. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.
- GARAI, P., BANERJEE, P., MONDAL, P., & SAHA, N. C. (2021). Effect of heavy metals on fishes: Toxicity and bioaccumulation. *J Clin Toxicol. S*, 18.
- GERNHOFER, M., M. PAWET, M. SCHRAMM, E. MÜLLER & R. TRIEBSKORN. (2001). Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem, Stress and Recovery*, v. 8: 241-260.
- GONÇALVES, Vanessa Fonseca *et al.* (2020). Effects of urban proximity and the occurrence of erythroplastids in *Antilophia galeata*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p. 44650-44655.
- GOULART, M. D.; CALLISTO, Marcos, (2003). Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*, v. 2, n. 1, p. 156-164.
- GUIMARÃES, A. T. B., ESTRELA, F. N., PEREIRA, P. S., DE ANDRADE VIEIRA, J. E., DE LIMA RODRIGUES, A. S., SILVA, F. G., & MALAFAIA, G. (2021). Toxicity of polystyrene nanoplastics in *Ctenopharyngodon idella* juveniles: a genotoxic, mutagenic and cytotoxic perspective. *Science of The Total Environment*, 752, 141937.
- HADER, D. P., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., & Helbling, E. W. (2020). Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of the Total environment*, 713, 136586.
- HARDIE, D. C., Gregory, T. R., & Hebert, P. D. (2002). From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(6), 735-749.
- HILL, M. J., THORNHILL, I., TIEGS, S. D., CASTRO-CASTELLON, A., HERNÁNDEZ-AVILÉS, J. S., DAW, A., & HOBBS, S. (2022). Organic-matter decomposition in urban stream and pond habitats. *Ecological Indicators*, 142, 109232.
- HINTON, D. E. & D. J. LAURÉN. (1990). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. Pp. 51-65. In: McCarthy, J.F. & L.R. Shugart (Eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton, Lewis Publishers.
- HINTON, D. E., SEGNER, H., AU, D. W., KULLMAN, S. W., & HARDMAN, R. C. (2008). Liver toxicity. In *The toxicology of fishes* (pp. 327-400). CRC press.
- HINTON, D. E., BAUMANN, P. C., GARDNER, G. R., HAWKINS, W. E., HENDRICKS, J. D., MURCHELANO, R. A., & OKIHIRO, M. S. (1992). Histopathologic biomarkers. In *Biomarkers* (pp. 155-210). CRC Press.
- HURD TR, PRIME TA, HARBOUR ME, LILLEY KS, MURPHY MP. 2007. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem.*, v. 282(30):22040–51.
- IP, Y. K., & CHEW, S. F. (2010). Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Frontiers in physiology*, 1, 134.
- JINDAL, R.; VERMA, S. (2015). In vivo genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 118, n. 1, p. 1–10.

- KRUSKAL, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47, 583–621.
- KÜKÜRT, A., GELEN, V., BAŞER, Ö. F., DEVECI, H. A., & KARAPEHLIVAN, M. (2021). Thiols: Role in oxidative stress-related disorders. *Accent. Lipid Peroxidation. London: IntechOpen*, 27-47.
- LIEBEL, L.; TOMOTAKE, M.E.M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A, (2013). Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. *Ecotoxicology Environmental Contamination*, v. 8, n. 2, p. 09-15.
- LISI, P. J., CHILDRESS, E. S., GAGNE, R. B., HAIN, E. F., LAMPHERE, B. A., WALTER, R. P., & MCINTYRE, P. B. (2018). Overcoming urban stream syndrome: Trophic flexibility confers resilience in a Hawaiian stream fish. *Freshwater Biology*, v. 63(5), 492-502.
- LUSKOVA, V. (1997). "Determination of Normal Values in Fish Hematology." *Acta Universitatis Carolinae Biologica* 39: 191–200.
- MADEIRA, D., NARCISO, L., CABRAL H.N. (2013) Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 166:237–243.
- MAEDA H, MATSUNO H, USHIDA M, KATAYAMA K, SAEKI K, ITOH N. (2005). 2, 4-Dinitrobenzenesulfonyl fluoresceins as fluorescent alternatives to Ellman's reagent in thiol-quantification enzyme assays. *Angew Chem Int Ed Eng.*; 44(19):2922–5. <https://doi.org/10.1002/anie.200500114>. 21.
- MAGALHÃES, D. P. *et al*, (2008). A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, v. 12(3): 3355-381. 2008.
- MANN, H. B., & WHITNEY, D. R. (1947). On a test of whether one of 2 random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics*, v. 18, 50-60.
- MARKERT, B. A., BREURE, A. M., & ZECHMEISTER, H. G. (2003). Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: *Trace Metals and other Contaminants in the Environment* (Vol. 6, pp. 3-39). Elsevier.
- MATTHEWS, M. & VARGA, Z. (2012). Anesthesia and Euthanasia in Zebrafish *ILAR Journal* 53(2):192-204. National Institutes of Health (2009). Final Report to OLAW on Euthanasia of Zebrafish.
- MCDONALD D.G., READER J.P. & DALZIEL T.R.K. (1989) The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. In: *Acid Toxicity and Aquatic Animals* (ed. by R. Morris, E. Taylor, D. Brown & J. Brown), pp. 221– 242. Cambridge University Press, Boston, MA.
- MISTURA, Marcelo, (2015). Caracterização e monitoramento da qualidade da água do lago municipal de Dois Vizinhos, lago Dourado.
- MONACO, A., GRIMALDI, M. C., & FERRANDINO, I. (2017). Aluminium chloride-induced toxicity in zebrafish larvae. *Journal of fish diseases*, 40(5), 629-635.
- NIMET, J., AMORIM, J. P. D. A., & DELARIVA, R. L. (2018). Histopathological alterations in *Astyanax bifasciatus* (Teleostei: Characidae) correlated with land uses of surroundings of streams. *Neotropical Ichthyology*, 16.
- NORDBERG, G. F., COSTA, M.; NORDBERG M. (Eds.). (2021). *Handbook on the Toxicology of Metals: Volume I: General Considerations*. Academic press. 1385p.
- NUNES, M. E., MÜLLER, T. E., MURUSSI, C., DO AMARAL, A. M., GOMES, J. L., MARINS, A. T., & LORO, V. L. (2018). Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish – a comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 206, 48-53.
- PARURUCKUMANI, P. S., RAJAN, A. M., GANAPIRIYA, V., & KUMARASAMY, P. (2015). Bioaccumulation and ultrastructural alterations of gill and liver in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) in sublethal copper exposure. *Aquatic Living Resources*, 28(1), 33-44.

- PASCHOALINI, A. L., & BAZZOLI, N. (2021). Heavy metals affecting Neotropical freshwater fish: A review of the last 10 years of research. *Aquatic Toxicology*, 237, 105906.
- PAUL, M. J.; MEYER, J. L. (2001). Streams in the urban landscape. *Annual review of ecology and systematics*, v. 32, n. 1, p. 333-365.
- PAUL, Michael J.; MEYER, Judy L. (2001). Streams in the urban landscape. *Annual review of Ecology and Systematics*, v. 32, n. 1, p. 333-365.
- PAULINO, M. G., TAVARES, D., TEREZAN, A. P., SAKURAGUI, M. M., PESENTI, E., GIANI, A., FERNANDES, M. N. (2020). Biotransformations, antioxidant system responses, and histopathological indexes in the liver of fish exposed to cyanobacterial extract. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(5), 1041-1051.
- PERA, F.; SCHWARZACHER, H. G. (1968). Formation and division of binucleated cells in kidney cell cultures of *Microtus agrestis*. *Humangenetik*, v. 6, n. 2, p. 158-162
- PERESSIN, A., & CETRA, M. (2014). Responses of the ichthyofauna to urbanization in two urban areas in Southeast Brazil. *Urban Ecosystems*, 17, 675-690.
- PERESSIN, A., CASARIM, R., PRADO, I. G., & CETRA, M. (2020). Physical habitat as predictor of fish trophic structure in Brazilian Atlantic rainforest streams. *Neotropical Ichthyology*, 18.
- PLANURB. Relatório de Avaliação Ambiental (RAA), 2017. Programa de Desenvolvimento Integrado e Qualificação Urbana de Campo Grande/MS – Viva Campo Grande. Disponível em: <<http://www.campogrande.ms.gov.br/planurb/downloads/relatorio-de-avaliacao-ambiental-raa-capitulo-1/>>
- POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDZIC, V., (1994). 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, pp. 339–352.
- RANDALL, D. J., & TSUI, T. K. N. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Marine pollution bulletin*, 45(1-12), 17-23.
- RASHED, M. N. (2001). Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environment international*, v. 27, n. 1, p. 27-33.
- RIBEIRO-BRASIL, D. R. G., Torres, N. R., Picanço, A. B., Sousa, D. S., Ribeiro, V. S., Brasil, L. S., & de Assis Montag, L. F. (2020). Contamination of stream fish by plastic waste in the Brazilian Amazon. *Environmental Pollution*, 266, 115241.
- RIBEIRO-BRASIL, D. R. G., TORRES, N. R., PICANÇO, A. B., SOUSA, D. S., RIBEIRO, V. S., BRASIL, L. S., & DE ASSIS MONTAG, L. F. (2020). Contamination of stream fish by plastic waste in the Brazilian Amazon. *Environmental Pollution*, 266, 115241.
- RODRIGUES, E. L. & E. FANTA. (1998). Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoato 500. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 15: 441-450.
- RODRIGUEZ-CEA A, AYLLON F AND GARCIA-VAZQUEZ E (2003) Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol Environ Safety* v. 56:442-448.
- SCHULTZ, I. R., & HAYTON, W. L. (1999). Interspecies scaling of the bioaccumulation of lipophilic xenobiotics in fish: An example using trifluralin. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(7), 1440-1449.
- SHAHJAHAN, M., TASLIMA, K., RAHMAN, M. S., AL-EMRAN, M., ALAM, S. I., & FAGGIO, C. (2022). Effects of heavy metals on fish physiology—a review. *Chemosphere*, 134519.
- SHAW, P., MONDAL, P., BANDYOPADHYAY, A., & CHATTOPADHYAY, A. (2020). Environmentally relevant concentration of chromium induces nuclear deformities in erythrocytes and alters the expression of stress-responsive and apoptotic genes in brain of adult zebrafish. *Science of the Total Environment*, 703, 135622.

- SILVA, A. L. N., RODRIGUES, R. A., SIQUEIRA, M. S., FARIAS, K. N. N., KUIBIDA, K. V., FRANCO-BELUSSI, L., & FERNANDES, C. E. (2021). Transaminase profile and hepatic histopathological traits in *Piaractus mesopotamicus* exposed to insecticide Diflubenzuron. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 22002-22010.
- SMEWW, Standard methods for the examination of water and wastewater, (2017). American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA.
- SOLER, P., FARIA, M., BARATA, C., GARCÍA-GALEA, E., LORENTE, B., & VINYOLES, D. (2021). Improving water quality does not guarantee fish health: Effects of ammonia pollution on the behaviour of wild-caught pre-exposed fish. *PLoS One*, 16(8), e0243404.
- SPENCE, ROWENA *et al*, (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, v. 83, n. 1, p. 13-34.
- STANKEVIČIŪTĖ, M., SAULIUTĖ, G., MAKARAS, T., MARKUCKAS, A., VIRBICKAS, T., & BARŠIENĖ, J. (2018). Responses of biomarkers in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following exposure to environmentally relevant concentrations of complex metal mixture (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd). Part II. *Ecotoxicology*, 27, 1069-1086.
- TURPIN-NAGEL, K., & Vadas, T. M. (2016). Controls on metal exposure to aquatic organisms in urban streams. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18(8), 956-967.
- VAN DER OOST, R., J. BEBER & N. P. E. VERMEULEN. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Van DYK, J. C., COCHRANE, M. J., & WAGENAAR, G. M. (2012). Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*, 87(4), 301-311.
- WALSH, C. J., ROY, A. H., FEMINELLA, J. W., COTTINGHAM, P. D., GROFFMAN, P. M., & MORGAN, R. P. (2005). The urban stream syndrome: current knowledge and the search for a cure. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(3), 706-723.
- WALSH, C. J., & Webb, J. A. (2014). Spatial weighting of land use and temporal weighting of antecedent discharge improves prediction of stream condition. *Landscape Ecology*, 29, 1171-1185.
- WANTZEN, K. M., YULE, C. M., MATHOOKO, J. M., & PRINGLE, C. M. (2008). Organic matter processing in tropical streams. In *Tropical stream ecology* (pp. 43-64). Academic Press.
- WEI W, Liang X, Hu G, Guo Y, Shao S. (2011). A highly selective colorimetric probe based on 2,2',2"-trisindolylmethene for cysteine/homocysteine. *Tetrahedron Lett.* v. 52(13):4. 22.
- WEBER, A. A., SALES, C. F., DE SOUZA FARIA, F., MELO, R. M. C., BAZZOLI, N., & RIZZO, E. (2020). Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: a case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 190, 110165.
- WHO, (2013). Aluminium in drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Report WHO/HSE/WSH/10.01/13.
- WILHELM Filho, D., M. A. TORRES, T. B. TRIBESS, R. C. PEDROSA & C. H. L. SOARES. (2001). Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian Journal of Medical Biology and Research*, 34: 719-726.
- WITESKA, Malgorzata. (2013). Erythrocytes in teleost fishes: a review. *Zoology and Ecology*, v. 23, n. 4, p. 275-281.
- WOLF, J. C., & WOLFE, M. J. (2005). A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic pathology*, 33(1), 75-85.
- YANCHEVA, V., VELCHEVA, I., STOYANOVA, S., & GEORGIEVA, E. (2016). Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. *Applied ecology and environmental research*, 14(1), 47-75.

ANEXOS

Anexo I

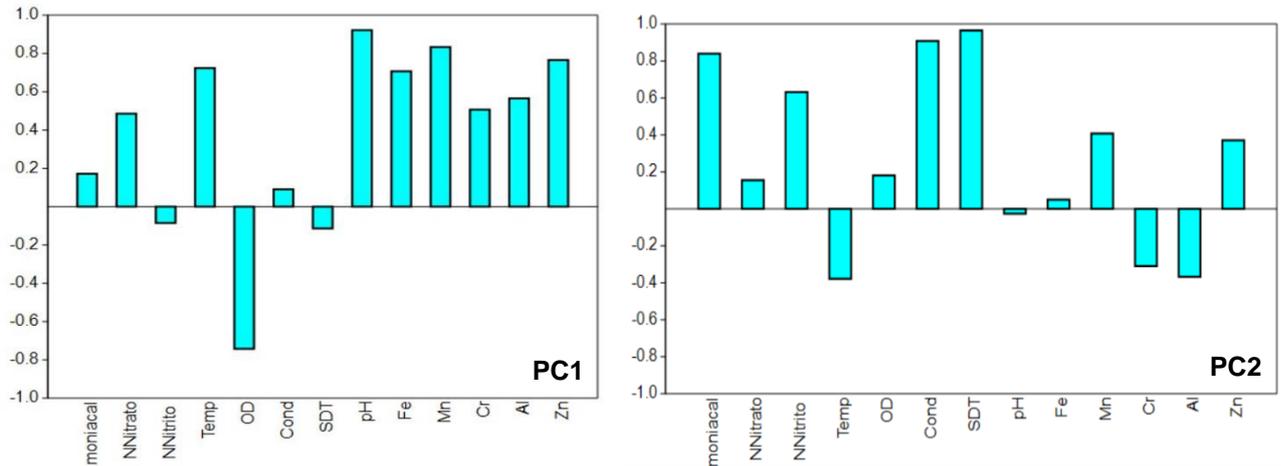
Valores obtidos para diferentes biomarcadores físicos e químicos observados por córrego e tempo de exposição

Córrego	Tempo	Namoniacoal (mg/L)	Nnitrate (mg/L)	Nnitrite (mg/L)	Temperatura (°C)	OD (mg/L)	Condutibilidade (µS/cm)	SDT (mg/L)	pH (1-10)	Ferro (mg/L)	Manganes (mg/L)	Cromo (mg/L)	Alumínio (mg/L)	Zinco (mg/L)
Bandeira	1	0,17	15,19	0,43	33,40	5,00	104,20	59,70	7,70	0,35	0,30	0,04	0,01	0,10
Bandeira	3	0,03	12,51	1,18	34,30	4,50	108,70	59,50	7,80	0,35	0,30	0,40	0,01	0,10
Bandeira	6	0,02	21,74	0,02	32,00	4,60	103,00	59,20	7,40	0,12	0,22	0,00	0,05	0,02
Bandeira	12	0,02	25,76	0,08	30,10	5,50	187,80	70,00	7,80	1,12	0,22	0,00	0,05	0,02
Anhanduí	1	9,20	11,60	2,15	29,00	5,40	230,00	136,90	7,50	0,31	0,40	0,00	0,00	0,09
Anhanduí	3	9,17	13,22	4,46	27,80	5,60	224,20	139,20	7,40	0,31	0,40	0,00	0,00	0,09
Anhanduí	6	0,00	12,95	7,26	28,80	5,30	197,00	120,30	7,10	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01
Anhanduí	12	0,00	28,86	0,02	21,30	5,40	216,50	126,10	7,40	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01
Lagoa	1	1,26	4,64	1,17	26,10	6,30	107,70	67,50	7,10	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00
Lagoa	3	0,01	9,56	0,42	28,90	5,50	105,20	67,10	7,10	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00
Lagoa	6	0,06	2,80	0,03	27,20	5,70	106,20	67,30	7,10	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
Lagoa	12	0,03	0,77	0,01	28,20	6,00	113,60	69,60	7,30	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00

OD = oxigênio dissolvido SDT = sólidos totais

Anexo II

Valores obtidos pela PCA, análise de componentes principais



Summary	Scatter plot	Scores	Loadings
	PC 1	PC 2	
NAmoniacoal	0.1714	0.83979	
NNitrate	0.48549	0.15526	
NNitrite	-0.085588	0.63213	
Temp	0.72364	-0.37843	
OD	-0.74211	0.18058	
Cond	0.09016	0.90844	
SDT	-0.11329	0.96542	
pH	0.9217	-0.026321	
Fe	0.70695	0.049915	
Mn	0.8332	0.40755	
Cr	0.50663	-0.30994	
Al	0.56548	-0.36726	
Zn	0.76554	0.37126	

Anexo III

Resultados das análises físico-químico dos três córregos, comparando com a resolução legislação CONAMA n° 357/2005 para águas superficiais. Dia 1 refere-se ao momento da coleta, e os dias 3, 6 e 12 referentes aos tempos de exposição. *NR – Não referenciado.

Parâmetros	Córrego Bandeira				Córrego Anhanduí				Córrego Lagoa				Resolução CONAMA N° 357/2005
	Dia 1	Dia 3	Dia 6	Dia 12	Dia 1	Dia 3	Dia 6	Dia 12	Dia 1	Dia 3	Dia 6	Dia 12	
Alumínio Total (mg Al/L)	0,01	0,01	0,05	0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,1
Condutividade Elétrica (µS/cm)	104,5	104,5	104,5	104,5	230,0	230,0	216,5	216,5	107,9	107,9	113,6	113,6	NR
Cromo Total (mg Cr/L)	0,04	0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,05
Ferro Total (Mg Fe/L)	0,35	0,35	0,12	0,12	0,31	0,31	0,02	0,02	0,04	0,04	0,01	0,01	< 0,3
Manganês Total (Mg Mn/L)	0,30	0,30	0,22	0,22	0,40	0,40	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,1
Nitrogênio Amoniacal (mg N/L)	0,17	0,17	0,02	0,02	19,2	19,2	< 0,01	< 0,01	1,26	1,26	0,03	0,03	< 3,7
Nitrogênio Nitrato (mg N/L)	3,80	3,80	6,44	6,44	2,90	2,90	7,22	7,22	1,16	1,16	0,19	0,19	< 10,0
Nitrogênio Nitrito (mg N/L)	0,1	0,1	0,02	0,02	0,49	0,49	< 0,01	< 0,01	0,27	0,27	< 0,01	< 0,01	< 1,0
Oxigênio Dissolvido (mg O ₂ /L)	5,1	5,1	5,0	5,0	5,5	5,5	5,4	5,4	6,7	6,7	6,0	6,0	> 6,0
pH	7,7	7,7	7,6	7,6	7,5	7,5	7,4	7,4	7,0	7,0	7,3	7,3	6 a 9
Sólidos Dissolvidos Totais (mg/L)	60,0	60,0	60,1	60,1	138,0	138,0	126,1	126,1	67,6	67,6	69,6	69,6	< 500,0

* NR - Não Referenciado