



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Sorocaba

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

**Ciências Ambientais**

---

**GLAUCIA HELENA CASTRO DE FREITAS NOVAES**

**ATUAÇÃO DOS METAIS COBRE E NÍQUEL EM TECIDOS DE *DANIO RERIO*:  
ÊNFASE PARA ANÁLISE DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS E  
HISTOQUÍMICOS DA ESPÉCIE *DANIO RERIO***

**SOROCABA**

**2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Sorocaba

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

**Ciências Ambientais**

---

**GLAUCIA HELENA CASTRO DE FREITAS NOVAES**

**ATUAÇÃO DOS METAIS COBRE E NÍQUEL EM TECIDOS DE *DANIO RERIO*:  
ÊNFASE PARA ANÁLISE DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS E  
HISTOQUÍMICOS DA ESPÉCIE *DANIO RERIO***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual "Julio de Mesquita Filho" na Área de Concentração, Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientador(a): Profa. Dra. Renata Fracácio Francisco

**SOROCABA**

**2019**

N935a

Novaes, Glaucia Helena Castro de Freitas

Atuação dos metais Cobre e Níquel em tecidos de Danio Rerio :  
Ênfase para análise de biomarcadores histológicos e histoquímicos da  
espécie Danio Rerio / Glaucia Helena Castro de Freitas Novaes. --  
Sorocaba, 2019

86 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba

Orientadora: Renata Francisco Fracácio

1. Cobre no organismo. 2. Níquel. 3. Peixe-zebra. 4. Sistema  
endócrino. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de  
Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## BANCA EXAMINADORA

### Professores Titulares:

Prof(a). Dr(a). Renata Fracácio (Orientador) – Membro nato

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) ICT *campus*  
Sorocaba

Departamento de Engenharia Ambiental

E-mail: rfracacio@sorocaba.unesp.br

- Prof(a). Dr(a). Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba (UFSCar)

Centro de Ciências Humanas e Biológicas (CCHB)

- Prof(a). Dr(a). Suzelei Rodgher

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho ICT *campus* São José dos  
Campos

Departamento de Engenharia Ambiental

*Dedico este trabalho à minha mãe,  
Carol, que não mediu esforços para  
que eu desenvolvesse minha  
carreira profissional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha orientadora Profa. Dra. Renata Fracácio Francisco por ter me acolhido em seu laboratório, permitindo que eu conseguisse finalizar meu projeto apesar de todas as intercorrências. Agradeço por ter entendido minhas dificuldades e ter possibilitado a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao professor Tonello, com quem conversei inicialmente e me colocou em contato com a Profa Renata.

Agradeço a Profa. Dra. Evelise Nunes Fragoso Moura e a Profa Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin que cederam tempo e espaço em seus laboratórios para que eu pudesse concluir meu trabalho, que me ensinaram a utilizar seus equipamentos sem hesitar e mostraram a importância de cooperarmos um com os outros no meio acadêmico e científico diante as tantas dificuldades.

Agradeço a todos os alunos do laboratório LATHIS que de alguma forma me ajudaram no decorrer do trabalho. Em especial: Janete, Sofia, Werbate, Bianca e Stephanie.

Agradeço a todos os professores de graduação e pós-graduação que tive nesses anos que me ensinaram e com certeza influenciaram na minha formação profissional e pessoal.

Agradeço a minha mãe pelo auxílio financeiro e emocional durante o mestrado e manteve-se paciente e dura nas palavras para que eu continuasse. Agradeço ao meu pai que me ajudou nos dias em que tive que me dedicar em tempo integral com seus dons culinários.

Agradeço ao meu namorado por entender que nem sempre temos finais de semana e aos momentos de tensão presenciados por ele.

Agradeço a todos meus amigos e colegas de mestrado pelas conversas e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Finalmente, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais universidade UNESP ICTS pela oportunidade e por tudo que aprendi aqui.

*“As coisas tangíveis  
tornam-se insensíveis  
à palma da mão.*

*Mas as coisas findas  
muito mais do que lindas  
essas ficarão.”*

*Carlos Drummond de Andrade*

## RESUMO

Os metais são conhecidos pelo seu potencial tóxico ao ambiente aquático, além de serem elementos bioacumulativos e persistentes, o que aumenta a preocupação com a concentração permitida pela legislação, considerando-se proteção da biota. Muitas vezes, estes compostos são liberados nos corpos hídricos em concentrações subletais as quais não provocam efeitos agudo, mas, podem comprometer a viabilidade dos sistemas biológicos a longo prazo, considerando-se a contínua exposição aos referidos elementos e concentrações. Nesse contexto, o fígado é um importante órgão para avaliação da toxicidade de metais devido a sua função de excreção e seu potencial para acumular substâncias exógenas. Nas gônadas os metais podem desencadear perturbações na produção, liberação, transporte, metabolismo e ação dos hormônios naturais, que podem levar a perda de fecundidade, feminização de machos e consequentemente desequilíbrio aos organismos vivos, comprometendo a viabilidade das espécies. Substâncias exógenas que atuam dessa maneira são conhecidos como interferentes endócrinos e suas influências sobre os organismos individualmente e a vida aquática ainda não são bem estabelecidos. Uma das maneiras de identificá-los é através de análises em nível histológico e histoquímico. Os metais cobre e níquel originam-se de fontes naturais e também artificiais devido a geração de resíduos domésticos e industriais, em função das atividades antrópicas. Podem ser considerados tóxicos ou essenciais dependendo do organismo, do ambiente e de suas concentrações. Ademais, possuem potencial de serem interferentes endócrinos para organismos aquáticos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos principais 1) Avaliar a toxicidade dos metais cobre e níquel em testes crônicos através de análise histológica de possíveis alterações morfológicas causadas por essas substâncias no fígado 2) avaliar o potencial como interferente endócrino dos referidos metais através da análise de gônadas 3) Utilizar a vitelogenina como biomarcador histoquímico para avaliar a presença da vitelogenina em machos. Diante do exposto, foram realizados testes crônicos utilizando o organismo-modelo *Danio rerio* durante 21 dias de exposição com os metais cobre (9 µg/L) e níquel (25 µg/L) em regime semi-estático, com troca total da água a cada 72h, temperatura de 25°C, com alimentação uma vez ao dia. Posteriormente, os organismos foram eutanasiados e destinados ao procedimento de histologia com inclusão em parafina, coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise morfológica de gônada e fígado e para análise da vitelogenina em machos foram corados pelo método de coloração para análise histoquímica proposto por Van Der Ven (2003). Foram observadas alterações no fígado como hipertrofia e achatamento do núcleo, vacuolização, aumento da proporção dos núcleos picnóticos e perda da integridade citoplasmática. Já em gônadas masculinas houve aumento na proporção de espermatogônias, degeneração testicular e desenvolvimento assíncrono da gônada. Através do método histoquímico por coloração foi possível observar a presença da vitelogenina em machos expostos a níquel, o que indica feminização destes organismos.

**Palavras-chave:** Teste crônico, níquel, cobre, fígado, gônada, interferentes endócrinos, ecossistema aquático, *Danio rerio*.



## ABSTRACT

Metals are known for their toxic potential to the aquatic environment, as well as being bioaccumulative and persistent elements, which increases the concern with the concentration allowed by legislation, considering protection of biota. Often, these compounds are released in the water bodies in concentrations which may not cause acute effects but may compromise the viability of biological systems in the long term, considering the continuous exposure to said elements and concentrations. In this context, liver is an important organ for the evaluation of metals toxicity due to its function of excretion and its potential to accumulate exogenous substances. In gonads metals can trigger disturbances in the production, release, transport, metabolism and action of natural hormones, which can lead to fecundity loss, males feminization and consequently imbalance to living organisms, compromising the viability of the species. Exogenous substances that act in this way are known as endocrine disrupters and their influences on individual organisms and aquatic life are not well established. One way to identify them is through histological and histochemical analysis. Metals copper and nickel originate from natural and also artificial sources due to the generation of domestic and industrial waste, depending on the anthropic activities. They can be considered toxic or essential depending on the organism, the environment and its concentrations. In addition, they have the potential to be endocrine disruptor to aquatic organisms. In this context, the main objectives of this study were: 1) To assess copper and nickel toxicity in chronic tests through histological analysis of possible morphological alterations caused by these substances in the liver 2) to evaluate the potential as an endocrine disruptor of said metals through of gonad analysis 3) Use vitellogenin as histochemical biomarker to evaluate the presence of vitellogenin in males. In view of the above, chronic tests were carried out using the model organism *Danio rerio* for 21 days copper (9 µg / L) and nickel (25 µg / L) exposure in a semi-static regime, with total water exchange at every 72 hours, at a temperature of 25°C, with feed once a day. Subsequently, the organisms were euthanized and destined to histological procedure with inclusion in paraffin, staining with Hematoxylin and Eosin (HE) for morphological analysis of gonad and liver and for analysis of vitellogenin in males were stained by the staining method for histochemical analysis proposed by Van Der Ven (2003). Changes in the liver were observed, such as nucleus hypertrophy and flattening, vacuolization, increased proportion of pycnotic nuclei and loss of cytoplasmic integrity. In male gonads, there was an increase in the proportion of spermatogonia, testicular degeneration and asynchronous development of the gonad. Through the histochemical method by staining it was possible to observe the presence of vitellogenin in males exposed to nickel, which indicates feminization of these organisms.

**Key words:** Chronic test, nickel, copper, liver, gonads, fish, endocrine disruptor, aquatic ecosystem, *Danio rerio*.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Efeitos da exposição do Cobre em peixes.....	8
Tabela 2. Efeitos da exposição do Níquel em peixes.....	12
Figura 1. Vias de exposição e efeitos dos interferentes endócrinos.....	15
Figura 2. Foto do organismo-teste <i>D. rerio</i> (Zebrafish).....	22
Figura 3. Desenvolvimento gonadal de peixe.....	25
Figura 4. <i>D. rerio</i> visto do microscópio óptico.....	28

### CAPÍTULO 2

Figura 1. Teste crônico em andamento.....	47
Figura 2. Teste crônico em andamento.....	48
Tabela 1. Respostas morfológicas após exposição crônica dos metais cobre e níquel.....	50
Figura 3. Corte histológico do fígado de <i>D. rerio</i> do grupo controle do ensaio com níquel.....	51
Figura 4. Corte histológico do fígado de <i>D. rerio</i> do grupo controle do ensaio com cobre.....	52
Figura 5. Corte histológico do fígado de <i>D. rerio</i> do tratamento com níquel.....	53
Figura 6. Corte histológico de fígado de <i>Danio rerio</i> do tratamento com Níquel.....	54
Figura 7. Corte histológico comparativo de fígado de <i>Danio rerio</i> do grupo controle e tratamento com Níquel.....	54
Figura 8. Corte histológico de fígado de <i>Danio rerio</i> do tratamento com Cobre.....	55
Figura 9. Corte histológico comparativo de fígado de <i>Danio rerio</i> do grupo controle e tratamento com Cobre.....	55
Figura 10. Corte histológico de fígado de <i>Danio rerio</i> do tratamento com Níquel.....	56
Tabela 2. Biomarcadores histológicos de gônadas masculinas de <i>Danio rerio</i> e o grau de severidade de acordo com as normas da OECD para interferentes endócrinos (2010).....	57
Figura 11. Corte histológico da Gônada masculina de <i>Danio rerio</i> do grupo controle.....	58
Figura 12. Corte histológico da Gônada masculina de <i>Danio rerio</i> do tratamento com níquel.....	59
Figura 13. Corte histológico da Gônada masculina de <i>Danio rerio</i> grupo controle e tratamento com níquel.....	60
Figura 14. Corte histológico da Gônada masculina de <i>Danio rerio</i> grupo controle e tratamento com níquel.....	61

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VI</b>
<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>VII</b>
<b>CAPÍTULO 1: Interação do ambiente aquático com os metais cobre e níquel.....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Metais no Ambiente Aquático.....	3
1.1.1 Cobre.....	4
1.1.2 Níquel.....	10
1.1.3 Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo .....	13
1.2 INTERFERENTES ENDÓCRINOS.....	14
1.3 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS COMO FERRAMENTA EM ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	15
1.3.1 “Zebrafish” como organismo-teste.....	21
1.3.2 Fígado.....	23
1.3.3 Gônada.....	24
2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
<b>CAPÍTULO 2: Toxicidade dos metais Níquel e Cobre e sua possível atuação como interferentes endócrino sob concentrações permitidas pela legislação brasileira através de análise histológica.....</b>	<b>41</b>
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. OBJETIVOS.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.2 Cultivo e manutenção do organismo-teste.....	45
4. RESULTADOS.....	48
4.1 Tecido hepático após 21 dias de exposição.....	49
4.2 Gônada masculina após 21 dias de exposição ao Níquel.....	56
5. DISCUSSÃO.....	61
5.1 Tecido hepático após 21 dias de exposição.....	61
5.2 Gônada masculina após 21 dias de exposição ao Níquel.....	64
6. CONCLUSÃO.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
<b>CAPÍTULO 3: Análise do níquel como potencial interferente endócrino através de método histoquímico como indicativo da presença de vitelogenina (VTG) em machos de <i>Danio rerio</i>.....</b>	<b>72</b>
1. INTRODUÇÃO .....	72
2. OBJETIVO.....	74
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4. RESULTADOS.....	76
5. DISCUSSÃO.....	77

6. CONCLUSÃO.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
<b>ANEXO A: Fator de Impacto da Revista.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO B: Protocolo de Coloração.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO C: Processamento de Tecido Histológico.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO D: Processo de coloração Histoquímica.....</b>	<b>87</b>

## APRESENTAÇÃO

Os metais têm grande importância quando se trata de ecossistemas aquáticos devido à deposição de efluentes industriais, domésticos e lixiviações. Há inúmeros relatos na literatura em relação seu potencial tóxico sobre os organismos que ameaçam a homeostase do ambiente (Reck *et al.*, 2008; Pyle e Couture, 2012)

Dentre os metais estudados, estão o cobre, o qual é essencial à vida mas pode ser tóxico em elevadas concentrações e o níquel, um metal não-essencial, menos estudado, segundo a literatura, do que o cobre, porém, com potencial tóxico já comprovado. Ambos são capazes de bioacumular nos organismos e serem persistentes no ambiente.

Apesar de existir uma legislação brasileira vigente estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA 357/2005, nem sempre os valores estabelecidos são significativamente seguros ao ambiente e aos organismos aquáticos. Isso acontece devido ao insuficiente número de estudos crônicos ou crônicos parciais com concentrações subletais. Muitas vezes, as substâncias não provocam letalidade, mas, podem alterar fisiologicamente o indivíduo a longo prazo de modo que altere a característica de uma espécie, de uma população, uma comunidade.

Recentemente, as pesquisas científicas têm ganhado interesse quanto aos interferentes endócrinos (IE's), ou seja, compostos capazes de alterar, modificar a síntese, transporte, ação ou eliminação de hormônios naturais de um organismo, afetando a capacidade reprodutiva, de desenvolvimento e sobrevivência destes.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve dois objetivos gerais principais: 1) Contribuir com informações a respeito do potencial efeito tóxico dos metais cobre e níquel, em concentrações nominais na ordem de 25µg/L. 2) Avaliar o potencial efeito como interferente endócrino das substâncias estudadas.

As concentrações utilizadas basearam-se na legislação brasileira estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357/05) as quais são mais permissíveis quanto ao cobre sendo cerca de quatro vezes acima da concentração proposta pela agência de proteção ambiental americana (US Environmental Protection Agency – EPA) e em contrapartida, a concentração de níquel pela legislação brasileira é significativamente mais baixa do que a concentração estabelecida pela legislação norte-americana.

A fim de padronizar os estudos ao redor da temática permitindo a reprodutibilidade e a repetibilidade dos testes, o experimento foi conduzido com base nas normas da OECD Nº123/2010 (Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico) e da ABNT NBR 15499/2015 (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Para isso, o organismo-teste

utilizado foi o peixe *Danio rerio*, popularmente conhecido como “paulistinha”, visto como um organismo-modelo devido ao seu fácil cultivo, de alta sensibilidade, de biologia já conhecida e baixo custo de manutenção que os tornam adequados para pesquisa científica, mundialmente utilizados em estudos ecotoxicológicos e recomendados para testes químicos, com protocolos já estabelecidos.

Dessa maneira, a dissertação foi estruturada na forma de capítulos, da seguinte forma:

**Capítulo 1** – Revisão Bibliográfica. O primeiro capítulo tem como objetivo compilar dados da literatura a respeito dos biomarcadores histológicos em estudos ecotoxicológicos utilizados neste trabalho (fígado e gônada), informações sobre o organismo-teste, dados sobre testes realizados em peixes com os metais estudados Cobre e Níquel.

**Capítulo 2** – Toxicidade dos metais Níquel e Cobre e sua possível atuação como interferentes endócrinos através de análise histológica. O segundo capítulo visa analisar através da histologia, efeitos da toxicidade do Cobre e Níquel no tecido de fígado de *Danio rerio* e investigar a possível atuação como interferente endócrino destas substâncias sob concentrações nominais da legislação CONAMA 357/05, sendo cobre 9µg/L e Níquel 25µg/L. Este capítulo foi publicado em versão resumida na Revista Brasileira de Ciências Ambientais (DOI: 10.5327/Z2176-947820180329).

**Capítulo 3** – Análise do níquel como potencial interferente endócrino através do método histoquímico como indicativo da presença de vitelogenina (VTG) em machos de *Danio rerio*. A finalidade deste capítulo é acrescentar informação a respeito do Níquel através da produção da VTG (biomarcador) no fígado de machos a fim de prever efeitos estrogênicos no organismos que sinalizam um potencial IE.

---

### Interação do ambiente aquático com os metais

#### 1. INTRODUÇÃO

A água é uma fonte natural de recurso esgotável essencial para a manutenção da vida na terra, seja para as funções biológicas dos organismos, para o equilíbrio da temperatura terrestre, higiene, saneamento, fonte de energia elétrica entre outros, sendo a matéria prima essencial para a produção de alimentos (Who, 2011; Rosa, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a escassez e deterioração da qualidade da água serão um problema crucial da sociedade atual. Portanto, compreender e estudar os efeitos dos poluentes aquáticos são fundamentais para o desenvolvimento seguro e economicamente sustentável (Rosa, 2011).

Em decorrência do crescimento da produção industrial nos últimos 50 anos, aumentaram-se intensamente a fabricação e a utilização de compostos químicos sintéticos que comprometem (poluem) a homeostase do sistema aquático (Rosa, 2011).

Os efeitos dos poluentes ainda têm sido estudados pela comunidade científica, devido à diversidade de substâncias nos ecossistemas além de sua complexidade química, principalmente quando se trata de exposições a baixas concentrações a longo prazo, ou seja, toxicidade crônica. Concentrações seguras de exposição ambiental para substâncias isoladas são desejáveis para garantir, dentre outros usos, a proteção da vida aquática.

Para tanto, os ensaios ecotoxicológicos são importantes para caracterizar os efeitos dos poluentes. Não há como os agentes químicos representarem risco zero de efeitos tóxicos, o que justifica as pesquisas científicas buscarem compreender o risco que determinadas substâncias podem causar de acordo com suas concentrações ambientais conhecidas ou estimadas (Bertoletti, 2013).

Os ensaios ecotoxicológicos se baseiam em respostas biológicas (biomarcadores) diante da exposição aos agentes possivelmente tóxicos em função do tempo de exposição. Uma dessas respostas pode ser a disfunção do sistema endócrino, um sistema complexo que interage com o sistema nervoso e é responsável pela adaptação do organismo aos meios externos (Sanchez, 2006).

Algumas pesquisas sugerem que os sistemas endócrinos têm sofrido consequências em seu funcionamento. As substâncias químicas com potencial de alterar a atividade destes

sistemas são chamadas de interferentes endócrinos, os quais modificam a produção, liberação, transporte, metabolismo e ação dos hormônios naturais. Dessa maneira, alteram o equilíbrio intrínseco dos organismos vivos (USEPA, 1998).

De acordo com setor de pesquisa e desenvolvimento (ORD) da agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA), a qual visa selecionar as prioridades na área de pesquisa, relatou que estudos em torno dos interferentes endócrinos estão entre os seis primeiros tópicos de maior relevância. Ainda ressalta que se os estudos sobre os efeitos de exposição concluem que o ecossistema está ou estará em risco e serão necessárias novas pesquisas para diminuição ou eliminação destes componentes químicos.

Atualmente há uma ampla variedade de interferentes endócrinos (IE's) presentes no dia-a-dia, seja na atmosfera, na água ou no solo, que chegam até os rios e lagos. Os IE's, conhecidos como poluentes dos ecossistemas aquáticos, transformam o ambiente em uma fonte de IE's para toda cadeia alimentar. Estes são capazes de modificar ou alterar a síntese e metabolismo de neuropeptídios, neurotransmissores e resposta neurohormonal, o que resulta em modificações fisiológicas, comportamentais e hormonais dos animais. Essas modificações podem acontecer na reprodução, desenvolvimento e na habilidade de lidarem com diversos estímulos externos, como resposta ao estresse, entre outras anomalias (Cristina et al., 2012, Kabir, 2015).

Alguns IE's são altamente solúveis em água e podem estar presentes em partes por bilhão. Os peixes podem absorver esses contaminantes pelas brânquias. Mamíferos e aves pela ingestão direta. Além de serem acumulados nos solos e sedimentos, podendo entrar na cadeia alimentar de uma forma complexa (Kabir, 2015).

Devido às distintas características que um IE pode ter e os diferentes mecanismos de ação no organismo, torna-se difícil estabelecer uma relação entre estes. Mesmo que alguma substância tenha as características para ser considerado um IE, não é possível determinar apenas por sua estrutura (Kabir, 2015).

Os mecanismos de ação e de transporte de um IE variam em cada organismo dependendo da intensidade do estresse, tempo de contato e da biologia do próprio organismo (Kendal et al., 1998).

São necessários mais estudos que visem esclarecer o modo de funcionamento dos contaminantes ambientais sobre os distúrbios endócrinos, seus mecanismos de ação, a reversibilidade e a relação entre a exposição e alterações no organismo (Fontenele, 2010).



Segundo a literatura, dentre os poluentes com potencial para atuar como IE, destacam-se os metais, que se caracterizam por serem persistentes, bioacumulativos e potencialmente tóxicos. São encontrados em diversos ambientes, como no solo, sedimento, nas plantas e nos animais. Porém, sua toxicidade depende de inúmeros fatores como características dos próprios metais, da biodisponibilidade, da concentração absorvida pelo organismo e do tempo de exposição (Santana, Barroncas, 2007).

### **1.1 Metais no ambiente aquático**

Os metais podem ser classificados como essenciais ou não-essenciais. Porém, isto não significa que ele não é tóxico. Mesmo os metais essenciais podem ser tóxicos em concentrações elevadas ou a longo prazo. Da mesma maneira, os metais não-essenciais, não são necessariamente tóxicos. Estes também possuem uma faixa tolerável ao ambiente e ao organismo. Os metais essenciais variam em quantidade insuficiente, ótima, tóxico e letal. Assim como os metais não-essenciais podem estar na faixa tolerável, tóxico e letal (Esteves & Guariento, 2011). Por consequência, é importante o conhecimento sobre o elemento, qual sua concentração no ambiente e nos organismos, a maneira que o transporte destes acontece e os demais fatores relacionados a essa interação. Tanto do ambiente para o organismo, quanto no próprio organismo.

A especiação de metais nos ecossistemas aquáticos está disponível em diversas formas físico-químicas nos compartimentos ambientais. Segundo Zagatto e Bertoletti (2006), os metais podem estar presentes na forma livre e dissolvida (metálicos, mono e polivalentes-hidratados), complexada (fraca ou fortemente) pela matéria orgânica dissolvida, adsorvidos nas partículas coloidais e nos particulados orgânicos e inorgânicos suspensos na água ou na forma insolubilizada, como sulfetos, cloretos, arsenitos e carbonatos. Devido à variedade de formas, é dificultosa a discriminação de espécies individuais pelas várias metodologias físico-químicas, sendo possível a identificação de propriedades físicas, químicas e biológicas similares. Os metais podem se prender aos sedimentos de forma irreversível, desde que as condições anaeróbias sejam mantidas, resultando no efeito direto na cadeia alimentar através da bioconcentração dos contaminantes via organismos bentônicos e outras rotas. Entretanto, sob condições biogeoquímicas variadas, os contaminantes podem ser liberados por ressuspensão via bioturbação, por ventos ou dragagens dos sedimentos ou por reaeração da coluna d'água (Zagatto & Bertoletti, 2006;).

O níquel (Ni) origina-se de fontes naturais e artificiais e pode ser encontrado no ar, água, solo e em organismos vivos. No ar, é encontrado devido ao uso de aerossóis em diferentes concentrações. O transporte e a distribuição de partículas de Ni dependem do tamanho da partícula e do ambiente em que ela se encontra. Geralmente as fontes artificiais são responsáveis por partículas menores. A contaminação da água resulta da sedimentação de partículas de metais da atmosfera, de lixos industriais e domésticos e pela erosão do solo. Este composto químico é majoritariamente transportado na forma precipitada. Em lagos é encontrado na forma iônica e geralmente em associação com a matéria orgânica. Dependendo do tipo de solo, Ni pode ter alta mobilidade, atingindo os lençóis freáticos. A chuva ácida tem grande potencial de mobilizar o Ni do solo (Georgescu *et al.*, 2011).

Na revisão de Georgescu *et al.* (2011), os autores reportam que em ambientes poluídos, plantas aquáticas foram observadas com altos níveis de níquel e em peixes foram encontradas concentrações entre 0,02 à 2 mg/kg, porém este valor pode aumentar cerca de dez vezes. O mesmo autor cita que há estudos feitos com exposição por vias aéreas em ratos, demonstrou morte fetal, crescimento intra-uterino e anomalias congênitas associadas a mutações letais dominantes neste organismo. Acredita-se que este metal possa agir como um interferente endócrino para organismos aquáticos.

Outro metal relatado como potencial IE é o cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ). Há evidências de que seus efeitos tóxicos crônicos causam uma série de alterações celulares e físicas em peixes. A exposição crônica deste metal pode acarretar em diversos efeitos fisiológicos, como o aumento do consumo de oxigênio, diminuição da atividade locomotora e dos níveis de linfócitos, alteração no sistema imune, proliferação de células epiteliais nas guelras e intestino, alteração nas respostas hematopoiéticas, entre outros efeitos (Handy, 2003).

A evidência dos metais Cu e Ni como interferentes endócrinos não é contemplada na literatura e seus efeitos a longo prazo não são conhecidos. Portanto, o presente estudo pretende contribuir com informações a respeito da revisão dessa temática por meio de biomarcadores histológicos.

### 1.1.1 Cobre: efeitos toxicológicos e ecotoxicológicos

O cobre foi identificado em plantas e animais no século XIX e descrito como catalisador biológico no século XX. As vias de exposição mais comuns são através da água e dos alimentos (IPCS, 1998; WHO, 2003).

As normas internacionais da organização mundial da saúde de 1958 (WHO *International Standards for Drinking-water*) sugeriram a concentração máxima de 1,5 mg/L porém em 1984 o valor foi diminuído para 1,0 mg/L (IPCS, 1998; WHO, 2003).

O cobre é um elemento que desde a pré-história está presente e contribuiu para o desenvolvimento das civilizações até os dias atuais. Era um metal facilmente encontrado e de fácil manufatura. Atualmente é usado em ligas, canos, fios elétricos, radiadores e automóveis. Majoritariamente emitido por atividades de mineração e fundição pela queima de carvão como fonte de energia e pelos incineradores de resíduos municipais ou então na agricultura. Também é encontrado em carnes, frutos do mar, vegetais, cereais e nozes (Sargentelli *et al.*, 1995; Pedrozo & Lima, 2001).

A maior parte do cobre é produzido a partir de minérios contendo sulfeto. Em 1999, as reservas mundiais de cobre atingiram 650 milhões de tonelada de metal contido, sendo 11,9 milhões no Brasil (DNPM, 1999 *apud* Pedrozo & Lima, 2001).

No ambiente aquático as principais formas solúveis de cobre são  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}(\text{HCO}_3)$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})$  e cobre dissolvido, as quais variam em função do pH. A concentração dessas diferentes formas pode ser influenciada por fatores como o potencial de redução da água, presença de cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e ânions de sais cúpricos insolúveis ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ). Sobre sua toxicidade, ressalta-se uma relação inversa com a dureza da água, provavelmente pela competição entre cálcio e cobre pelos sítios de adsorção em superfícies biológicas (Pedrozo & Lima, 2001).

A toxicidade do cobre depende da concentração em que se encontra no organismo. Em concentrações adequadas, no homem, o cobre atua como um catalisador nos processos bioquímicos e a principal função das biomoléculas contendo cobre é o transporte de elétrons e de oxigênio. (Sargentelli *et al.*, 1995).

Quando o cobre encontra-se em concentrações elevadas, a proteína metalotioneína indica sinais de toxicidade do cobre no organismo. A metalotioneína atua no organismo convertendo  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , o qual nesta última forma é responsável pelo transporte de ferro na circulação sanguínea. Dessa maneira, o cobre pode ser precursor de anemias. Este metal é encontrado em fluidos como soro, plasma, eritrócitos, líquido espinhal, saliva, fluidos digestivos e também em tecidos como cérebro, pulmão, coração, músculo, dentes, ossos, baço, rim e fígado. O alimento que contém cobre passa pelo aparelho digestivo, onde é absorvido apenas em quantidades necessárias e distribuído entre os órgãos e o resto é excretado, seja através da urina, fezes ou, no caso de mulheres, pelo fluxo menstrual. Todos

na forma  $\text{Cu}^{2+}$  livres. O excesso ou a falta deste elemento é conhecido como hiper e hipocupremia, respectivamente. A doença de Wilson é o distúrbio pela falta de cobre mais conhecido. Este provoca dilatação da cápsula do fígado, alterações musculares e alterações nervosas (Sargentelli *et al.*, 1995; Grosell, 2002).

Em peixes, a exposição crônica ao cobre provoca uma série de respostas fisiológicas observadas nas brânquias, fígado, intestino, rins, músculo e no sistema reprodutor (Handy, 2003). Por ser uma substância essencial e também tóxica em altas concentrações, a deficiência pode aumentar a captação de cobre pelas brânquias, de maneira oposta, quando os níveis no ambiente excedem a capacidade do organismo, a substância é redistribuída para o fígado, como observado em *Oncorhynchus mykiss*, isto é, a captação de cobre parece ser modulada dependendo do status do peixe, sugerindo que vias de transporte agem através de reguladores específicos (Grosell, 2002; Handy, 2003).

Outras espécies como *Oreochromis mossambicus* (tilápia) (Dang et al. 2000), *Oreochromis niloticus* (Monteiro, 2009), *Luciobarbus bocagei* e *Pseudochondrostoma* sp (Fonseca, 2017) também apresentaram anormalidades nas brânquias quando expostos ao cobre. Dentre as alterações observadas, estão: fusão da lamela, proliferação epitelial, vasodilatação, aneurismas, edema e necrose, que podem afetar a troca de gases e o equilíbrio osmótico (Fonseca, 2017).

Existem, além do mais, as interações entre substâncias que podem aumentar ou diminuir a concentração do xenobiótico como, por exemplo, o aumento da quantidade de sódio no ambiente, levando a diminuição da captação de cobre pelas brânquias (Grosell, 2002).

A proteína metalotioneína foi observada em brânquias, e músculo de *Carassius auratus gibelio*, em fígado, músculo e brânquias em *Cyprinus carpio* sobre concentrações subletais de cobre (De Boeck, 2003, Hauser-Davis *et al.*, 2014).

De acordo com o levantamento de Handy (2003), a exposição crônica ao cobre pode ocasionar três tipos de alterações, que podem ser categorizadas em supraregulação das enzimas e do metabolismo, respostas hematopoiéticas e alterações no tecido celular. Estas mudanças podem ser induzidas por respostas ao estresse causadas pela própria exposição ao cobre ou estimuladas por processos neuro-endócrino específicos que normalmente requerem íons de cobre em menores concentração. Portanto, não necessariamente estas respostas do sistema endócrino estão relacionadas às respostas toxicológicas.

Em estudos feitos com *Oncorhynchus tshawytscha* foi observado que a concentração de cobre no músculo depende do tamanho do peixe. Sendo os maiores apresentam menos concentração no fígado do que os peixes menores (Peterson, *et al.*, 1991).

Na literatura é evidente que doses subletais de cobre afetam fisiologicamente os organismos aquáticos de diversas maneiras, como é observado na **Tabela 1**.

Concentrações subletais de cobre afetam o crescimento devido ao gasto energético do organismo ao tentar manter as funções fisiológicas, como a troca de gases e o equilíbrio (Fonseca *et al.*, 2017; Oss *et al.*, 2016).

Especificamente com o organismo-modelo *Danio rerio*, o cobre gera estresse oxidativo, efeitos genotóxicos e comportamental (no estágio larval), além de ter efeito acumulativo no fígado e nas brânquias (Craig *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2013).

**Tabela 1.** Efeitos da exposição do Cobre em peixes

<b>Tempo de exposição</b>	<b>Concentração</b>	<b>Organismo-teste</b>	<b>Resposta fisiológica</b>	<b>Autores</b>
7 dias	100 µg/L	<i>Solea senegalensis</i>	Fígado: alteração no sinusóide, aumento da gotícula lipídica, estagnação sanguínea. Brânquia: alteração nas células pavimentosas, hiperplasia e fusão lamelar	ARELLANO, <i>et al.</i> , 1998
5 dias	2,4 µM	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Brânquias: Presença da proteína metalotioneína	DANG, <i>et al.</i> , 2000
21 dias	1µM	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Carassius auratus gibelio</i>	Diminuição da capacidade natatória, acúmulo de cobre nas brânquias	DE BOECK <i>et al.</i> , 2006
48h	8 e 15 µg/L	<i>Danio rerio</i> (adulto)	Brânquias e fígado: estresse oxidativo	CRAIG <i>et al.</i> , 2007
21 dias	40 e 400 µL-1	<i>Oreochromis niloticus</i>	Brânquias: Indução da apoptose, proliferação das células epiteliais	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2009
6, 12, 24 e 48h	12,5 e 100 µL	<i>Danio rerio</i>	Brânquias: indução da apoptose celular	LUZIO, <i>et al.</i> , 2013
24h	10µM	<i>Danio rerio</i> (larva)	Estresse oxidativo	LEITE <i>et al.</i> , 2013
96h	2 mgL-1	<i>Oreochromis niloticus</i>	Fígado: presença de metalotioneína na bile	HAUSER-DAVIS <i>et al.</i> , 2014.
96h	5, 9, 20, 60 µg/L	<i>Danio rerio</i> (larva e adulto)	Larva: crescimento diminuído, estresse oxidativo. Adulto: dano a memória espacial, glutatona	ACOSTA, <i>et al.</i> , 2016

96h	5, 9, 20, 60 µg/L	<i>Danio rerio</i> (larva e adulto)	S-transferase Larva: crescimento diminuído, estresse oxidativo. Adulto: dano a memória espacial, glutatona S-transferase reduzida (brânquias)	ACOSTA, <i>et al.</i> , 2016
30-60 dias	13 e 26 µg L-1	<i>Centropomus parallelus</i>	Efeitos genotóxicos, acúmulo nas brânquias, peso e tamanho diminuído	OSS <i>et al.</i> , 2016
Coletadas no local com no mínimo 4 dias de exposição	2,4 - 171 µg/L	Espécies aquáticas não-especificadas	99,9% de risco ecológico	FU, <i>et al.</i> , 2016
Coletadas no local	18,3 µL/L-1 (média)	<i>Luciobartus bocagei</i> , <i>Pseudochondrostoma</i> sp., <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Brânquia: fusão lamelar, proliferação do filamento epitelial e necrose.	FONSECA, <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Autoria própria

### 1.1.2 Níquel: efeitos toxicológicos e ecotoxicológicos

A importância econômica do níquel está associada às suas características físico-químicas, como força, estabilidade em altas temperaturas, resistência à corrosão e suas propriedades térmicas e elétricas. Cerca de 60% deste metal é usado para produção de aço inoxidável e 40% para produção de equipamentos, materiais de construção, equipamentos médicos, containers de armazenamento, baterias, cerâmicas, jóias, tintas, ímãs (Reck *et al.*, 2008; Pyle & Couture, 2012)

O níquel não é um nutriente essencial para organismos aquáticos, apesar de ter essa propriedade para plantas e animais terrestres. Entretanto, este metal é abundante em águas doces e marinhas. Sua concentração é elevada devido a efluentes urbanos e industriais liberados ou escoamentos próximos a áreas industriais e através de material particulado no ar. Dependendo da condição do ambiente, o Ni pode se ligar a matéria orgânica dissolvida. Em peixes, a via de exposição acontece através das brânquias, do epitélio olfativo ou pela alimentação, a qual levará o metal ao intestino e então será acumulado nos rins, fígado e até mesmo músculo. Em altas concentrações podem afetar o metabolismo de carboidratos, diminuindo a reserva de glicogênio no fígado e no músculo, conseqüentemente, aumentando a concentração de glucose e ácido láctico no plasma (Pyle & Couture, 2012; Palaniappan & Karthikeyan, 2009; Palermo *et al.*, 2015).

A quantidade de estudos envolvendo níquel é significativamente menor que estudos com cobre na literatura. Provavelmente pelo fato de que o Cu demonstrou-se mais tóxico em testes de exposição aguda para organismos aquáticos. Contudo, na literatura é possível observar que o níquel afeta significativamente os organismos aquáticos de diversas maneiras. Estudos feitos com larva e embrião de *Danio rerio* mostraram a diminuição da atividade locomotora, retardo na eclosão dos ovos e taxa de mortalidade aumentada (Kienle, *et al.*, 2008). Em *Carassius auratus* também foi visto a diminuição na atividade locomotora e perda de peso (Zheng, *et al.*, 2014).

É evidente que o níquel tem um alto potencial bioacumulativo observado em maiores concentrações em rins, fígado, brânquias e músculo, respectivamente (Palaniappan & Karthikeyan, 2009; Palermo, *et al.*, 2015), além de efeitos histopatológicos nestes órgãos constatados nos organismos *Hypophthalmichthys molitrix*, *Oncorhynchus mykiss* e *Pimephales promelas* (Driessnack *et al.*, 2017; Topal *et al.*, 2017; Athikesavan, *et al.*, 2006). Além do mais, efeitos genotóxicos (Palermo, *et al.*, 2015), imunotóxicos (Zheng *et al.*, 2014)



e outros relacionados a estresse oxidativo (Zheng *et al.*; 2014, Palermo *et al.*, 2015 e Topal *et al.*, 2017).

Outro problema ambiental necessário considerar é o sinergismo entre as substâncias quando estão no ecossistema aquático, pois diversas transformações no ambiente podem ocorrer e aumentar a toxicidade do metal. No caso do níquel, há estudos com *Pimephales promelas* e *Cirrhinus mrigala* em sinergismo com cobre e cromo respectivamente, que demonstram que a mistura dos dois metais pode levar a uma maior bioacumulação nos tecidos, aumentando assim a toxicidade nos organismos aquáticos (Driessnack *et al.*, 2017; Palaniappan & Karthikeyan, 2009).

A característica da água como pH, dureza, índice de oxigênio dissolvido e a sazonalidade do ambiente influenciam na toxicidade do níquel sobre os organismos aquáticos como visto em *Paracheirodon axelrodi*, *Pimephales promelas* e *Oncorhynchus mykiss* (Holland, *et al.*, 2017; Deleebeeck *et al.*, 2007; Hoang *et al.*, 2004). Segundo Hoang *et al.* (2004), a matéria orgânica natural pode diminuir a toxicidade em peixes e a idade também é um fator relevante.

**Tabela 2.** Efeitos da exposição do Níquel em peixes.

Tempo de exposição	Concentração	Organismo-teste	Resposta fisiológica	Autores
10, 20, 30 dias	5,7 mg/L	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Brânquia: fusão da segunda lamela, distorção, hipertrofia, hiperplasia; fígado: degeneração das veias sanguíneas, necrose; rim: ruptura celular, vacuolização	ATHIKESAVAN, <i>et al.</i> , 2006
2h e 11 dias	7,5 - 15mg/L	<i>Danio rerio</i> (Larva e embrião)	Diminuição da atividade locomotora, retardo no tempo de eclosão e mortalidade	KIENLE <i>et al.</i> , 2008
7-28 dias	2,87 mg/L	<i>Cirrhinus mrigala</i>	Bioacumulação nos tecidos: rins>fígado>brânquia>músculo. Sinergismo em combinação com cromo.	PALANIAPPAN & KARTHIKEYAN, 2009
96h	10, 25, 50, 100 mg/L	<i>Carassius auratus</i>	Perda de peso, diminuição da atividade locomotora, diminuição dos linfócitos, aumento dos monócitos e neutrófilos. Fígado: depleção do nível de glutatona, diminuição da peroxidação lipídica, diminuição da ATP	ZHENG, <i>et al.</i> , 2014
24 e 96h	25, 250 e 2500 µg /L-1	<i>Prochilodus lineatus</i>	Bioacumulação nos tecidos: rins>fígado>brânquia>músculo. Síntese de metalotioneína no fígado. Potencial efeito genotóxico.	PALERMO, <i>et al.</i> , 2015

21 dias	1 e 2 mg/L	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Brânquias: espessamento lamelar infiltração celular; Fígado: degeneração hidrópica dos hepatócitos; rim: acumulação hialina entre o glomérulo e degeneração tubular.	TOPAL, <i>et al.</i> , 2017
21 dias	270µg/L	<i>Pimephales promelas</i>	Em combinação com cobre: Downregulation do gene da vitel em fêmeas, alteração na gônada feminina (diminuição na abundar folículos vitelogênicos maduros, folicular), fecundidade reduzida	DRIESSNACK <i>et al.</i> , 2017

---

Fonte: Autoria própria

## 1.2 INTERFERENTES ENDÓCRINOS

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), órgão fiscalizador ambiental responsável pela elaboração de relatórios anuais da qualidade ambiental da água, qualidade do ar, das praias litorâneas, subterrâneas, foi a base para a realização da presente pesquisa. Nos relatórios da CETESB (c418q, 2016), encontram-se um histórico sobre as concentrações de metais e ecotoxicidade das águas doces, foco na presente revisão.

De acordo com o Relatório da Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo Parte 1 – Águas doces (2015), ensaios ecotoxicológicos realizados com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, mostraram índices de toxicidade aguda causada provavelmente por cobre e níquel.

Tanto os metais Cobre e Níquel, os quais estão presentes nas águas doces brasileiras, e em rios enquadrados como classe 2 (CETESB), são considerados potencialmente interferentes endócrinos. São chamados de interferentes endócrinos (IE) substâncias capazes de desregular hormônios naturais dos organismos, levando a consequências para reprodução, metabolismo, imunidade, desenvolvimento, e até mesmo comportamento. Essas alterações podem durar depois do período de exposição ou então a gerações futuras dependendo das características do contaminante (Monneret, 2017).

Um IE pode agir simulando total ou parcialmente o efeito de um hormônio natural através do bloqueio dos hormônios com seus receptores, agindo na expressão de receptores específicos e a ligação entre estes e uma determinada substância exógena (Monneret, 2017).

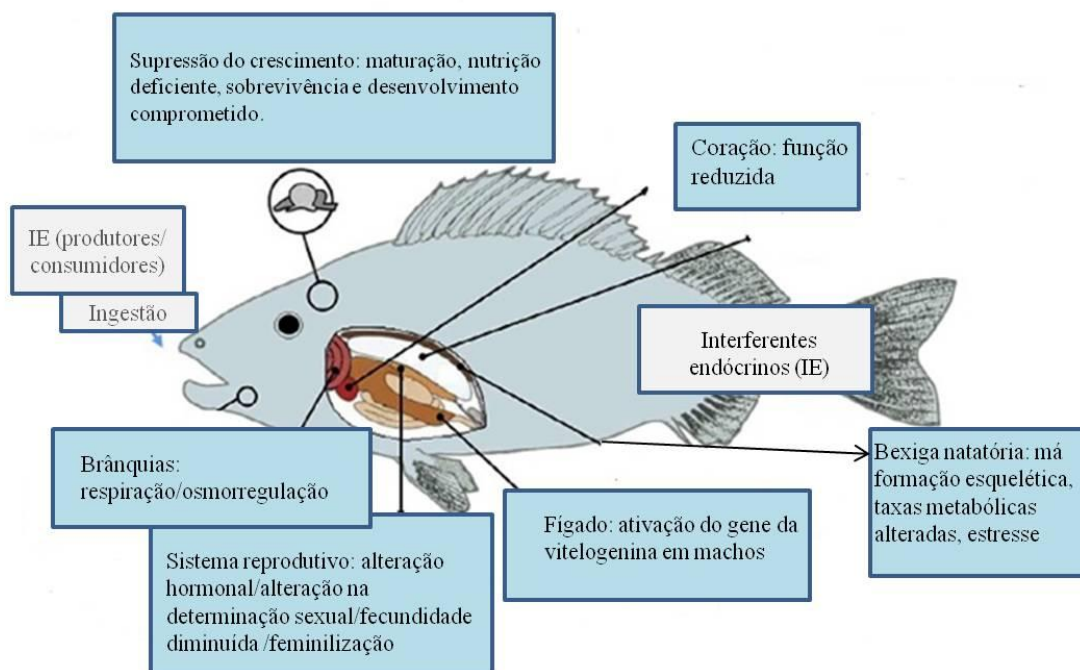
Estas substâncias são liberadas ao ambiente através de efluentes industriais, escoamentos terrestres, resíduos domésticos, agricultura, aquicultura e precipitação. Portanto, passam pelo processo de absorção, acumulação e bioacumulação na água, sedimento e biota. Enquanto na água, as substâncias exógenas passam por diluição e degradação que podem auxiliar na eliminação do poluente, quando atingem organismos aquáticos é importante considerar que, provavelmente, atingirá os consumidores diretos desses animais, aumentando a taxa de bioacumulação e biomagnificação, principalmente por ter característica lipofílica, ou seja, concentram-se no tecido adiposo dos consumidores mesmo em concentrações muito baixas, e então, ao chegarem aos consumidores finais, poderão estar elevadas provocando efeitos tóxicos (Monneret, 2017; Ismail *et al.*, 2017)

Considerando a classe dos peixes, a secreção dos hormônios gonadotróficos depende da resposta do peixe aos estímulos ambientais, ou seja, um IE pode alterar a determinação sexual destes organismos. Somente uma fêmea adulta pode induzir a vitelogênese através da

excreção suficiente de estrógeno, porém, perturbações ambientais, como a ação de um IE, podem fazer com que machos também produzam vitelogenina, o que indica feminilização dos mesmos. Além da alteração na determinação sexual, um IE pode levar a diminuição nas taxas de crescimento e retardo na reprodução (Ismail *et al.*, 2017).

Na **Figura 1** podem ser observadas as vias de exposição de um interferente endócrino em peixes e algumas possíveis alterações causadas por estes.

**Figura 1** - Efeitos dos interferentes endócrinos. Fonte: Adaptado de Ismail et al., 2017 (tradução própria).



### 1.3 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS COMO FERRAMENTA EM ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS

A ecotoxicologia é o estudo científico dos efeitos causados por xenobióticos sobre os organismos vivos pelas substâncias liberadas no ambiente, ou seja, o termo é utilizado para estudos dos efeitos desses compostos nos ecossistemas e seus componentes não-humanos. O estudo da ecotoxicologia inclui ainda os caminhos de transferência destes xenobióticos e sua interação com o ambiente. Há maior quantidade de informação dos efeitos dos agentes químicos nos mamíferos e pouco se sabe sobre os efeitos em outros animais (Azevedo, Chasin, 2004).

Quando uma substância é liberada no ambiente natural, é difícil prever o que acontecerá com ela. Isso porque o aumento da temperatura, alteração no pH, vento, direção e velocidade do fluxo da água, pressão atmosférica, presença de matéria orgânica e inorgânica, entre outros parâmetros, podem alterar a estrutura química do xenobiótico. Uma vez liberada, esta substância pode entrar na atmosfera, litosfera e hidrosfera por diferentes mecanismos como, por exemplo, sair ou entrar da água por volatilização, ser transportado da atmosfera para a água por dissolução. Portanto, o comportamento químico de uma substância é diretamente influenciado por parâmetros naturais (Azevedo & Chasin, 2004, Zagatto & Bertolotti, 2006).

Primeiramente é importante que seja conhecido o comportamento subsequente de quando um componente é liberado no ambiente abiótico, secundariamente, conhecer como é distribuído e transportado geograficamente para dentro de diferentes biotas e se como este se transforma. Posteriormente é necessário conhecer a exposição dos organismos-alvo e avaliada a resposta de um organismo individual, população ou comunidade ao poluente específico em um período apropriado e sua consequência ao homem (Shane, 1994; Azevedo & Chasin, 2004; Zagatto & Bertolotti, 2006).

Assim a Ecotoxicologia se posiciona nas Ciências do Ambiente como geradora de um tipo de conhecimento básico e essencial que subsidiará a formulação segura de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais para enfrentar questões de risco ecotoxicológico, potencial ou real, determinado pelo uso e pelo lançamento de agentes químicos no ambiente (Azevedo & Chasin, 2004).

Dessa maneira, com os estudos ecotoxicológicos, poderá ser avaliado a extensão do risco, estipular metodologias de vigilância, prever a mobilização, bioacumulação, biomagnificação dos agentes contaminantes e orientar medidas de remediação (Azevedo, Chasin, 2004).

Na ecotoxicologia é comum o uso dos termos bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação. A bioacumulação é a razão de uma substância química no tecido animal em uma fase ambiental externa como na água, sedimentos ou alimentos em estado estacionário, ou seja, inclui a absorção a partir de todas as vias de exposição como respiração, nutrição, epiderme. A biomagnificação refere-se à concentração de resíduos químicos na parte mais alta da cadeia alimentar devido à dieta dos próprios organismos, portanto, um animal se alimenta de outro que possui uma determinada concentração de uma substância tóxica e

consequentemente a ingerir. Já a bioconcentração é um parâmetro que se refere a razão entre a concentração da substância no tecido animal e na água em um estado estacionário, sem levar em consideração os outros níveis tróficos. O termo usado para quantificar a tendência de um composto se concentrar em organismos aquáticos é o fator de bioconcentração (FBC) (Zagatto & Bertolotti, 2006). Como demonstrado:

$$\text{Fator de Bioconcentração (FBC)} = \frac{\text{concentração do composto químico no indivíduo}}{\text{concentração do composto na água}}$$

Segundo Zagatto e Bertolotti (2006), os peixes são alvos de estudos sobre bioconcentração devido à sua importância como fonte de alimento ao homem e a disponibilidade de procedimentos-teste padronizados para este organismo.

Os efeitos causados por um agente químico no meio hídrico pode ser avaliado por ensaios toxicológicos com organismos representativos do ambiente, através de ensaios toxicológicos padronizados por normas nacionais como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) ou internacionais como a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (Aragão & Araújo, 2006).

Os ensaios de toxicidade devem ser feitos baseados em procedimentos que já foram validados. Os organismos utilizados devem ser além de representativos, sensíveis, de baixo custo e os resultados obtidos nos testes laboratoriais devem se aproximar o quanto possível da realidade dos efeitos ambientais causados por determinado xenobiótico. (Aragão & Araújo, 2006; Azevedo & Chasin, 2004).

Em laboratórios são categorizados em: ensaios de toxicidade aguda, no qual se avalia efeitos severos e rápidos sofridos pelos organismos expostos em um curto período de tempo e analisa-se, de uma maneira geral, a mortalidade e a imobilidade do organismo-teste entre 24-96h. Em ensaios de toxicidade crônica os organismos-teste são expostos à agentes químicos em níveis subletais podendo mostrar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a longo prazo (Adams, 1995; Aragão & Araújo, 2006).

Os testes de toxicidade crônica podem ser realizados durante o ciclo de vida completo do organismo ou parte dele (Adams, 1995). Após o tempo de exposição são realizados testes funcionais devido ao fato de que os peixes e outros organismos reagem aos efeitos das substâncias tóxicas em concentrações subletais por respostas medidas através de análise do sangue, atividade enzimática, efeitos histológicos. Porém, ainda é difícil aplicar os resultados em análises de risco ambientais, pois muitos dos efeitos são transitórios e podem desaparecer

conforme a capacidade de resiliência dos organismos e do ambiente (Aragão & Araújo, 2006). Ou seja, assim como o ambiente tem a capacidade de transformar xenobióticos em substâncias menos nocivas à vida aquática através de propriedades como pH, dureza da água, quantidade de sódio, entre outras características como compostos que podem interagir entre si (sinergismo) e modificar o meio, o organismo também tem a capacidade de se adaptar ao estresse ambiental causado por substâncias externas. Assim como o efeito contrário de modificar um componente de maneira que ele apresente risco ao ambiente, tornando-o inóspito ou causando danos aos organismos.

Devem ser realizados utilizando organismos que sejam sensíveis à agentes químicos e tendo essa sensibilidade constante garantem boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Para isso, é importante que tenham sua biologia conhecida. Neste contexto, o uso do peixe, também conhecido popularmente como paulistinha ou “zebrafish”, é recomendável para ensaios ecotoxicológicos como organismo-modelo (Domingues & Bertolotti, 2006).

Após a exposição crônica a contaminantes, é possível definir biomarcadores que possam ser utilizados para análise de toxicidade ou de interferência endócrino avaliando o dano de determinado xenobiótico. As respostas biológicas são de relativamente fácil identificação e estão diretamente relacionadas à saúde dos indivíduos que vão influenciar a população ou a comunidade (Au, 2004).

Au (2004) cita em seu artigo de revisão que extensos estudos nos EUA e na Europa estabeleceram uma relação entre patologias e peixes. Então vários biomarcadores foram desenvolvidos e recomendados para análise da poluição em peixes teleósteos e bivalves a nível histológico. Lesões histopatológicas servem como indicadores primários de exposição à contaminantes.

O fígado é um órgão muito utilizado devido a sua capacidade de acumulação e biotransformação de xenobióticos orgânicos e metais, o que faz com que sua concentração seja mais elevada do que no ambiente e em outros órgãos (Heath, 1995; Au, 2004).

Ao mencionar interferentes endócrinos, diversos biomarcadores são encontrados nas gônadas dos indivíduos como aumento/diminuição da proporção das espermatogônias, presença de estrutura ovariana, degeneração e hiperplasia/hipertrofia das células de Leydig, inflamação granulomatosa, desenvolvimento gonadal assíncrono, estágio de maturação diferente em relação ao organismo-controle e aumento do fluido intersticial. Já nos organismos fêmeas, é possível a identificação de um IE pela atresia dos oócitos, hiperplasia/hipertrofia das células perifolicular, diminuição da vitelogênese e diferença no



estágio de maturação, fibrose intersticial, inflamação granulomatosa e diminuição do número de folículos pós-ovulatório quando comparado ao grupo controle (OECD, 2010). Segundo Dietrich & Krieger (2009) a inibição da gametogênese inclui a redução na divisão gamética e maturação, refletidos pela degeneração das células germinativas, inflamação e fibrose.

A atresia é a degeneração dos tecidos em qualquer estágio do desenvolvimento dos folículos, porém é mais notável nos estágios finais. Após a exposição a um químico, pode ocorrer hiperplasia ou hipertrofia das células de Sertoli. A presença de vacúolos nessas células pode ser atribuída à fagocitose de corpos residuais ou outros elementos celulares. A fibrose é a proliferação de fibroblastos seguida do aumento da deposição de colágeno, resultando na alteração da espessura do tecido conectivo. Em alguns casos, é descrito em conjunto com processos inflamatórios e/ou lesões degeneração. A formação do ducto gonadal também pode ser inibida quando expostos aos contaminantes durante a fase de diferenciação sexual, comprometendo então a integridade dos ductos espermáticos (Dietrich & Krieger, 2009).

O processo de degeneração do núcleo da celular é chamado de picnose, considerado uma etapa do processo de morte celular, o qual pode ocorrer de diversas maneiras descritas a seguir.

A apoptose extrínseca indica casos de morte celular causados por sinais de estresse extracelular que são detectados e propagados por receptores transmembranares específicos, que, dependendo do contexto do estímulo podem agir pró-sobrevivência ou pró-morte. Este processo é geralmente dependente de caspase, portanto pode ser desencadeado por danos ao DNA, estresse oxidativo, sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , superestimulação do receptor de glutamato no sistema nervoso, entre outros. Na apoptose intrínseca, há poucos casos dependente de caspase pelo fato de que a inibição química e/ou genética raramente têm efeitos a longo prazo. Geralmente atrasa o processo de morte celular, mas não o previne, podendo desencadear características de necrose (Galluzzi *et al.*, 2012).

Há também o processo de necrose regulada (necroptose), engatilhada por dano ao DNA alquilante, excitotoxinas e alguns receptores ligados ao processo de morte celular. Pode ser desencadeado por manipulação (“nocaute” de genes). Outro tipo é a morte celular autofágica, o qual se baseia nas características morfológicas como grande vacuolização citoplasmática, que muitas vezes indica aumento do fluxo autofágico. Cientistas indicam que autofagia executa morte celular devido a dois fatores: primeiro, a autofagia demonstra mediar a fisiologia da morte celular e segundo, a autofagia parece ser responsável pela morte celular de algumas células cancerígenas quando faltam moduladores apoptóticos essenciais ou

caspases. No entanto, na maioria dos casos, a autofagia é uma resposta de citoproteção por células que apresentam sinais de deterioração na tentativa de responder ao estresse (Galluzzi *et al.*, 2012).

São poucas as informações sobre os biomarcadores de interferência endócrino na literatura. Corrêa (2016) expôs organismos machos de *Danio rerio* ao contaminante chlorantraniliprole por 21 dias e observou hipertrofia das células gaméticas, principalmente espermatócitos ao redor do lúmen e mais abundantes. Além de degeneração das células e perda da estrutura interna.

Alkimin (2016) notou alterações nas gônadas femininas de *Danio rerio* ao expor os organismos a 0,025 µg/L de cádmio. Foram observadas alterações no padrão de maturação gonadal, predomínio de estágios intermediários e finais de maturação, oócito com vitelogênese lipídica (Fase III), oócito com vitelogenese lipídica e proteica (Fase IV), oócito com vitelogênese completa (Fase V) e folículos atrésicos que poderiam ser consequências de mudanças fisiológicas, ocasionando degeneração nos oócitos. O autor conclui que o aumento da concentração de Cd no ambiente provoca estímulo ovariano, sendo um padrão diferente do controle, impedindo a maturação gonadal de forma assíncrona. Variações similares foram vistas quando este mesmo organismo foi exposto ao zinco em concentrações de 120 e 180 µg/L.

Além das modificações citadas anteriormente, há alterações que ainda não fazem parte dos protocolos oficiais, porém são evidências de um interferente endócrino. No trabalho de Silva (2017), foram propostas alterações adicionais não relatadas na literatura, como hiperplasia das células testiculares, alteração morfológica do núcleo, estágio da espermatogênese indefinido (machos e fêmeas) e danos a estrutura no nucléolo e granulação citoplasmática cortical.

É necessário o entendimento do comportamento do ciclo reprodutivo de peixes, como o tempo de maturação do oócito, por exemplo, para caracterizar um biomarcador para exposição de xenobióticos (Au, 2004).

A poluição crônica pode levar a diminuição da qualidade dos gametas, prejudicando o sucesso reprodutivo, comprometendo a população e a comunidade de peixes, além das substâncias terem o potencial acumulativo e em alguns casos serem persistentes, o que leva os contaminantes a mais altos níveis tróficos

### 1.3.1 Zebrafish” como organismo-teste

Conhecido como popularmente como “paulistinha” ou, do inglês, “zebrafish” (peixe-zebra), é da espécie *Danio rerio* é pertencente da família ciprinídeos, da ordem cypriniformes, tipicamente tropical de água doce.

É um peixe originário da Índia, ovíparo e mundialmente utilizado em estudos ecotoxicológicos, multigeracionais ou estudos relacionados ao sistema endócrino (Domingues & Bertoletti, 2006; Dietrich & Krieger, 2009). São organismos de relativamente fácil cultivo, reprodução e baixo custo de manutenção, o que os tornam adequados para pesquisa científica (Dietrich & Krieger, 2009). São espécies recomendadas para testes ecotoxicológicos com protocolos já estabelecidos pela OECD.

Em relação a sua morfologia externa (Fig. 2), com cerca de 4-5 cm, seus corpos são alongados (menos de 1 cm de altura e 2-3 mm de espessura), cabeça curta (corresponde 10-15% do corpo), narina protuberante, mandíbula superior protusiva com finas barbelas de aproximadamente 1 mm de comprimento que se projetam ventralmente. Possuem uma nadadeira dorsal e duas nadadeiras pélvicas posteriores (Dammski, *et al.*, 2011).

Os machos de *D. rerio* são alongados, delgados e levemente dourados no abdome e nas nadadeiras peitorais e caudais, com uma linha abdominal completa. Já as fêmeas são maiores e prateadas, apresentam o abdome mais robusto devido à presença de ovos, com uma linha abdominal incompleta (Domingues & Bertoletti, 2006; Dietrich & Krieger, 2009).

Para a reprodução, é necessário separar machos e fêmeas de 7 a 14 dias antes do acasalamento, colocá-los sob luz incidente, com temperatura 1-2°C acima das condições prévias de cultivo (25°C). Após serem colocados, no fim da tarde/noite, os ovos são depositados no início da manhã, sendo este o período ideal para a contagem dos ovos viáveis e não-viáveis. A fêmea produz em média 300 ovos, os quais 70-90% são viáveis. Quando os ovos apresentam uma porção ou inteiramente brancos e opacos, são considerados inviáveis e devem ser retirados para evitar a proliferação de fungos e bactérias entre os demais ovos. Além disto, é necessário colocar um rede ou malha de proteção cerca de 1 cm entre os indivíduos adultos e os ovos, de maneira que, os ovos sejam depositados no fundo do aquário de acasalamento e os peixes adultos não consigam alcançá-los pois é comum que os reprodutores comam seus próprios ovos após a desova (Domingues & Bertoletti, 2006; Laale, 1977).

Na natureza, o peixe paulistinha se alimenta de zooplâncton, insetos, mas, também pode se alimentar de algas, detritos e outras matérias orgânicas. Normalmente encontrado em cardumes de 5-20 indivíduos de ambos os sexos, mesmo quando cultivados em laboratório. Estes organismos estabelecem hierarquias de dominância através da agressão física (observada também durante o acasalamento) ou através de hormônios liberados pelo peixe dominante. Devido a este padrão comportamental, devem ser observados durante o cultivo em laboratório, pois pode gerar estresse aos animais (Dammski, *et al.*, 2011).

Este organismo é mais ativo durante o dia, principalmente nas primeiras horas da manhã. Com intuito de regular processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais, é de extrema importância a regularização de um fotoperíodo quando mantido em biotério (Dammski, *et al.*, 2011).

**Figura 2** - Foto do organismo-teste *D. rerio* (Zebrafish), 3,2 cm de comprimento. Fonte: Acervo pessoal.



O sistema tegumentar é composto de escamas ciclóides para proteção física contra patógenos e para manter a osmorregulação. É classificado como um peixe ósseo e possui aparelho Weberiano, composto de pequenos ossos localizados abaixo do crânio que transmitem sons e vibrações da bexiga natatória para o ouvido interno. O sistema digestivo é composto por boca, faringe, esôfago, intestino e abertura anal (poro urogenital ou proctoderme), papilas gustativas quimiosensoriais, ou seja, auxiliam na decisão das substâncias a serem ingeridas (Dammski, *et al.*, 2011).

O sistema respiratório é composto por brânquias, formadas por quatro pares bilaterais de arcos branquiais, responsáveis pelas trocas gasosas (pela lamela secundária), balanço osmótico, excreção de compostos nitrogenados e manutenção do balanço ácido-básico (Dammski, *et al.*, 2011).

Para o cultivo em laboratório, é importante oferecer proteínas e lipídeos. A alimentação deve oferecer entre 1-5% do peso vivo diariamente, podendo chegar a 10% após a reprodução, pois o processo tem um grande gasto energético. Entretanto, é necessário ser cauteloso com a superalimentação, pois pode levar a morte e também ao comprometimento da qualidade da água caso o alimento não seja consumido imediatamente, sendo então degradados e gerando amônia (Dammiski, *et al.*, 2011). A qualidade da água é essencial para a criação, ou seja, os parâmetros de qualidade devem ser compreendidos. A densidade populacional não deve ser elevada para garantir a saúde, produtividade, desenvolvimento e o bem-estar dos animais.

### 1.3.2 Fígado

O fígado é um órgão anexo do sistema digestório, envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso e modelado que penetra no órgão pela hilo (“porta” do fígado) conduzindo a artéria hepática transporta sangue oxigenado e a veia porta transporta sangue venoso do intestino, pâncreas e baço (rico em nutrientes, hormônio pancreático e produtos da degradação da hemoglobina) (Montanari, 2016).

São encontrados vasos sanguíneos interlobulares, vasos linfáticos e ducto biliar. O ducto biliar é revestido por epitélio e tem como função conduzir a bile produzida por hepatócitos (Montanari, 2016).

Os hepatócitos possuem um núcleo central esférico e eucromático. Estes contêm retículo endoplasmático rugoso e liso e são ricos em mitocôndrias, grânulos de glicogênio e gotículas lipídicas. São células muito ativas metabolicamente. Além de sintetizar a bile, substâncias tóxicas são eliminadas, ocorre o processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no intestino delgado, desintoxicação e a síntese de proteínas plasmáticas da bile (Montanari, 2016).

Os hepatócitos são arredondados, sustentados por cordões hepáticos, possuem um núcleo central com alta basofilia, citoplasma com pequenas vesículas e de característica acidófila. A partir da veia central formam-se capilares sinusóides que mantêm contato direto com os hepatócitos. O citoplasma e o núcleo são homogêneos (Pereira, 2014; Gayão, 2009).

Outras organelas presentes no fígado são: as células estreladas hepáticas (células de Ito) que armazenam vitamina A em gotículas lipídicas e produzem fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, e os macrófagos (células de Kupffer) que fazem parte do

revestimento dos sinusóides e fagocitam hemácias velhas, bactérias, vírus e material particulado presente no sangue (Montanari, 2016).

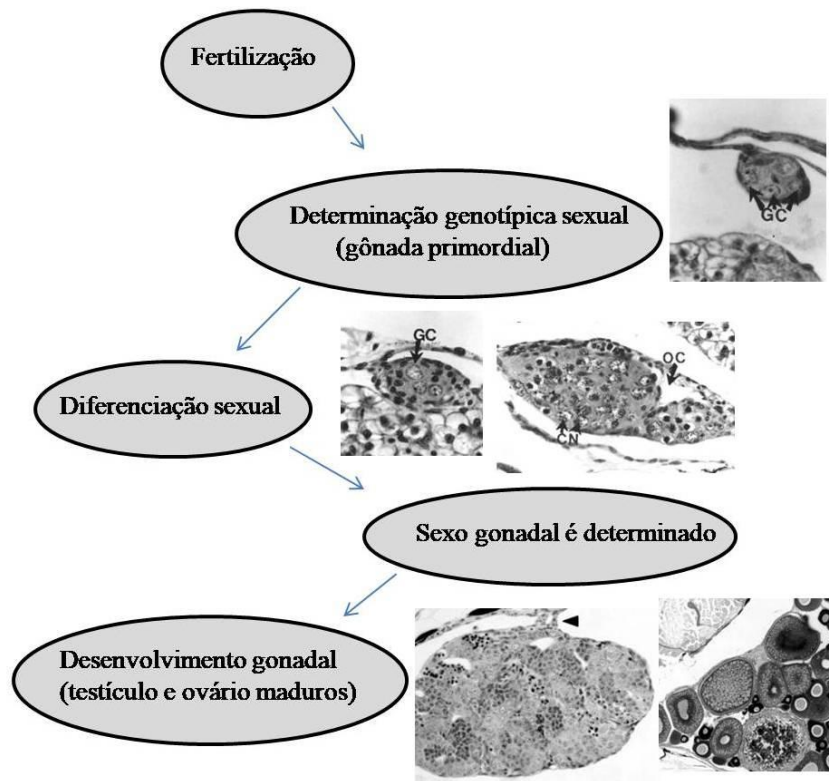
O sangue percorre pelos sinusóides da periferia para o centro dos lóbulos. Os hepatócitos mais periféricos recebem nutrientes, oxigênio e substâncias tóxicas. Na maioria das espécies de teleostes, é dividido em três lóbulos hepáticos. No “zebrafish”, é dividido em lobo direito e esquerdo, posicionado cranioventralmente à bexiga natatória. O parênquima hepático contém duas placas celulares com hepatócitos circundadas por sinusóides e uma face biliar para a excreção. No parênquima hepático há células denominadas melanomacrófagos. Próximo à veia portal, há células do tecido pancreático, formando uma combinação entre estas e as células hepáticas, denominando o tecido conhecido como hepatopâncreas (Rocha *et al.*, 2010; Au, 2004).

Dentre as alterações hepáticas, podem ser destacados os neoplasmas (carcinomas), lesões proliferativa, regeneração hepatocelular, hiperplasia biliar, hepatócitos hipertrofiados, degeneração citoplasmático, núcleo deslocado, agregados de melanomacrófagos vacuolização da bile ou de células hepáticas epiteliais (Myers *et al.*, 1994; Camargo & Martinez, 2007).

### 1.3.3 Gônada

O desenvolvimento gonadal passa primeiramente pela fase de diferenciação sexual. Nesta fase ocorrem eventos que permitem a expressão gênica do fenótipo correspondente. A diferenciação sexual depende não somente de fatores cromossômicos, mas também ambientais e outros mecanismos regulatórios que levam a formação da gônada em testículo ou ovário. O tempo do desenvolvimento depende da espécie, temperatura do ambiente, estresse, disponibilidade de alimento e outros fatores externos (Dietrich & Krieger, 2009).

**Figura 3** - Desenvolvimento gonadal de peixe. GC, células germinativas; OC, células ovarianas. Fonte: Adaptado de Dietrich & Krieger, 2009.



A gônada primordial (Fig 3) é composta de células germinativas, as quais formam posteriormente a ovogônia nos ovários e a espermatogônia nos testículos, e também por células somáticas. Ambas vão proliferar ocasionando o aumento do tecido (Dietrich & Krieger, 2009). Gametogênese é o nome denominado para esse fenômeno biológico de formação dos oócitos secundários e espermatozoides. Esse processo pode ser dividido em três etapas: multiplicação (mitose), crescimento e maturação (meiose) que se diferenciam na formação das gônadas femininas (oogênese) e masculinas (espermatogênese) (Garcia & Fernández, 2012).

No organismo-teste *D. rerio* é possível observar ovários não-funcionais nos primeiro estágio de desenvolvimento do ovócito, que podem diminuir de tamanho, quantidade até que se degeneram (Maack & Segner, 2003; Dietrich & Krieger, 2009). Segundo Dietrich & Krieger

(2009), não há consenso quanto a esta afirmação entre os pesquisadores se este dimorfismo é causado por fatores ambientais ou por polimorfismo genético.

Os peixes possuem ductos que tem como função coletar os gametas e transportá-los para cloaca. Estes são formados diferentemente em machos e fêmeas de acordo com os esteróides sexuais de cada um (Dietrich & Kriger, 2009).

As células germinativas femininas (ovogônias) passam pela fase Fase I, as quais células germinativas jovens (cromatina-nucleolar) são pequenas, possuem núcleo arredondado, basófilo e aparecem agrupadas nas lamelas em regiões vascularizadas, no núcleo há apenas um nucléolo. Podem ser ovogônias ou ovócitos. Na Fase II, os ovócitos do estoque de reserva (perinucleolar) aumentam de volume e começam a dividir. O citoplasma é mais basófilo e definido. O núcleo pode ter 1 ou 2 nucléolos esféricos que começam aumentar de volume e posicionam-se na periferia nuclear. O ovócito perinucleolar é arredondado, porém seu formato pode mudar devido a pressão entre eles. Na fase III, os ovócitos iniciam a vitelogênese, ou seja, o citoplasma acumula substâncias de reserva para posteriormente nutrir o embrião. Há a vacuolização do citoplasma e o núcleo passa a ter vários nucléolos alongados e achatados na periferia do núcleo. Nesta fase surge a membrana vitelina (película acidófila contínua) com células foliculares ao redor, e então é chamado folículo ovocitário. A Fase IV em diante compreende a fase vitelogênica, ou seja, ovócitos com vitelogênese lipídica e protéica aumentam de tamanho e então pressionam os vacúolos para o centro da célula. O núcleo passa a ter contorno irregular e a membrana vitelínica torna-se mais espessa. Posteriormente os ovócitos aumentam de tamanho devido à proliferação dos grânulos do vitelo acidófilo, as vesículas lipídicas não são mais perceptíveis e o ovoplasma aparenta modificado comparado às fases anteriores, são considerados ovócitos com vitelogênese completa, maduros (Fase V). E então os ovócitos são modificados (ovócitos em hialinização) (Vazzoler, 1996).

Em machos, as células germinativas primordiais são derivadas de células do epiblasto através do gonócito que irá formar a espermatogônia (gastrulação). Nas cristas genitais as células primordiais ficam envolvidas pelas células de Sertoli (células somáticas de suporte) e com elas formam os cordões seminíferos onde ficam envolvidas. A partir daí, as células primordiais começam a sofrer mudanças morfológicas e passam a ser chamadas de gonócitos que se proliferam até atingirem a fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular (Garcia & Fernández, 2012).

O primeiro estágio de desenvolvimento de um gameta é a espermatogônia, que é estimulada pelo hormônio folículo estimulante. A espermatogônia é diferenciada de acordo



com a morfologia nuclear e o destino da linhagem espermatogênica. Neste contexto, elas podem ser divididas em espermatogônias A, as quais não têm heterocromatina no núcleo, e espermatogônia B, que contem núcleo central com massa de cromatina intensamente coradas (Garcia & Fernández, 2012).

Aas espermatogônias sofrem mitose no período germinativo e a partir do aumento de tamanho e do conteúdo do citoplasma, origina-se o espermatócito I (primário), que sofrerá meiose I dando origem ao espermatócito II e então passará pela meiose II, originando as espermatídes. As espermatogônias, espermatócitos e as espermatídes ficam envoltas pelo espermatocisto (Garcia & Fernández, 2012).

A próxima etapa do desenvolvimento dos gametas é conhecida como espermiogênese, a qual modificará a espermatíde a espermatozóide (Garcia & Fernández, 2012). Os espermatozoides são as menores células germinativas com cerca de 2  $\mu\text{m}$  (Dietrich & Krieger, 2009; OECD, 2010).

As células de Sertoli são células somáticas desse epitélio que junto com as espermatogônias encontram-se apoiadas à lâmina basal. Espermatócitos mais maduros e espermatídes não tem acesso livre ao líquido intersticial, dessa maneira as células de Sertoli as nutrem com as substâncias do líquido através do transporte pela barreira hematotesticular (Garcia & Fernández, 2012).

Estas células são conhecidas por serem multi-funcionais. São importantes para a diferenciação de células gaméticas, fornecem nutrição e apoio mecânico, produzem uma substância que atua como fator de crescimento dos túbulos seminíferos e também tem como função a fagocitose, manutenção sincrônica dos cistos por meio da retiradas de corpos residuais ou excesso de citoplasma e apresentam receptor para o hormônio folículo estimulante e testosterona. Além de estarem relacionadas a secreção de lipídeos (Garcia & Mitsui, 2002; Fernández, 2012).

Durante o desenvolvimento sexual, formam-se as células intersticiais de Leydig. Estas células estão dispostas individualmente ou em grupo e são produtoras de esteróides. São consideradas glândulas endócrinas difusas originadas do mesênquima, ricas em retículo endoplasmático liso e produzem testosterona (Garcia & Fernández, 2012).

Os hormônios ICLH e FDH são produzidos estimulados pelo GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) produzidos pelo hipotálamo e são importantes para a espermatogênese uma vez que o ICLH estimula as células de Leydig e o FSH estimula as células de Sertoli (Garcia & Fernández, 2012).

Para análise de uma substância como um interferente endócrino, as gônadas são utilizadas devido às alterações histopatológicas na sua estrutura e microestrutura que indicam a possibilidade de ser um IE. No caso dos organismos machos, a identificação é possível pelo aumento/diminuição da proporção das espermatogônias, presença de estrutura ovariana, degeneração e hiperplasia/hipertrofia das células de Leydig. Também podem ser observados como diagnósticos secundários: inflamação granulomatosa, desenvolvimento gonadal assíncrono, estágio de maturação diferente em relação ao organismo-controle e aumento do fluido intersticial. Já nos organismos fêmeas, é possível a identificação de um IE pela atresia dos oócitos, hiperplasia/hipertrofia das células perifolicular, diminuição da vitelogênese e diferença no estágio de maturação. Como diagnóstico secundário, podem ser observadas fibrose intersticial, inflamação granulomatosa e diminuição do folículo pós-ovulatório (OECD, 2009).

**Figura 4** - *D. rerio* visto do microscópio óptico, aumento de 40x. (Coloração HE). GO – Gônada Feminina, F – Fígado, I – Intestino. Fonte: Acervo pessoal.



Diante do exposto, a literatura tem evidenciado que em concentrações na ordem de  $\mu\text{g/L}$  de metais, destacam-se o níquel e o cobre, além de outros compostos orgânicos. Os biomarcadores histológicos de fígado e gônada são ferramentas úteis para análise preditiva, por assegurar a relação direta do estressor ambiental, com atuação no indivíduo ou grupo, a fim de se compreender e restringir usos e riscos para o ambiente aquático, visto que, mesmo metais essenciais como o cobre podem ter efeitos tóxicos se não estiver em concentração adequada aquele organismo. E, no caso do níquel, que é um metal potencialmente tóxico,

mesmo em concentrações permitidas pela legislação podem causar injúrias aos organismos a longo prazo.

Além do mais, no presente estudo é evidenciado o potencial como interferente endócrino desses metais, causando preocupação, pois, os metais por serem bioacumulativos e persistentes, ao serem consumidos, podem acarretar no processo de biomagnificação, ou seja, o acúmulo da substância em outros níveis tróficos e conseqüentemente efeitos diversos e incertos em outros organismos. Portanto, estudos que abordam efeitos desse acúmulo de substâncias potencialmente tóxicas, principalmente a nível celular, são relevantes. Entretanto contribuição científica em relação aos interferentes endócrinos e os impactos causados ainda são escassos e é preciso cooperar com dados suficientes que possam auxiliar em programas de biomonitoramento e legislações que não prejudiquem a vida aquática.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Toxicologia Aquática – Toxicidade crônica de curta duração – método de ensaios com peixes**. Normas ABNT NBR 15499. Rio de Janeiro, 23p., 2015.

ACOSTA, D. S.; DANIELLE, N. M.; ALTENHOFEN, S.; LUZARDO, M. D.; COSTA, P. G.; BIANCHINI, A.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S.; DAFRE, A. L. Copper levels at low levels impairs memory of adult zebrafish (*Danio rerio*) and affects swimming performance of larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 185-186, pp. 122-130, 2016.

ADAMS, W. J. Aquatic Toxicology Testing Methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J. **Handbook of Ecotoxicology**. Florida: CRC Press, 1995, Pp. 25-46.

ALKIMIN, G. D. **Toxicidade de cádmio e zinco em *Danio rerio*: comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquático e a potencial atuação como interferentes endócrinos**. 2016. Dissertação (mestrado em Ciências Ambientais) – UNESP, Sorocaba, São Paulo.

ALSOP, D.; WOOD, C. M. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across multiple metals. **Aquatic Toxicology**, v. 105, pp. 385-393, 2011.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO & BERTOLETTI. **Toxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos – SP: RiMa Editora, 2006, Pp. 117-152.

ATHIKESAVAN, S.; VINCENT, S.; AMBROSE, T.; VELMURUGAN, B. Nickel induced histopathological changes in the different tissues of freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes). **Journal of Environmental Biology**, v. 27, n. 2, pp. 391-395, 2006.

AU, D. W. T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marina pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, pp. 817-834, 2004.

BERTOLETTI, E. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos. CETESB Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo, 2013.

CAZAN, A., KLERKS, P. L. Effects from a short-term exposure to copper or cadmium in gravid females of the livebearer fish (*Gambusiaaffinis*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 199-203, 2015.

CAMARGO, M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, pp. 327-336, 2007.

CETESB (2015). Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo – Parte I (Relatório). Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB, 2016.

CONAMA N°357, 2015. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. **Diário Oficial (República Federativa do Brasil, Brasília, DF n 53.**

CÔRREA, C. E. S. **Aspectos histológicos de gônadas e fígado de *Danio rerio* como potenciais biomarcadores indicativos de atuação de interferentes endócrinos do pesticida Chlorantraniliprole.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – UNESP, Sorocaba, São Paulo.

CRAIG, P. M.; WOOD, C. M.; McCLELLAND, G. B. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **American Journal of Physiology – Regulatory Integrative Comparative Physiology**, vol. 293, n. 5, 2007.

CRISTINA, P.; MARIA, C. U.; CARMEN, V. Endocrine disruptors in the environment and their impact on human health. **Environ. Eng. Manage**, vol. 11, n.9, p. 1697-1706, 2012.

DANG, Z. C.; FLIK, G.; DUCOURET, B.; HOGSTRAND, C.; BONGA, S. E. W.; LOCK, R. A. C. Effects of copper on cortisol receptors and metallothionein expression in gills. **Aquatic Toxicology**, v. 51, pp. 45-54, 2000.

DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R.; GAYA, C.; REGONATO, D. **Zebrafish: Manual de Criação em Biotério.** 1ª Ed. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

DE BOECK, G.; NGO, T. T. H.; CAMPENHOUT, K. V.; BLUST, R. Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**. Vol. 65, pp. 413-424, 2003.

DE BOECK, G.; VAN DER VEN, K.; HATTINK, J.; BLUST, R. Swimming performance and energy metabolism of rainbow trout, common carp and gibel carp respond differently to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, vol. 80, pp. 92-100, 2006.

DELEEBEECK, N. M. E.; SCHAMPHELAERE, K. A. C.; JANSSEN, C. R. A  
bioavailability model predicting the toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)  
and fathead minnow (*Pimephales promelas*) in synthetic and natural waters. **Ecotoxicology  
and Environmental Safety**, v. 67, pp. 1-13, 2007.

DIETRICH, D. R.; KRIEGER, H. O. Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in  
Small Laboratory Fish. USA: Wiley, 319 p., 2009.

DRIESSNACK, M. K.; JAMWAL, A.; NIYOGI, S. Effects of chronic exposure to  
waterborne copper and nickel in binary mixture on tissue-specific metal accumulation and  
reproduction in fathed minnow (*Pimephales promelas*). **Chemosphere**, v. 185, pp. 964-974,  
2017.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos  
Aquáticos. In: ZAGATTO & BERTOLETTI. **Toxicologia Aquática: Princípios e  
Aplicações**. São Carlos – SP: RiMa Editora, 2006, Pp. 155-184.

ESTEVES, F. A.; GUARIENTO, R. D. Elementos-traço. In: ESTEVES, F. A. (coord),  
**Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2011, p. 323-337, Cap. 18.

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; JUNIOR, R. M.  
Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. Review. **Arq. Bras. Endocrinol.  
Metab.** Vol. 54, n. 1, p. 13-14, 2010.

FONSECA, A. R.; FERNANDES, L. F. S.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; MONTEIRO, S. M.; PACHECO, F. A. L. The impact of freshwater metal concentrations on the severity of histopathological changes in fish gills: A statistical perspective. **Science of the Total Environment**, v. 599-600, pp. 217-226, 2017.

FU, Z.; WU, F.; CHEN, L.; XU, B.; FENG, C.; BAI, Y.; LIAO, H.; SUN, S.; GIESY, J. P.; GUO, W. Copper and zinc, but not other priority toxic metals, pose risks to native aquatic species in a large urban lake in Eastern China. **Environmental Pollution**, v. 219, pp. 1069-1076, 2016.

GARCIA, S. M. L.; GARCIA FERNÁNDEZ, C. **Embriologia**, 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

GALLUZZI, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 (Review). **Cell Death and Differentiation**, Macmillan Publishers Limited, v. 19, pp. 107-120, 2012.

GAYÃO, A. L. B. A. **Nutrição e reversão sexual de tilápia do Nilo: parâmetros produtivos e estrutura do fígado**. 2009. 112p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal/Sp. 2009.

GEORGESCU, B. et al. Heavy metals acting as endocrine disruptors. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, vol. 4, n. 2, 2011.



GROSELL, M.; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **Journal of Experimental Biology**, vol., 205, n. 8, p. 1779-1188, 2002.

HANDY, R. D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A** 135, p. 25-38, 2003.

HAUSER-DAVIS, R. A.; BASTOS, F. F.; TUTON, B.; ROCHA, R. C.; PIERRE, T. S.; ZIOLLI, R. L.; ARRUDA, M. A. Z. Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, pp. 70-74, 2014.

HOLLAND, A.; WOOD, C. M.; SMITH, D. S.; CORREIA, T. G. VAL, A. L. Nickel toxicity to cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*) differs seasonally and among the black, White and clear river Waters of the Amazon basin. **Water Research**, v. 123, pp. 21-29, 2017.

HOANG, T. C.; TOMASSO, H. R.; KLAINÉ, S. J. Influence of water quality and age on nickel toxicity to fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology**, v. 23, pp. 86-92, 2004.

IPCS (1998) Copper. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 200).

KABIR, E. R. RAHMAN, M. S, RAHMAN, I.A review on endocrine disruptors and their possible impact on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 40, p. 241-258, 2015.

KIENLE, C.; KÖHLER, H. R.; FILSER, J.; GERHARDT, A. Effects of nickel chloride and oxygen depletion on behaviour and vitality of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) (Pisces, Cypriniformes) embryos and larvae. **Environmental Pollution**, v. 152, pp. 612-620, 2008.

ISMAIL, N. A. H.; WEE, Y. S.; ARIS, A. Z. Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota. **Chemosphere**, v. 188, pp. 375-388, 2017.

LAALE, H. W. The biology and use of zebrafish, *Branchydanio rerio* in fisheries research (review). **Journal of Fish Biology**, v. 10, pp. 121-173, 1977.

LEITE, C. E.; MABONI, L. O.; CRUZ, F. F.; ROSEMBERG, D. B.; ZIMMERMANN, F. F.; PEREIRA, T. C. B.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; CAMPOS, M. M. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, pp. 681-689, 2013.

LUZIO, A.; MONTEIRO, S. M.; FONTAÍNAS-FERNANDES, A. A.; PINTO-CARNIDE, O.; MATOS, M.; COIMBRA, A. M. Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) Gill. **Aquatic Toxicology**. V. 128-129, pp. 183-189, 2013.

MAACK, G.; SEGNER, H. Morphological development of the gonads in the zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Fish Biology**, v. 62, n. 4, pp. 895-906, 2003.

MITSUIKI, D. **Aspectos morfofuncionais das células de Sertoli de peixes teleósteos**. 2002. 47 p. Tese (Mestre em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, UNESP, Jaboticabal /SP. 2002.

MONTEIRO, S. M.; SANTOS, N. M. S.; CALEJO, M.; FONTAINAS-FERNANDES, A. SOUSA, M. Copper toxicity in gills of the teleost fish *Oreochromis niloticus*: Effects in apoptosis induction and cell proliferation. **Aquatic Toxicology**, v. 94, Pp. 219-228, 2009.

MONNERET, C. What is an endocrine disruptor? **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, pp. 403-405, 2017.

MONTANARI, T. **Histologia: Texto atlas e roteiro de aulas práticas**, 3ª Ed. Porto Alegre, 2016.

MYERS, M. S.; STEHR, C. M.; OLSON, O. P.; JOHNSON, L. L.; McCAIN, B. B., CHAN, S.; VARANASI, U. Fish histopathology and Relationships between Toxicopathic lesions and Exposure to Chemical Contaminantes for cycles I to V. NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-6. National benthic surveillance project: pacific coast. Seattle/WA. 1993. National Service for Environmental Publications – NSCEP (1998). **EPA – U. S. Environmental Protection Agency**. Research Plan for Endocrine Disruptors. Office of research and Development (ORD), Washington, DC DC 20460. EPA/600/R-98-97, 55p., 1998.

OECD – Organisation For Economic Co-Operation and Development. **Guidance document on the diagnosis of endocrine-related histopathology in fish gonads**. Series on Testing and Assessment: Testing for Endocrine Disrupters, 114p., N° 123 Paris: OECD, 2010.

OSS, R. N.; KAMPKE, E. H.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C. The effects of subchronic exposure to copper in fat snook. **Aquatic Toxicology**, vol. 177, pp. 441-445, 2016.

PALANIAPPAN, P. R.; KARTHIKEYAN, S. Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and binary solutions with nickel. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, pp. 229-236, 2009.

PALERMO, F. F.; RISSO, W. E.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 116, pp. 19-28, 2015.

PEDROZO, P. R.; LIMA, I. V. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos. **Série Cadernos de Referência Ambiental**, v. 2, Salvador: CRA, 2001.

PEREIRA, B. F. Análise dos efeitos da exposição a ambientes poluídos na morfologia e no envelhecimento precoce, de brânquias e fígado em peixes. 2014. 117p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro/SP.

PETERSON, L. K.; D'AURIA, J. M.; MCKEOWN, B. A.; MOORE, K.; SHUM, M. Copper levels in the muscle and liver tissue of farmed Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. **Aquaculture**, v. 99, pp. 105-115, 1991.

PYLE, G.; COUTURE, P. Nickel. **Homeostasis and Toxicology of Essential Metals**, v. 21A, pp. 253-286, 2012.

RECK, B.; MÜLLER, D. B.; ROSTKOWSKI, K.; GRAEDEL, T. E. Anthropogenic nickel cycle: Insights into use, trade and recycling. **Environmental Science Technology**, v. 42, pp. 3394-3400, 2008.

ROCHA, R. M.; COELHO, R. P.; MONTES, C. S.; SANTOS, S. S. D.; FERREIRA, M. A. P. Avaliação histopatológica do fígado de *Branchyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) da Baía do Guarujá. **Ciência Animal Brasileira** Belém, Pará, v. 11, n. 1, 2010.

ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Meio ambiente e sustentabilidade**. Editora Bookman., 2011.

SANTANA, G. P.; BARRONCAS, P. S. R. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus (AM). **Acta Amaz**, Manaus, v. 37, n. 1, p.111-118, 2007.

SARGENTELLI, V.; MAURO, A. E.; MASSABNI, A. C. Aspectos do Metabolismo do Cobre no Homem. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 290-293, 1995.

SILVA, J. P. **Aspects of endocrine disruptors remediation using in vitro and in vivo ecotoxicological assays**. 2017. Dissertação (Doutorado em Ciências Ambientais) – UNESP, Sorocaba, São Paulo.

TOPAL, A.; ATAMANALP, M.; ORUÇ, E.; EROL, H. S. Physiological and biochemical effects of nickel on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: Assessment of nuclear factor kappa B activation, oxidative stress and histopathological changes. **Chemosphere**, v. 166, pp. 445-452, 2017.

VAZZOLER, A. E. A. M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem; São Paulo SBI, 169p., 1996.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Ambient water quality criteria**. Office of Water, Washington, DC, 1995. 143p., 2017.

World Health Organisation (WHO). **Guidelines for Drinking-water quality**. 4<sup>a</sup>ed. ISBN 978 92 4 1548151.2011.

WHO (2003) Copper in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/88)

ZHENG, G.; LIU, C.; SUN, J.; FENG, Z.; CHENG, C. Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway. **Aquatic Toxicology**, v. 147, pp. 105-111, 2014.

**Toxicidade dos metais Níquel e Cobre e sua possível atuação como interferentes endócrino sob concentrações permitidas pela legislação brasileira através de análise histológica.**

### 1. INTRODUÇÃO

A água é um bem natural e essencial para os organismos aquáticos assim como para todas as formas de vida na terra, seu uso deve ser consciente para garantir as funções biológicas dos organismos. Estudar os efeitos dos poluentes aquáticos é fundamental para assegurar o desenvolvimento sustentável e garantir a homeostase do sistema (Who, 2011; Rosa, 2012).

Atualmente a legislação do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA 430/11 é responsável por regulamentar as condições e padrões de lançamento de efluentes, proibindo concentrações nocivas para todas as formas de vida considerando a classificação dos corpos d'água, mantendo a qualidade ambiental e um meio ambiente ecologicamente equilibrado. Entretanto, nem sempre os valores descritos são seguros aos organismos. Ainda a resolução CONAMA 357/05 classifica os corpos de água em função de usos desejáveis, dentre eles a proteção de vida aquática, considerando-se concentrações máximas de diferentes classes de poluentes permissíveis em tais ambientes, de modo a assegurar o uso pretendido.

O cobre atualmente é utilizado em ligas, canos, fios elétricos, radiadores e automóveis, majoritariamente em atividades de mineração e fundição. O níquel é utilizado na produção de equipamentos, aço inoxidável, materiais de construção, equipamentos médicos, containers, baterias, cerâmicas, jóias e imã (Sargentelli *et al.*, 1995; Pedrozo & Lima, 2001; Reck *et al.*; 2008; Pyle & Couture, 2012).

Topal *et al.* (2017) e Athikesavan *et al.* (2006) notaram alterações nos tecidos do fígado como degeneração das veias sanguíneas, necrose, modificações dos hepatócitos. Além de sinais de estresse oxidativo (Zheng *et al.*, 2014; Topal *et al.*, 2017).

Quanto ao cobre, há mais informações na literatura. Em *Solea senegalensis* (Arellano *et al.*, 1998), *Oncorhynchus mykiss* (Dang *et al.*, 2000), *Oreochromis niloticus* (Monteiro *et al.*, 2009), *Danio rerio* (Luzio *et al.*, 2013, *Luciobartus bocagei* (Fonseca *et al.*, 2017) analisaram

o tecido das brânquias e notaram apoptose, proliferação das células epiteliais, indução da metalotioneína, fusão lamelar, alteração nas células pavimentosas, hiperplasia e necrose.

Arellano, *et al.* (1998) constataram alteração no sinusóide no tecido do fígado, aumento da gotícula lipídica e estagnação sanguínea. Hauser-Davis *et al.* (2014) observaram presença de metalotioneína na bile.

Ambos causam uma série de mudanças na estrutura celular e fisiológica dos peixes e exatamente por isso o CONAMA 357/05 assegura que pode ser lançado 9 µg/L de cobre e 25 µg/L de níquel em rios de Classe 2, para dentre outros usos, proteger a vida aquática.

Muitas vezes as concentrações nominais não são seguras para a vida aquática à longo prazo. Para caracterizar o efeito dos poluentes neste contexto são feitos ensaios ecotoxicológicos crônicos, baseados em respostas biológicas, denominados biomarcadores, que vão determinar possíveis alterações causadas pelas substâncias tóxicas. Uma das maneiras de avaliar as estas respostas pode ser através de alterações histológicas no fígado de peixes teleósteos, por ser um órgão sensível a contaminantes como metais e tendem a acumulá-los em seu interior, fazendo com que as concentrações sejam aumentadas no organismo (Heath, 1995; Sanchez, 2006; Au, 2004). Na revisão feita por Au (2004), foi feito um levantamento da correlação entre lesões no fígado de peixes e químicos contaminantes, incluindo metais.

Biomarcadores do fígado são muito utilizados em testes ecotoxicológicos, por ser um órgão multifuncional e importante para os organismos. Dentre suas funções podemos destacar a digestão e metabolismo, armazenamento, formação da bile, excreção de compostos exógenos tóxicos, síntese do colesterol, secreção, entre outras. É um dos órgãos mais afetados quando os organismos são expostos à contaminantes por ser responsável pela sua desintoxicação. Portanto, é considerado um órgão alvo para diversos estudos de parâmetros ambientais e biológicos (Heath, 1995; Camargo & Martinez, 2007; Gayão, 2009).

Quando peixes são expostos à substâncias tóxicas, é possível observar as seguintes alterações histopatológicas neste órgão: vacuolização citoplasmática, deslocamento nuclear, degeneração, hipertrofia, atrofia, hiperplasia, necrose, polimorfismo nuclear, parênquima heterogêneo, hepatócitos na periferia das células, vesículas no interior do citoplasma, estagnação sanguínea e biliar e desarranjo dos cordões hepáticos (Fontainhas-Fernandes, 2008; Gayão, 2009; Pereira, 2014; Alkimin, 2016; Corrêa, 2016).

Algumas substâncias são capazes de desregular os hormônios naturais em sua ação, produção, liberação, metabolismo e transporte, podendo provocar mudanças nas fases da reprodução, desenvolvimento ou na maneira que os indivíduos respondem ao estresse. Essas



substâncias são chamadas de interferentes endócrinos e esta vertente tem ganhado interesse pelos pesquisadores (Cristina *et al.*, 2012; Kabir, 2015; USEPA, 2017).

Na revisão de Handy (2003), é evidenciado que o cobre é um interferente endócrino do ecossistema aquático. A exposição crônica deste metal envolve ajustes fisiológicos em muitos sistemas corporais. As respostas à exposição podem ser classificadas em três grupos: regulação das enzimas e metabolismo, respostas hematopoiéticas e alterações no tecido celular.

Já o níquel, há poucas evidências que possam comprovar que este é um interferente endócrino por falta de informações nas bases de dados atuais. Porém, há artigos que relatem o retardo no tempo de eclosão dos ovos de *Danio rerio* (Kienle *et al.*, 2008) e em *Pimephales promelas* foi visto alteração na gônada feminina, sendo observado a diminuição da abundância dos folículos vitelogênicos maduros, atresia folicular e diminuição da fecundidade (Driessnack *et al.*, 2017).

Para categorizar uma substância química como interferente endócrino a nível histológico, há protocolos internacionais como da OECD (2010) que auxiliam na análise dos tecidos.

O diagnóstico primário ao analisar gônadas masculinas de peixes incluem: aumento na proporção de espermatogônias, presença de ovário no testículo, aumento da degeneração testicular e hiperplasia/hipertrofia das células de Leydig. E como diagnóstico secundário pode ser observado a diminuição da proporção de espermatogônias, fluido proteico vascular ou intersticial aumentado, desenvolvimento assíncrono da gônada, alterada proporção de espermatozoides ou espermatócitos, diferença de estágio gonadal e inflamação granulomatosa (OECD, 2009).

A agência de proteção ambiental americana (US Environmental Protection agency - EPA) delimita a concentração de 2,0 µg/L para exposição aguda e 1,3 µg/L de cobre dissolvido para exposição crônica para garantir a qualidade da água. Nota-se que o padrão é muito menor do que a legislação brasileira (9 µg/L). Em compensação, o níquel possui valores mais permissíveis na legislação internacional, a qual permite 52 µg/L, enquanto o valor estabelecido pela legislação brasileira é de 25 µg/L. Todas as concentrações citadas acima, são valores subletais, ou seja, não provocam morte aos indivíduos porém podem causar danos em seus sistemas fisiológicos de modo que afete uma população ou comunidade. Portanto, o estudo atual visa avaliar os efeitos tóxicos e de interferência

endócrino dos metais cobre e níquel em concentrações que não afetam visualmente os organismos, mas que possam comprometer a qualidade da vida aquática a longo prazo

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho pretende avaliar, por meio de análise histológica de gônadas e fígado de *Danio rerio*, o potencial ecotoxicológicos dos metais níquel e cobre em concentrações permissíveis pela legislação Brasileira, para proteção da vida aquática e suas possíveis atuações como interferentes endócrinos.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Cultivo e manutenção do organismo-teste**

Adultos de *Danio Rerio* foram mantidos em condições laboratoriais controladas (ABNT, 2015). Manteve-se 1g de peixe por litro de água reconstituída. Utilizou-se água de abastecimento público previamente filtrada em filtros de carvão ativado e por uma tela tipo silkscreen. Essa água foi mantida por aeração para remoção do cloro, por um período de 24h. A dureza foi mantida a 44mg/L CaCO<sub>3</sub>, pH entre 7,3–7,6 e temperatura a 25 ± 1°C. O fotoperíodo foi controlado em 12h de claro e 12h de escuro. Os organismos foram alimentados uma vez ao dia com a ração comercial tetramim® com 97% de proteína bruta. A manutenção da limpeza do aquário foi feita com esponja a cada 15 dias, podendo variar dependendo das condições do aquário, removendo os resíduos decantados. Dentro do aquário continha carvão ativado dentro do filtro, cerâmicas para a formação de biofilme, removedor de amônia e aeração.

### **3.2 Ensaio Experimental**

#### **3.2.1 Teste de toxicidade crônica**

Teste de toxicidade crônica por 21 dias em regime semi-estático, ou seja, com troca total da solução a cada 72h, e alimentação uma vez ao dia seguindo as recomendações da OECD (2010). A concentração utilizada foi baseada na legislação brasileira CONAMA

357/05 (BRASIL, 2005) para rios de Classe 2: 9 µg/L Cu dissolvido e 25µ mg/L Ni total. O controle foi realizado apenas com água de cultivo.

No total foram utilizados 16 indivíduos para as análises (N=16). Foram selecionados 04 organismos aleatorizados (entre machos e fêmeas) expostos a níquel, 04 expostos ao cobre, e 04 organismos controle do ensaio com níquel e 04 organismos controle do ensaio com cobre (mantidos em água de cultivo), pois, os ensaios rodaram separadamente. Para análise das gônadas por método histológico foram selecionados 04 machos expostos ao níquel e 04 controle. Apenas indivíduos machos foram selecionados para posterior comparação da histoquímica (a fim de avaliar produção de VTG), conforme apresentado no capítulo 3 do presente trabalho.

Após o tempo de exposição, foram selecionados organismos-teste aleatoriamente e eutanasiados em freezer com gelo. Posteriormente, foram pesados em balança analítica (Marte – AY220, Brasil) e medidos com o auxílio de um paquímetro de metal (marca mytutoyo) e então foram descartadas as nadadeiras e a cauda e feito um corte na transversal na porção inferior até a altura da cabeça.

Para o processo de fixação histológica, utilizou-se formaldeído 4% dissolvido em água destilada. Foram colocados três organismos de exposição semente por pote âmbar de maneira que fosse mantida a proporção de 10x mais fixador do que tecido e então foram deixados em temperatura ambiente (25°C) durante 18h.

Após este período, os peixes foram retirados dos potes com fixadores e lavados em água corrente por 5 minutos aproximadamente. Após esse procedimento os organismos foram colocados em álcool 70% para aguardar a etapa de processamento do tecido.

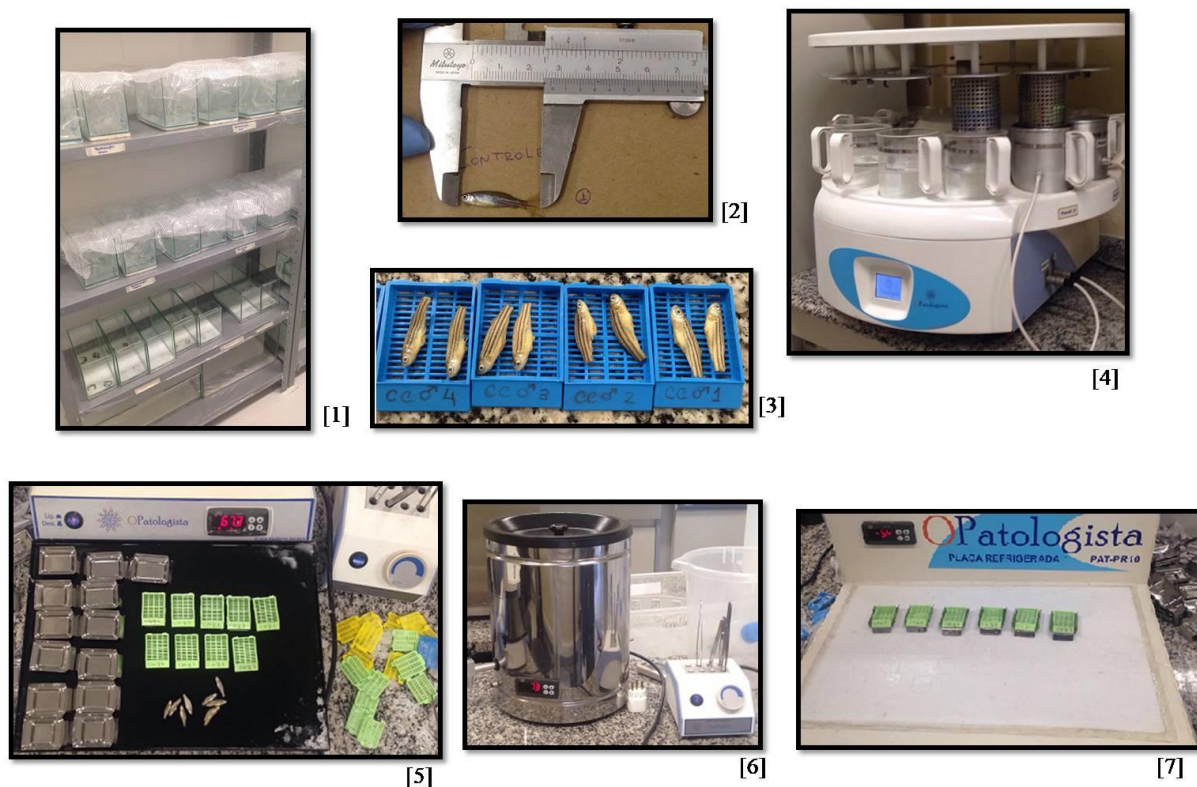
### 3.2.2 Processamento do tecido e inclusão em parafina

Foram colocados dois (02) organismos por cassete para serem dispostos nos cestos do processador de tecidos automático – San Pietro da marca O Patologista, onde passaram por sete (07) submersões em álcool etílico absoluto, três (03) submersões em xilol e duas (02) submersões em parafina histológica. Todos os banhos foram programados para 1h cada.

Ao final do processamento, retiraram-se do cassete os organismos previamente inseridos e foram colocados manualmente na placa aquecedora (PAT-PA10, O patologista, Brasil) a fim de derreter a parafina residual vinda do processador e inserir novamente os indivíduos em parafina de maneira homogênea para melhor disposição dos cortes com o

equipamento micrótomo através de navalhas de aço inoxidável de perfil baixo. Para isso, após a parafina ser derretida na placa aquecedora a 65°C, os organismos foram colocados individualmente em placas de alumínio proporcionais aos seus tamanhos e então o espaço era preenchido com parafina líquida e alocado o cassete na porção superior. Em seguida as placas eram colocadas em cima da placa refrigerada (PAT-PR10, O Patologista, Brasil), a fim de enrijecer a parafina, mantendo o indivíduo estático na placa (Figura 1).

**Figura 1** – Realização dos testes crônicos de 21 com os metais Cobre e Níquel e seqüência histológica para posterior análise dos tecidos. Teste crônico em andamento (1), medição do comprimento dos peixes com paquímetro (2), *Danio rerio* dispostos em cassetes (3), onde permanecem identificados no processador histológico automático (4), placa aquecida para manuseio dos peixes em parafina líquida (5), parafina líquida e porta pinças aquecido (6), placa refrigerada para enrijecimento da parafina, permitindo-se a realização dos cortes (7). Fonte: Acervo pessoal.

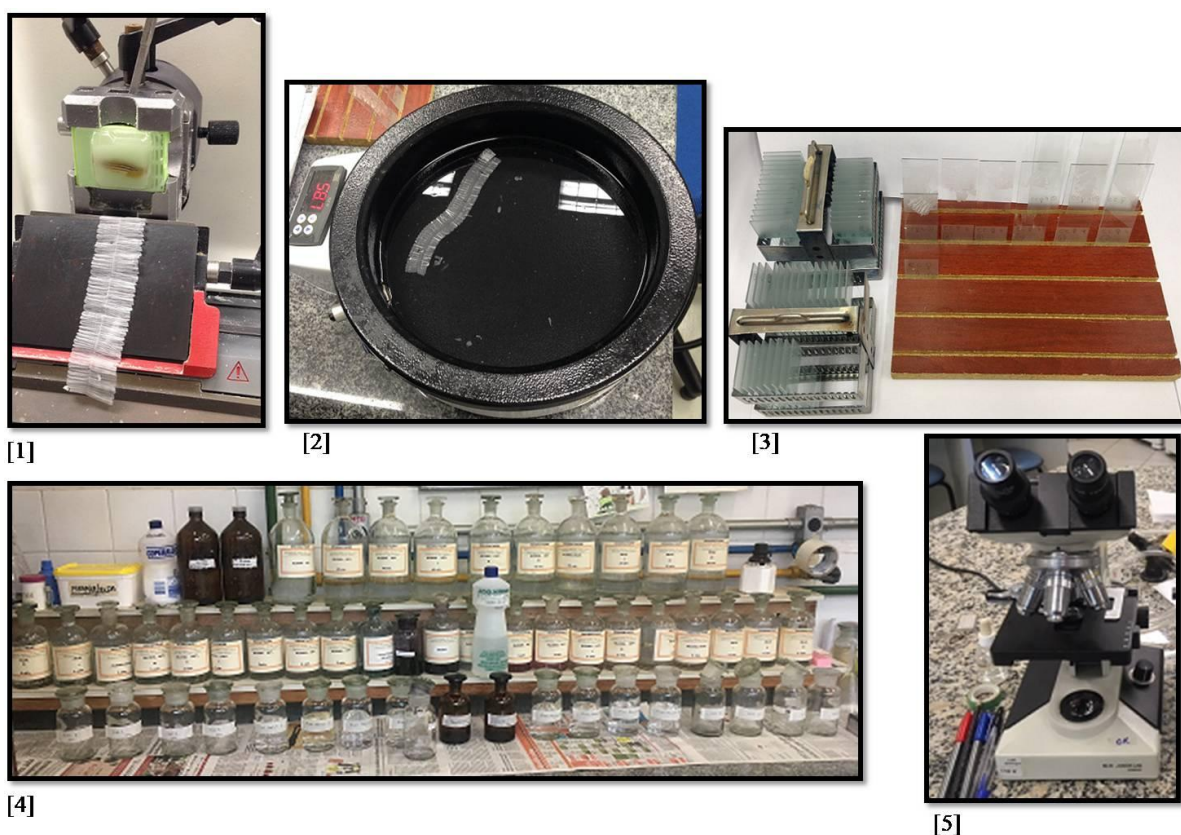


Após a secagem da parafina na placa refrigerada (cerca de 5 minutos), a placa de alumínio foi retirada, restando apenas o peixe incluso em parafina preso ao cassete pronto para ser cortado entre 3-4µm utilizando-se para isso o micrótomo rotativo (MR-2014, O Patologista, Brasil).

Dessa maneira, era formado um filete de parafina que era retirado com auxílio de uma pinça e um pincel e colocado no equipamento de banho histológico digital (BH-16, O

patologista, Brasil) contendo álcool 30% dissolvido em água destilada com o propósito de ajudar a esticar o filete de parafina para ser “pescado” com lâmina (Figura 2). A lâmina era posicionada embaixo do filete a fim de retirá-lo do banho histológico. Adiante, as lâminas eram alinhadas em posição vertical e inseridas na Estufa Microprocessada para Cultura Bacteriológica (SX 1.0 DTMC, marca Sterilifer, Brasil) a 40°C por 24h até o momento do processo de coloração.

**Figura 2** - Teste crônico em andamento. Micrótomo (1), banho histológico (2), lâminas dispostas verticalmente (3), sequencia para coloração H&E (4), microscópio óptico. Fonte: Acervo pessoal.



### 3.2.3 Coloração Histológica

Para o processo de coloração, as lâminas foram mantidas na estufa a 60°C durante cerca de 20 minutos para derreter o excesso de parafina. Após este período, realizaram-se uma

série de submersões manuais para coloração Hematoxilina-Eosina como descritas a seguir. Foram submersos em quatro (04) banhos de xilol durante 3 minutos, quatro banhos de álcool etílico absoluto (1 minuto), lavadas em água corrente, hematoxilina (3 minutos), lavadas em água corrente. Em seguida eram submersas em um reativo diferenciador (280 mL de álcool absoluto e 2 mL de HCl) por 3 segundos, lavadas em água corrente (3 minutos), eosina (4 minutos) e finalmente as lâminas eram submersas novamente em quatro banhos de álcool absoluto e quatro banhos em xilol.

Ao final do processo de coloração, as lâminas foram analisadas no microscópio óptico de luz (MLW – Junior Lab, Germany) e posteriormente foram selecionadas as lâminas para foto no microscópio óptico com captura de imagem (Leica DME) através do software LAS V.3.8.

#### 3.2.4 Análise dos dados

Para a análise histopatológica qualitativa do fígado foram usadas informações baseadas na literatura (Fontainhas-Fernandes, 2008; Gayão, 2009; Pereira, 2014; Corrêa, 2016; Alkimin, 2016). Enquanto para a análise de interferência endócrino foi utilizado o protocolo da OECD para interferentes endócrinos (Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads, Nº 123, 2010) e as alterações descritas no livro “Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in Small Laboratory Fish” (Dietrich & Krieger, 2009). Em ambos, as análises foram baseadas principalmente na característica distinta entre o grupo controle e o tratamento com os metais cobre e níquel.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Tecido hepático após 21 dias de exposição ao Cobre e Níquel

As análises das lâminas de cobre e níquel controle mostraram um padrão normal de distribuição dos hepatócitos. Foi possível observar vasos sanguíneos, células sanguíneas e cordões hepáticos íntegros, núcleo uniforme central com alta basofilia e citoplasma com pequenas vesículas e alta acidofilia, sem sinais de degeneração ou hipertrofia/hiperplasia das células (Figura 3 e 4). Porém, os organismos expostos cronicamente aos metais mostraram alterações histopatológicas similares em ambos os tecidos como pode-se observar na tabela a seguir e nas figuras 5-10.

**Tabela 1.** Respostas morfológicas após exposição crônica em concentração nominal dos metais cobre e níquel.

Organismo	Metal	Concentração	Órgão	Biomarcadores histológicos
<i>Danio rerio</i>	Grupo Controle	0	Fígado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatócitos com núcleo centralizado</li> <li>• Hepatócitos dispostos de maneira uniforme em todo tecido</li> <li>• Núcleo arredondado</li> <li>• Vasos sinusóides</li> <li>• Citoplasma íntegro</li> <li>• Veia com células sanguíneas</li> </ul>
<i>Danio rerio</i>	Níquel	25 µg/L	Fígado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipertrofia do núcleo</li> <li>• Núcleo achatado</li> <li>• Degeneração</li> <li>• Vacuolização</li> <li>• Perda de integridade citoplasmática</li> <li>• Desorganização tecidual</li> <li>• Aumento da frequência dos núcleos picnóticos</li> </ul>
<i>Danio rerio</i>	Cobre	9 µg/L	Fígado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipertrofia do núcleo</li> <li>• Degeneração</li> <li>• Vacuolização</li> <li>• Perda de integridade citoplasmática</li> <li>• Desorganização tecidual</li> <li>• Núcleo não-uniforme</li> <li>• Aumento da frequência dos núcleos picnóticos</li> </ul>

Fonte: Autoria própria

Nota-se a diferença entre os cortes histológicos dos grupos controle e do tratamento com os metais. Ao observar a Figura 3 e 4 (controle), é possível o parênquima íntegro. Ou seja, os hepatócitos estão dispostos de maneira uniforme, sem sinais de vacuolização, com a membrana citoplasmática bem definida. Ao observar a histologia dos cortes para os tratamentos com os metais, nota-se grande vacuolização (Figura 5-10), onde os espaços entre os hepatócitos estão maiores, diferentemente da figura 3 e 4, a qual está quase completamente corada. No caso do cobre, a perda da integridade citoplasmática aparentou ser maior, com mais pontos de vacuolização e grande degeneração em parte do tecido quando comparado ao tecido exposto ao níquel.

Ao observar os núcleos, nos grupos controle, eles estão ao centro do hepatócito e possuem tamanhos muito similares. Já nos grupos do tratamento com metais, em ambos é

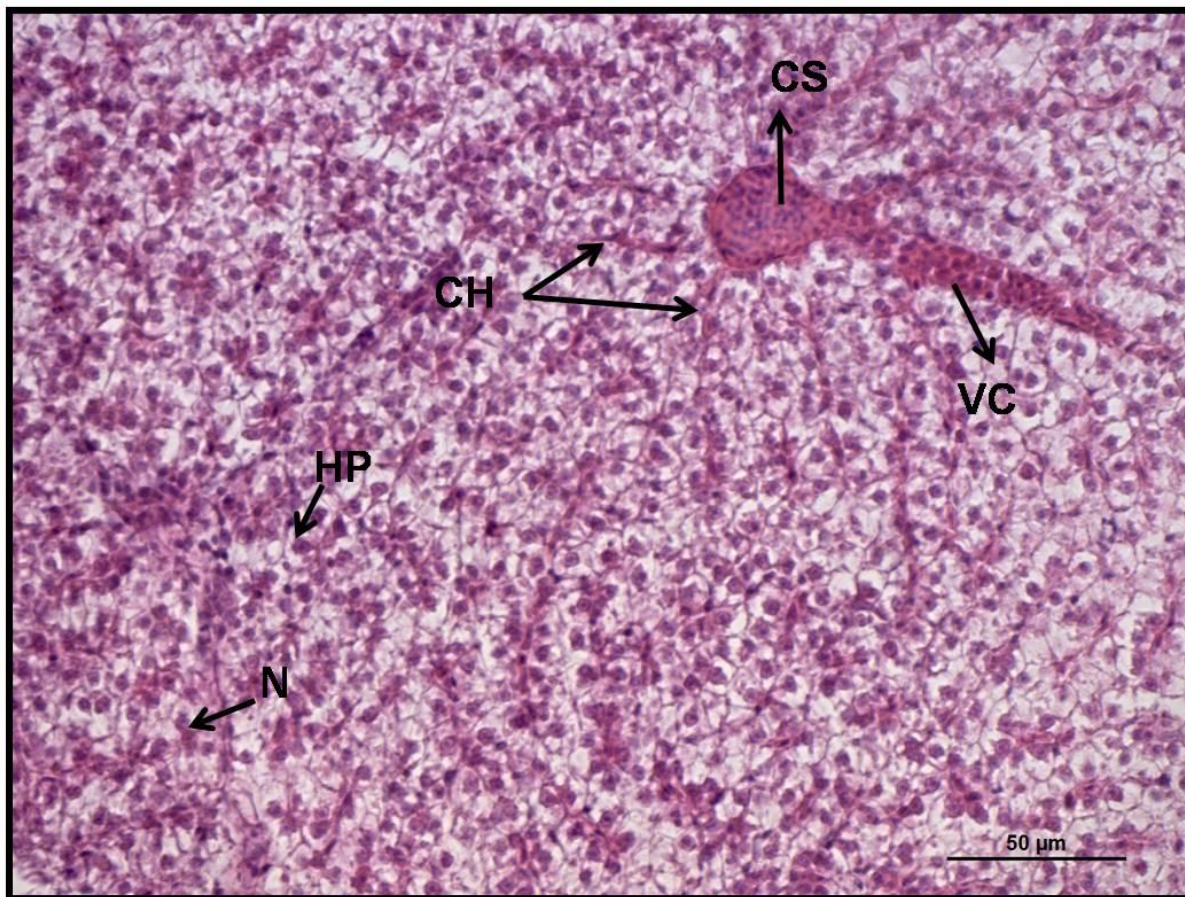
possível notar hipertrofia, quando são maiores do que o padrão e também atrofia, quando o núcleo parece ter diminuído. Em algumas porções das lâminas não é possível ver a presença de núcleo, o que pode indicar um processo de degeneração. Também foram observados núcleos achatados e outros muito escuros, denominados núcleos picnóticos (Figura 6 e 7). A proporção de núcleo picnóticos nos grupos de tratamento com metal, especialmente em níquel onde foi mais evidente, apresentou-se significativamente maior do que no grupo controle.

Na figura 10 é possível constatar estagnação sanguínea nos vasos sanguíneos do tecido hepático. No grupo controle, as células sanguíneas apresentavam-se mais espaçadas, sem acúmulo em uma porção da veia.

Os cordões hepáticos do grupo controle estavam dispostos alinhados e organizados. Já nos tratamentos com metais, nota-se desarranjo dos mesmos.



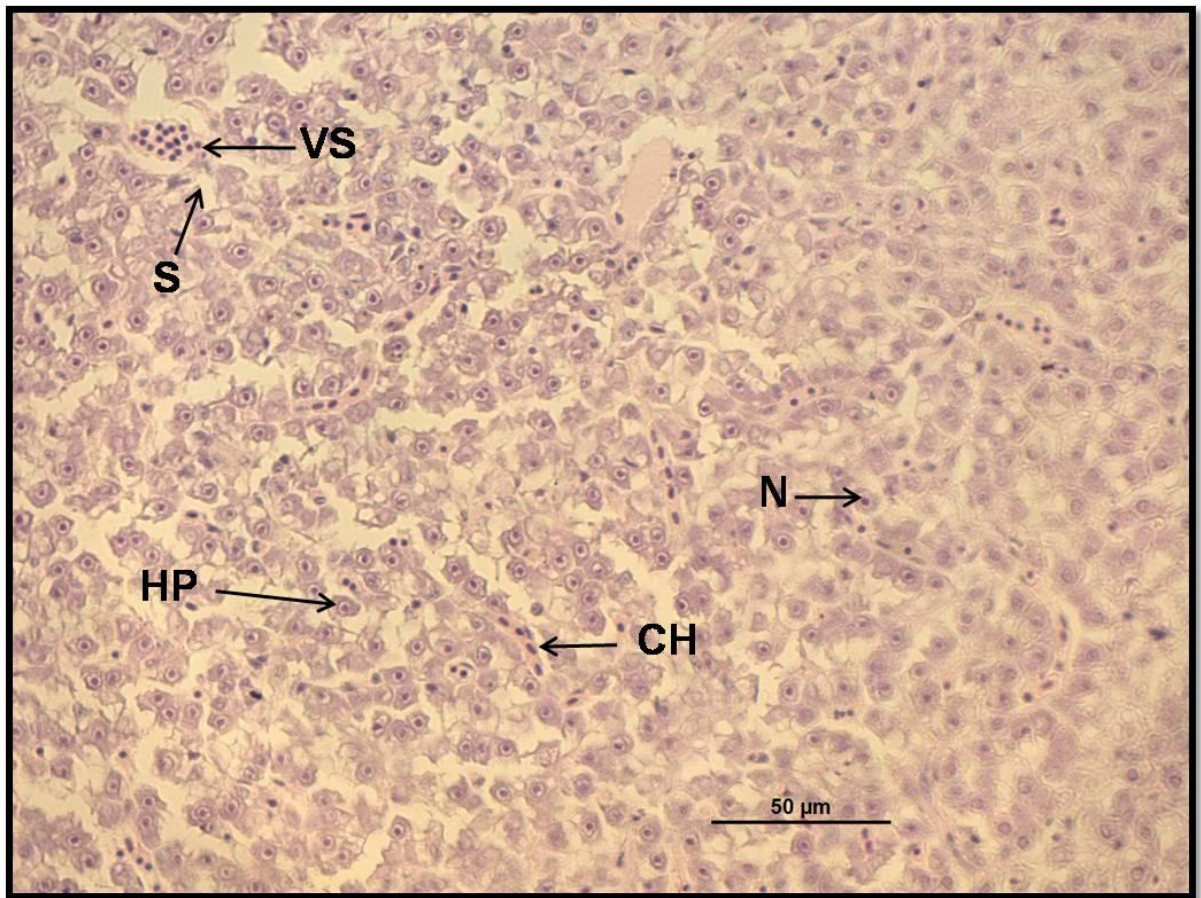
**Figura 3** - Corte histológico de fígado de *Danio rerio* do grupo controle do ensaio com níquel (H&E, 400x), evidenciando a estrutura representativa dos cordões hepáticos, hepatócitos, células sanguíneas, veia central e núcleo.



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: HP – Hepatócitos; CH – Cordão Hepático; CS – Células Sanguíneas; VC – Veia Central; N – Núcleo.

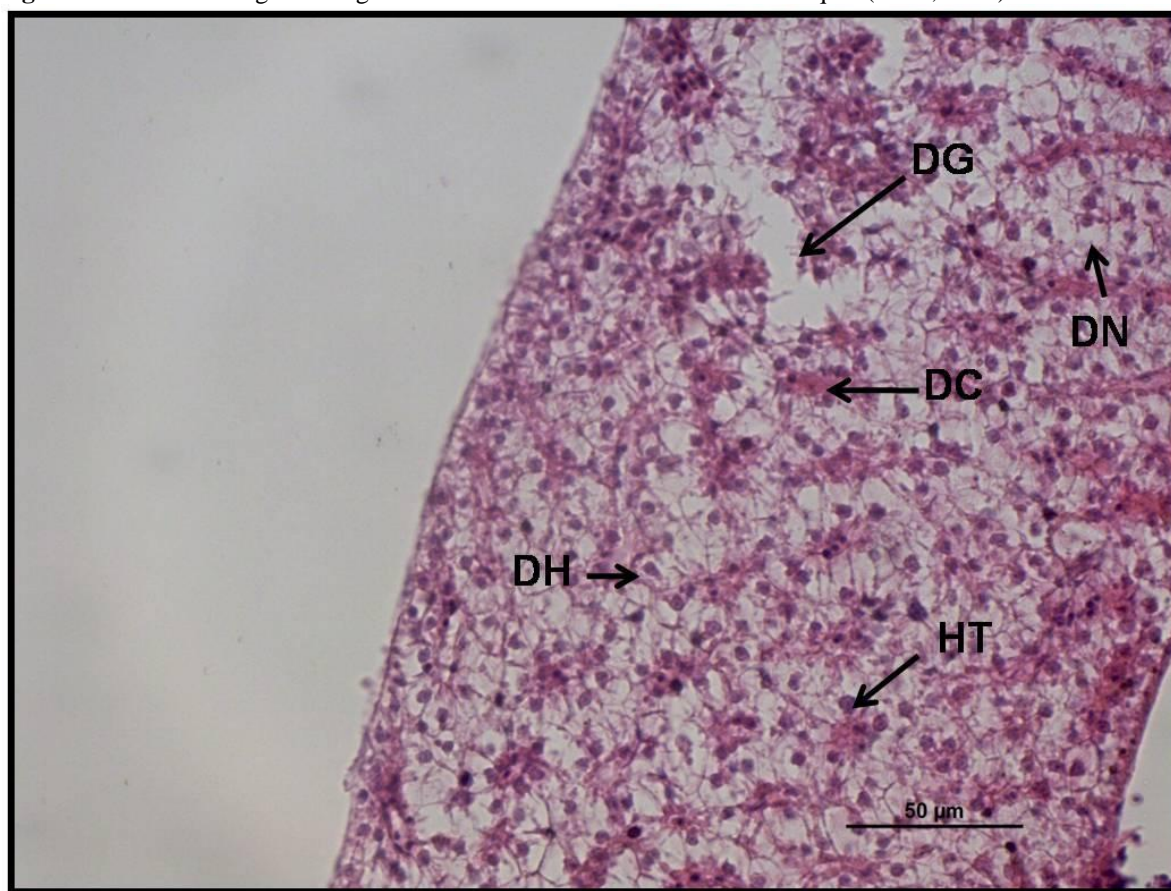
**Figura 4** - Corte histológico de fígado de *Danio rerio* do grupo controle do ensaio com cobre (H&E, 400x), evidenciando estruturas normais de hepatócitos, cordão hepático, células sanguíneas, veia central, núcleo.



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: HP – Hepatócitos; CH – Cordão Hepático; CS – Células Sanguíneas; VC – Veia Central; N – Núcleo.

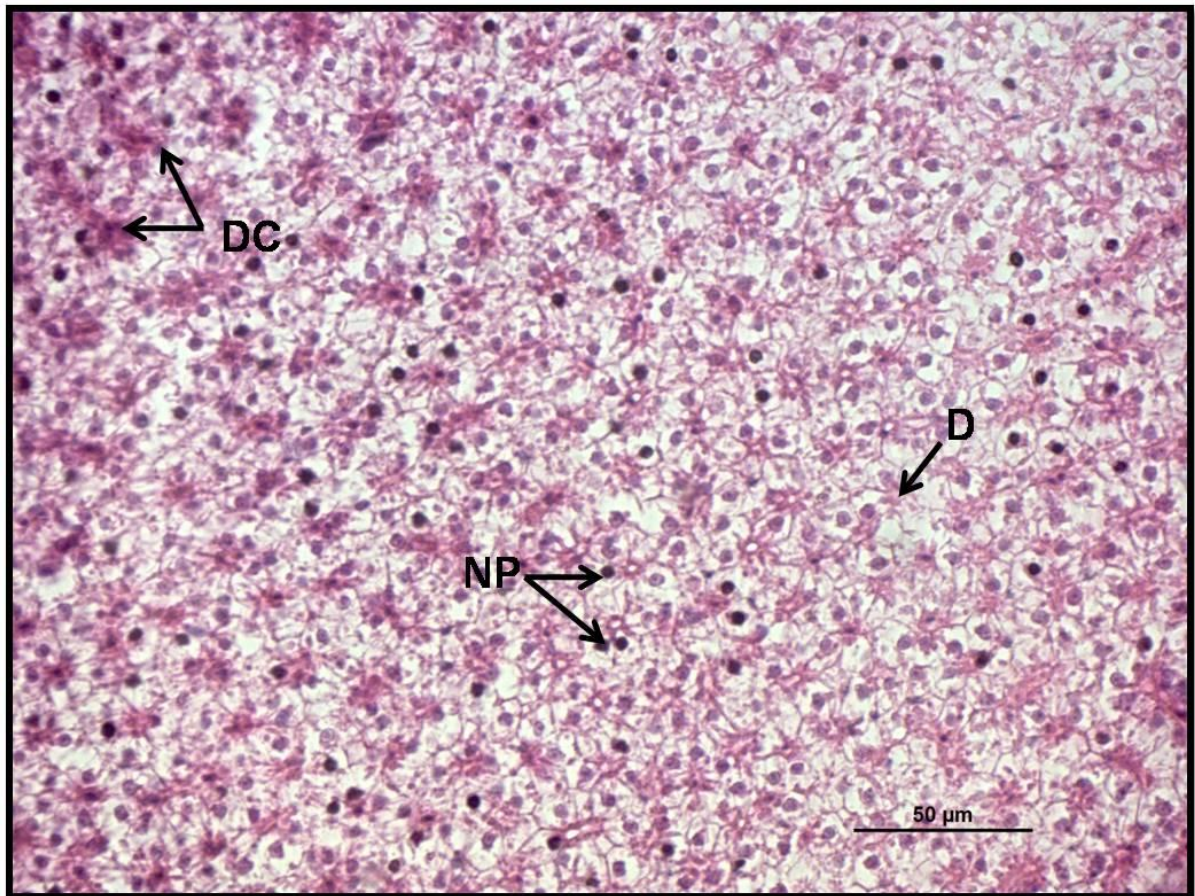
**Figura 5** - Corte histológico de fígado de *Danio rerio* do tratamento com Níquel (H&E, 400x).



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: DG – Degeneração; DN – Deslocamento do núcleo; DC – Desarranjo do cordão hepático; HT – Hipertrofia; DH – Deformação do hepatócito.

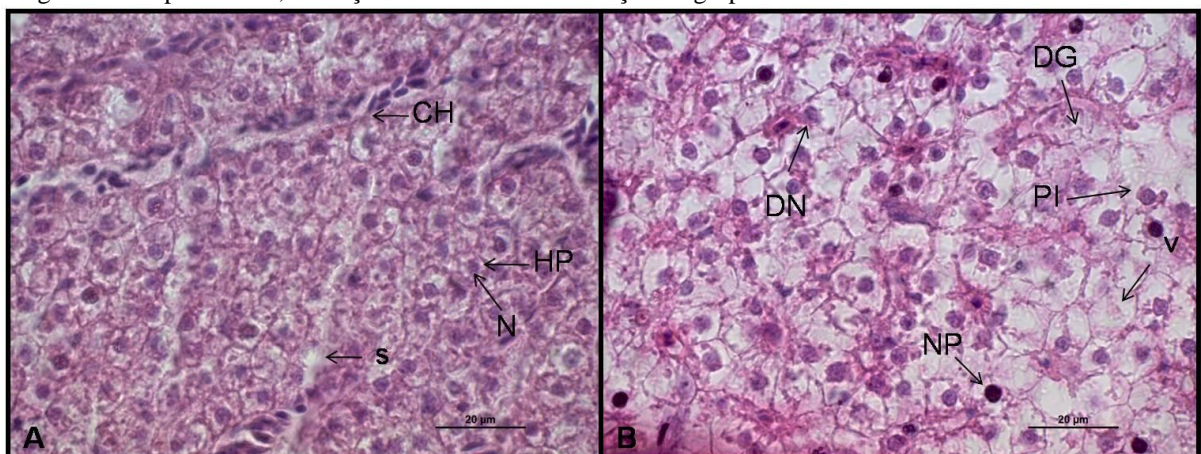
**Figura 6** - Corte histológico de fígado de *Danio rerio* do tratamento com Níquel (H&E, 400x).



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: DC – Desarranjo dos cordões hepáticos; NP – Núcleo picnótico; D – Degeneração

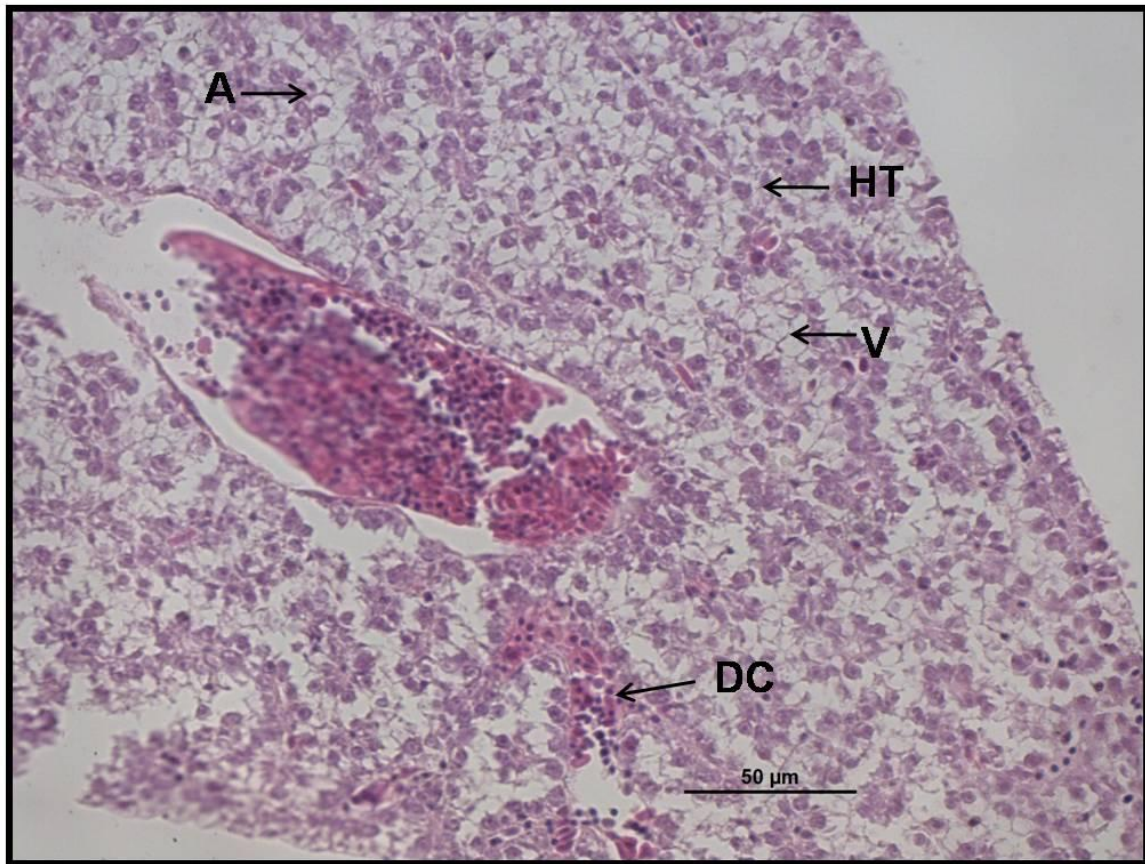
**Figura 7** - Corte histológico comparativo de fígado de *Danio rerio* do grupo controle (A) e tratamento com Níquel (B) (H&E, 1000x), Observando-se na figura B núcleos picnóticos, degeneração, vacuolização e perda da integridade citoplasmática, alterações encontradas em relação ao grupo controle.



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: CH – Cordões Hepáticos; HP – Hepatócitos; NP – Núcleo picnótico; DG – Degeneração; N- Núcleo; S – Sinusóide; V – Vacuolização; PI – Perda da integridade citoplasmática; DN –Deslocamento do núcleo.

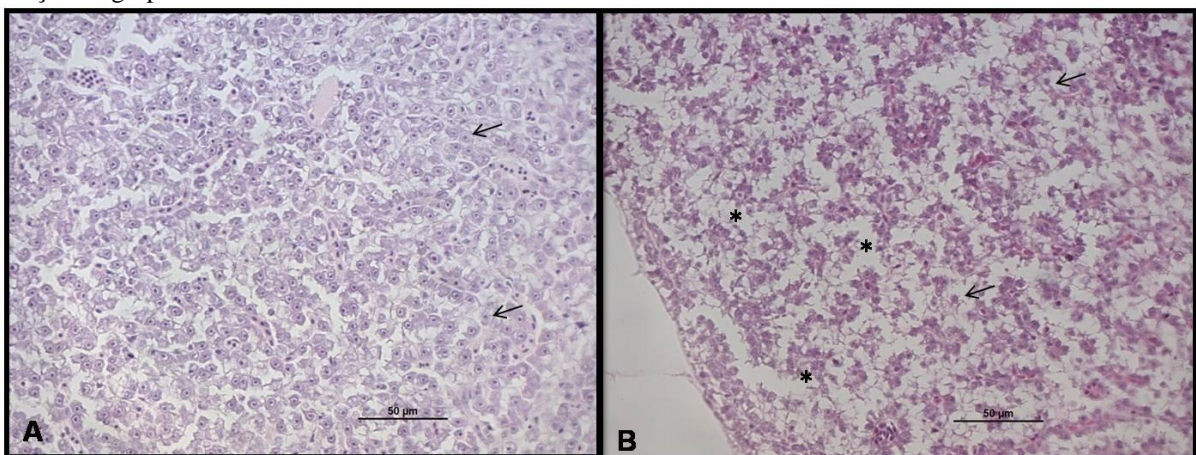
**Figura 8** - Corte histológico de fígado de *Danio rerio* do tratamento com Cobre (H&E, 400x).



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: A – atrofia; HT – Hipertrofia; V – Vacuolização; DC – Desarranjo dos cordões hepáticos.

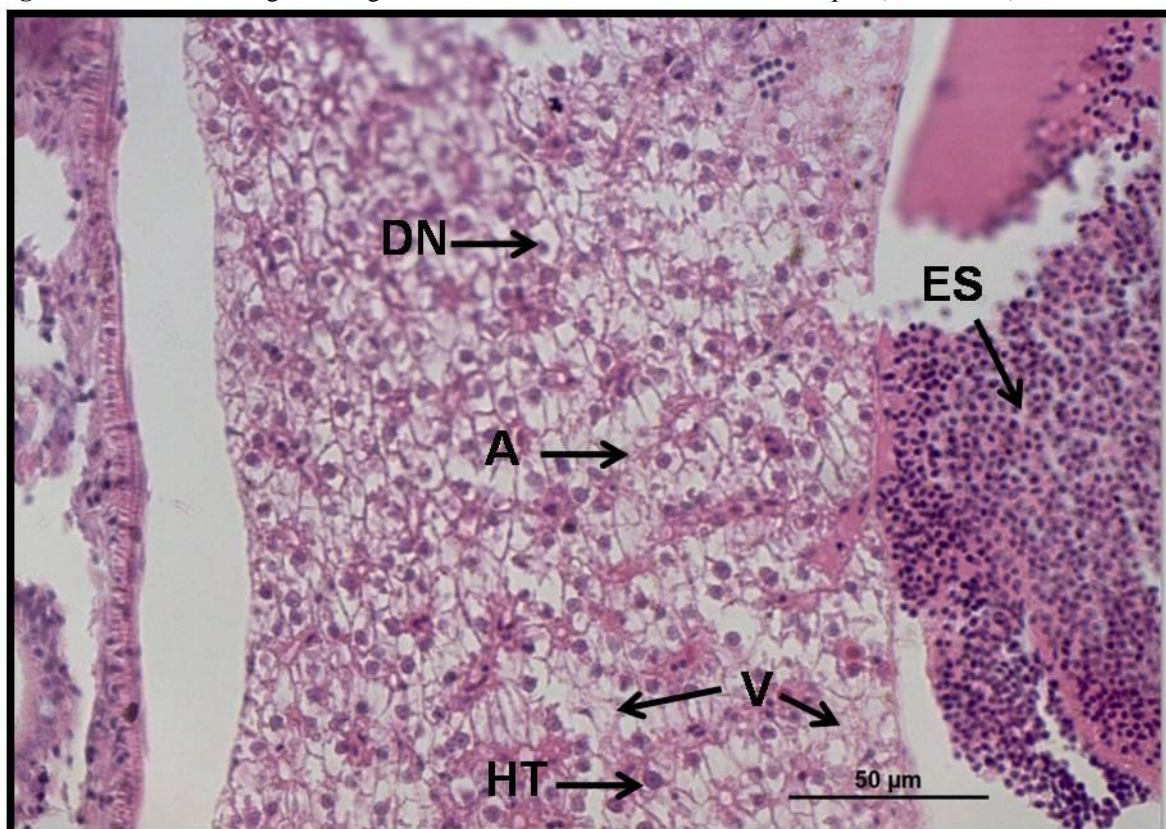
**Figura 9** - Corte histológico comparativo de fígado de *Danio rerio* do grupo controle (A) tratamento com Cobre (B) (H&E, 400x), observando-se sinais de degeneração do tecido e perda da integridade citoplasmática em B, em relação ao grupo controle.



Fonte: Acervo pessoal

Legenda: Em (A) as setas mostram os hepatócitos com estrutura íntegra; em (B) os hepatócitos com perda da integridade citoplasmática, (\*) Degeneração do tecido.

**Figura 10** - Corte histológico de fígado de *Danio rerio* do tratamento com Níquel (H&E, 400x).



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: DN –Deslocamento do núcleo; ES – Estagnação sanguínea; A – Atrofia do hepatócito; V – Vacuolização; HT – Hipertrofia do hepatócito.

#### 4.2 Gônada masculina após 21 dias de exposição ao Níquel

As análises histológicas da gônada masculina do grupo controle mostraram um padrão normal de desenvolvimento, com todas as células germinativas, espermatogônia, espermatócito e espermátides, delimitados pelo espermatocisto.

No grupo controle, era possível observar mais claramente as espermatogônias mais coradas e dispostas aglomeradas. Os espermatócitos, derivados das espermatogônias eram caracterizados por ser menores que as células anteriores e comparativamente, com núcleo mais denso com pouco citoplasma visível. Estas eram as células mais abundantes da gônada masculina. As espermátides também foram vistas, sendo as menores células germinativas observáveis.

A análise histológica do tratamento com níquel detectou um aumento na proporção das espermatogônias quando comparado ao grupo controle (Figura 10).

As alterações foram analisadas e classificadas de acordo com as normas da OECD (Nº123, 2010), como segue a tabela.

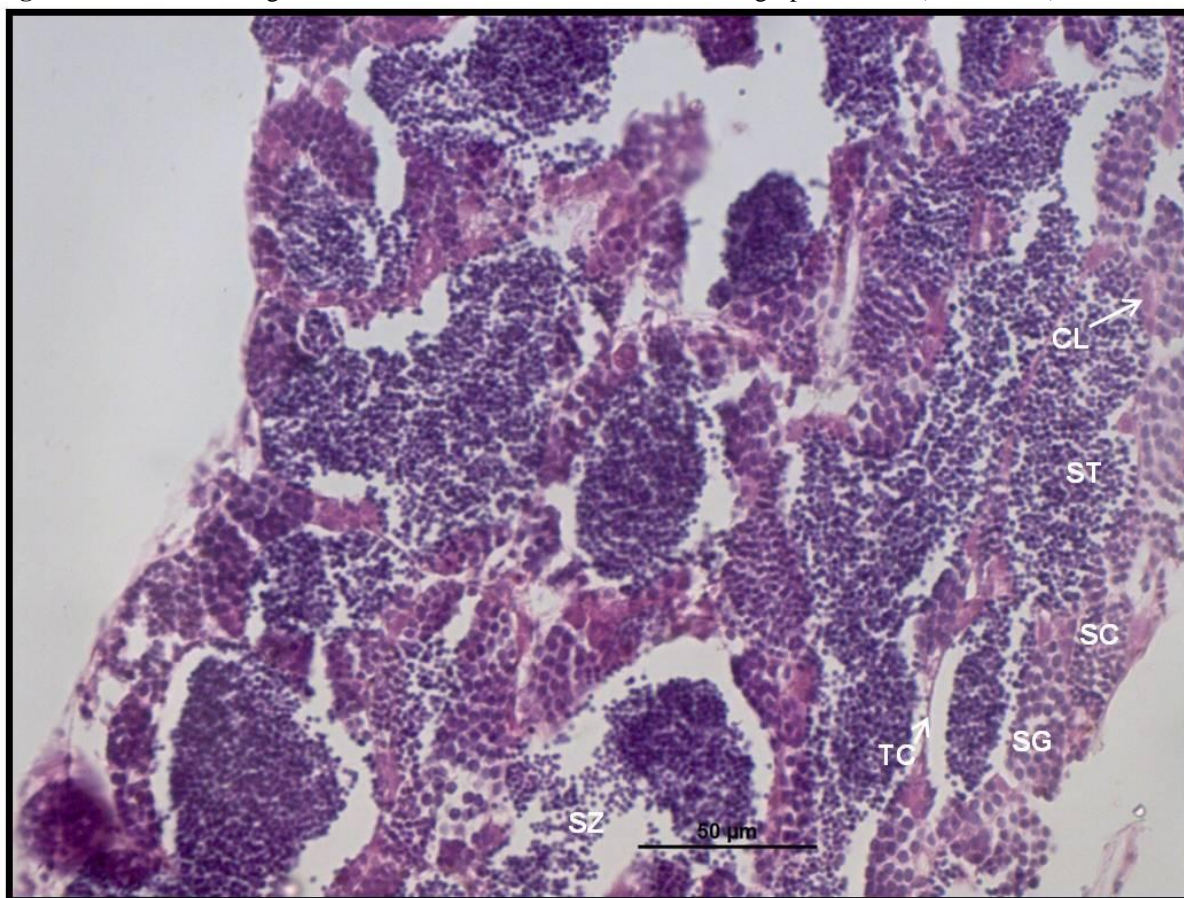
**Tabela 2.** Biomarcadores histológicos de gônadas masculinas de *Danio rerio* e o grau de severidade de acordo com as normas da OECD para interferentes endócrinos (2010).

<b>Diagnóstico primário</b>	<b>Presença/ausência/ não-observável (NO) da alteração (√ / ×NO)</b>	<b>Grau de severidade (I, II, III, IV)</b>
Aumento da proporção de espermatogônias	√	II
Presença de ovário no testículo	×	x
Aumento da degeneração testicular	√	I
Hiperplasia/hipertrofia nas células de Leydig	x	x
<b>Diagnóstico secundário</b>	<b>Presença/ausência da alteração (√/×)</b>	<b>Grau de severidade (I, II, III, IV)</b>
Diminuição da proporção de espermatogônias	×	x
Fluido proteico vascular ou intersticial aumentado	NO	x
Desenvolvimento assíncrono da gônada	√	I
Alterada proporção de espermatozoides ou espermatócitos	√	II
Estágio gonadal	NO	x
Inflamação granulomatosa	NO	x

Legenda: √ - presença; x – ausência, NO – não observável.

Fonte: Autoria própria.

**Figura 11** - Corte histológico da Gônada masculina de *Danio rerio* do grupo controle (H&E, 400x).



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: SG – Espermatogônia; SC – Espermatócito; ST – Espermátide; CL – Células de Leydig; TC – Tecido conjuntivo.



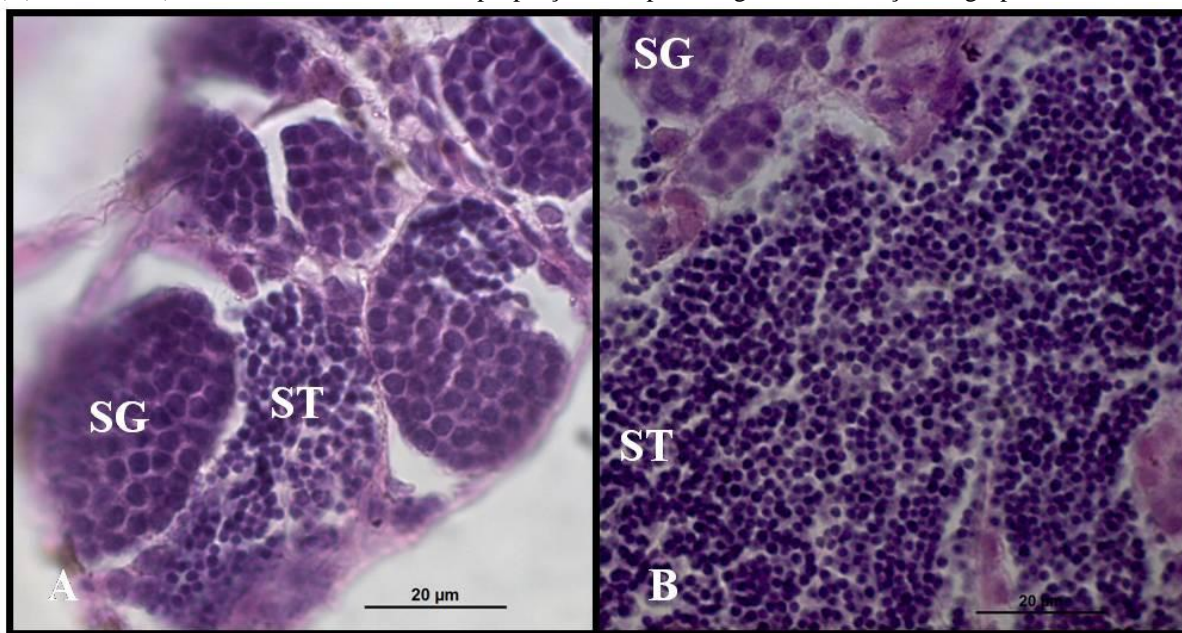
**Figura 12** - Corte histológico da Gônada masculina de *Danio rerio* do tratamento com níquel (H&E, 400x).



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: SG – Espermátogônia; SC – Espermátocito; ST – Espermátide; CL – Células de Leydig.

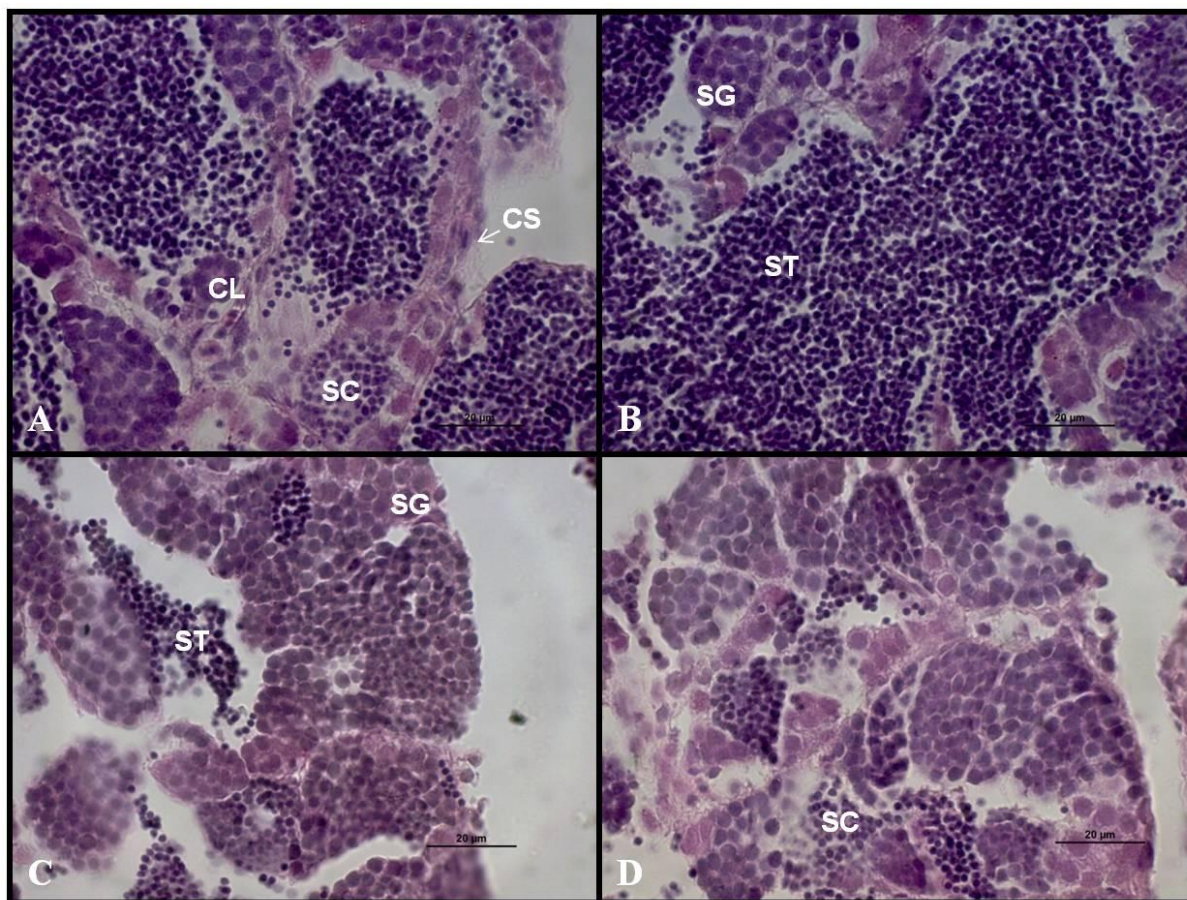
**Figura 13** - Corte histológico da Gônada masculina de *Danio rerio* grupo controle (A) e tratamento com níquel (B) (H&E, 1000x), observando-se aumento na proporção de espermatogônias em relação ao grupo controle.



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: SG – Espermatogônia; ST – Espermatíde.

**Figura14** - Corte histológico da Gônada masculina de *Danio rerio* grupo controle (A e B) e tratamento com níquel (C e D) (H&E, 1000x), destacando-se aumento na proporção de espermatogônias em relação ao grupo controle.



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: SG – Espermatogônia; SC – Espermatócito; ST – Espermátide; CL – Células de Leydig; CS – Células de Sertoli.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Tecido hepático após 21 dias de exposição ao Cobre e Níquel

A análise histopatológica do fígado tem sido utilizada para indicar alterações causadas por estresse ambiental por ser um órgão diretamente relacionado a biotransformação de xenobióticos, excreção de metais traço e o metabolismo de hormônios sexuais (Au, 2004; Fontainhas-Fernandes, 2008; Pereira, 2014).

As características morfológicas dos grupos controle em padrões dentro da normalidade significam que não houve alterações morfológicas nas estruturas do fígado dos grupos controles de ambos os ensaios que pudessem comprometer o órgão a desempenhar sua função.

As alterações encontradas no presente estudo como: parênquima heterogêneo, visto o deslocamento do núcleo, vacuolização e degeneração citoplasmática e nuclear do hepatócito e estagnação sanguínea, corroboram com os estudos relacionados a biomarcadores histopatológicos de substâncias tóxicas em fígado de peixes de diversas espécies como: *Liza saliens* (Fontainhas-Fernandes, 2008), *Oreochromis niloticus* (Gayão, 2009), *Astyanax altiparanae* (Pereira, 2014), *Prochilodus lineatus* (Camargo & Martinez, 2007; Pereira, 2014), e *Danio rerio* (Corrêa, 2016).

As lesões do fígado podem ser classificadas como não-neoplásicas, as quais são indícios iniciais de toxicidade causada por agentes tóxicos, como as alterações encontradas no presente estudo e neoplásicas como adenoma hepatocelular, relacionado a tumores cancerígenos (Fontainhas-Fernandes, 2008).

A acumulação de lipídeos nos hepatócitos em peixes expostos a metais indicam a exposição a componentes tóxicos que ocasionam injúria no fígado. A vacuolização pode aumentar o volume dos hepatócitos e indicar uma alta concentração de lipídeos e glicogênio que prejudicam a atividade metabólica do órgão, demonstrando sinal de um processo de degeneração que sugere dano metabólico. O glicogênio é responsável por agir como uma reserva de glicose para suprir altas demandas energéticas como no caso de estresse provocado por fatores externos. (Camargo & Martinez, 2007; Fontainhas-Fernandes, 2008; Gayão, 2009).

A necrose, a hiperplasia e a vacuolização são respostas a ambientes severamente contaminados por metais (Au, 2008). Os pontos de necrose podem ser biomarcadores de exposição crônica em peixes (Fontainhas-Fernandes, 2008).

No presente estudo não foi possível observar sinais de estagnação da bile ou aumento de melanomacrófagos que poderiam significar importantes lesões relacionadas ao processo degenerativo e necrose, uma vez que a bile não estaria sendo liberada do fígado e os melanomacrófagos não poderiam desempenhar sua função antioxidante (Camargo & Martinez, 2007).

Nos estudos de Fontainhas-Fernandes (2008) foi visto que o parênquima estava heterogêneo, assim como observado no presente estudo, provavelmente devido à exposição aos metais Cu e Zn, encontrados em concentrações de 51- 546 mg Kg<sup>-1</sup> e 26-190 mg Kg<sup>-1</sup> respectivamente.

Paris-Palacios *et al.* (2000) avaliaram perturbações causadas por cobre no organismo-teste *Danio rerio* submetido a teste crônico em concentrações subletais (40 e 140 µg). Como

no presente estudo, foram observadas alterações nos hepatócitos como atrofia do núcleo ou núcleos picnóticos (demasiada condensação da cromatina nuclear, fase anterior a morte celular), sinais de degeneração ao longo do parênquima, além de perturbações bioquímicas estudadas pelo autor. Vale a pena ressaltar que neste estudo, os organismos expostos ao cobre foram posteriormente submetidos por um período de depuração por 14 dias com água limpa para ver possíveis sinais de recuperação, porém, não foi observada reversão às alterações encontradas.

Há menos informações disponíveis a respeito do efeito tóxico do níquel em peixes em relação ao cobre. Entretanto, Kienle *et al.* (2008) observou em *Danio rerio* (larva e embrião) a diminuição da atividade locomotora, retardo no tempo de eclosão e mortalidade quando expostos a valores de 7,5 -15 mg/L de Níquel. O autor confirma ter provocado efeito na reprodução desse organismo enquanto no atual trabalho, é verificada alterações a nível celular que indicam afetar a capacidade reprodutiva da espécie.

Topal *et al.* (2017), assim como no presente estudo, observou alteração nos hepatócitos e sinais de degeneração no fígado de *Oncorhynchus mykiss* quando expostos a 1-2 mg/L e Athikesavan *et al.* (2006) observou sinais de necrose e degeneração das veias sanguíneas em *Hypophthalmichthys molitrix* expostos a 5-7 mg/L. Ambos contribuem para as informações a respeito do potencial tóxico do níquel, contribuindo com os achados deste estudo.

O fígado não é o único órgão afetado pelos metais. Athikesavan (2006), Topal *et al.* (2017) também observaram alterações nas brânquias de peixes ocasionadas por exposição ao Níquel. De maneira similar, Monteiro *et al.* (2009) em *Oreochromis niloticus*, Luzio *et al.* (2013) em *Danio rerio*, Fonseca (2017) em *Luciobartus bocagei*, *Pseudochondrostoma sp.*, *Oncorhynchus mykiss* notaram alterações nas brânquias causadas por exposição ao cobre.

O fígado é responsável por funções essenciais no organismo como digestão e metabolismo de carboidratos (possuem enzimas sensíveis a poluentes). Um dos fatores importantes é a produção de altas quantidades de amônia proveniente da desaminação dos aminoácidos; armazenamento de lipídeos e glicogênio, que são importantes em situação de estresse; formação da bile, que é responsável pelos sais biliares necessários para digestão de gorduras, pigmentos biliares responsáveis pela quebra de produtos da hemoglobina, xenobioticos (especialmente metais) removidos do sangue; síntese de proteínas plasmáticas, como fibrogenos (coagulação sanguínea) e albumina (mantém pressão osmótica do plasma, fonte de aminoácido, transporte de moléculas; síntese do colesterol, estabilizador de

membranas celulares, lipoproteínas plasmáticas e mielina no sistema nervoso; secreção pancreática de enzimas digestivas e metabolismo de hormônios (Heath, 1995). Portanto, alterações morfológicas no tecido hepático podem afetar significativamente seu funcionamento e conseqüentemente danificando o metabolismo vital de um organismo.

## **5.2 Tecido gonadal masculino após 21 dias de exposição ao Níquel**

As análises histológicas do tratamento com níquel em comparação ao controle mostraram um aumento na proporção das espermatogônias levando, portanto ao desenvolvimento assíncrono da gônada, porém com predomínio de uma das fases. Notou-se aumento da degeneração do tecido gonadal e alterada proporção de espermátides, sendo uma quantidade menor em relação ao grupo controle. De acordo com o documento da OECD “Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads” (2009), essas características enquadram o metal estudado como um interferente endócrino.

O aumento da proporção das espermatogônias pode significar que o organismo não está conseguindo desenvolvê-las em espermátócitos, o que possivelmente afeta o potencial reprodutivo da espécie.

As degenerações podem ser aumentadas de acordo com o tempo de exposição e podem ser revertidas em alguns casos. No presente estudo, não foi feito estudo de reversibilidade biológica para ver o tempo de recuperação biológica desses indivíduos (Goher *et al.*, 2014) e nesse sentido as gônadas são de extrema importância porque asseguram a perpetuação das espécies.

Há poucos dados na literatura que relatem os efeitos dos contaminantes como interferentes endócrinos. Kienle *et al.* (2008), estudou o organismo-teste *Danio rerio* sob concentração de 7,5 – 15 mg/L de níquel e notou o retardo no tempo de eclosão dos ovos, além do aumento na mortalidade.

Apesar de poucos dados na literatura sobre alterações histopatológicas causadas pelo níquel em gônadas, há relatos de outros metais como interferentes endócrinos. Alkimin (2016) estudou os efeitos dos metais Cádmio (0,25 e 1 µg/L) e Zinco (120 e 180 µg/L) em *Danio rerio* e observaram alterações que podem comprometer a capacidade reprodutiva da espécie em fêmeas. Entretanto, os sinais de degeneração encontrados em machos não eram significativos para comprometer a espécie. Entretanto, Shalaby *et al.* (2012), observaram

alterações no epitélio germinativo, diminuição das espermatídes e de espermatozóides em *Oreochromis niloticus* expostos ao cádmio em concentrações entre 1-3µg/L

As alterações encontradas no epitélio germinativo de machos que definem uma substância como interferente endócrino pode levar a consequências na reprodução de um organismo, atrapalhando a perpetuação da espécie e por isso este tipo de contaminante deve ser estudado (Monneret, 2017). Há poucas informações na literatura sobre o efeito do níquel sobre os organismos aquáticos nesta vertente.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto concluí-se que o presente estudo sugere que as concentrações dos metais estudadas e permitidas para a proteção da vida aquática (níquel – 25µg/L e cobre - 9 µg/L) apresentam efeitos tóxico considerando-se os biomarcadores histológicos de fígado e gônadas masculinas da espécie de peixe *Danio rerio*.

O níquel é um metal que possivelmente pode ser classificado como interferente endócrino por ter provocado aumento da proporção das espermatogônias mesmo em concentrações permitidas pela legislação em machos de *Danio rerio*.

A gônada masculina apresentou-se ter bons biomarcadores que evidenciam a atuação endócrina do níquel na espécie de peixe *Danio rerio*

### Considerações finais

Futuramente, seria interessante análise do glicogênio para observar mais evidências de estresse e análise de alterações nas gônadas femininas da espécie.

As respostas histológicas são ferramentas de relativamente fácil de identificação, baixo custo em relação aos demais biomarcadores e há protocolos que permitem a reprodutibilidade pelos demais pesquisadores e garantem a relação entre lesões e contaminantes específicos, complementando estudos a respeito do potencial efeito tóxico e hormonal de xenobióticos e devem ser contempladas nas análises de risco e tomada de decisões sobre concentrações tóxicas e permissividade para múltiplos usos, considerando-se diferentes classes de xenobióticos.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKIMIN, G. D. **Toxicidade de Cádmio e Zinco em *Danio rerio*: Comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática e a potencial atuação como interferentes endócrinos**, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – UNESP, Sorocaba.

ATHIKESAVAN, S.; VINCENT, S.; AMBROSE, T.; VELMURUGAN, B. Nickel induced histopathological changes in the different tissues of freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes). **Journal of Environmental Biology**, v. 27, n. 2, pp. 391-395, 2006.

ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n.1, pp. 62-72, 1999.

AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marina pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, pp. 817- 834, 2004.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of Neotropical fish caged in na urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, pp. 327-336, 2007.

CORRÊA, C. E. S. **Aspectos histológicos de gônadas e fígado de *Danio rerio* como potenciais biomarcadores indicativos de atuação de interferentes endócrinos do**



**pesticida Chlorantraniliprole.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – UNESP, Sorocaba.

CRISTINA, P.; MARIA, C. U.; CARMEN, V. Endocrine disruptors in the environment and their impact on human health. **Environ. Eng. Manage**, vol. 11, n.9, p. 1697-1706, 2012.

CONAMA N°357, 2015. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. **Diário Oficial (República Federativa do Brasil, Brasília, DF n 53.**

DANG, Z. C.; FLIK, G.; DUCOURET, B.; HOGSTRAND, C.; BONGA, S. E. W.; LOCK, R. A. C. Effects of copper on cortisol receptors and metallothionein expression in gills. **Aquatic Toxicology**, v. 51, pp. 45-54, 2000.

DRIESSNACK, M. K.; JAMWAL, A.; NIYOGI, S. Effects of chronic exposure to waterborne copper and nickel in binary mixture on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fished minnow (*Pimephales promelas*). **Chemosphere**, v. 185, pp. 964-974, 2017.

FONSECA, A. R.; FERNANDES, L. F. S.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; MONTEIRO, S. M.; PACHECO, F. A. L. The impact of freshwater metal concentrations on the severity of histopathological changes in fish gills: A statistical perspective. **Science of the Total Environment**, v. 599-600, pp. 217-226, 2017.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; FERNANDES, C.; ROCHA, E.; SALGADO, M. A.

Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. **Environmental. Monit. Assess**, v. 145, PP. 315-322, 2008.

GAYÃO, A. L. B. A. **Nutrição e reversão sexual de Tilápia do Nilo: Parâmetros produtivos e estrutura do fígado**. 2009. Dissertação (Doutorado em Aqüicultura) – UNESP, Jaboticabal.

GOHER, M.; HASSAN, A. M.; ABDEL-MONIEM, I. A.; FAHMY, A. H.; EL-SAYED, S. Evaluation of surface water quality and heavy metal indices of Ismailia Canal, Nile River, Egypt. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 40, n. 3, pp. 225-233, 2014.

HANDY, R. D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A** 135, p. 25-38, 2003.

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2<sup>a</sup> ed. Florida: CRC Press. Lewis Publishers. 1995.

KABIR, E. R. RAHMAN, M. S, RAHMAN, I.A review on endocrine disruptors and their possible impact on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 40, p. 241-258, 2015.

KIENLE, C.; KÖHLER, H. R.; FILSER, J.; GERHARDT, A. Effects of nickel chloride and oxygen depletion on behaviour and vitality of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)

(Pisces, Cypriniformes) embryos and larvae. **Environmental Pollution**, v. 152, pp. 612-620, 2008.

LUZIO, A.; MONTEIRO, S. M.; FONTAÍNAS-FERNANDES, A. A.; PINTO-CARNIDE, O.; MATOS, M.; COIMBRA, A. M. Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) Gill. **Aquatic Toxicology**. V. 128-129, pp. 183-189, 2013.

MONTEIRO, S. M.; SANTOS, N. M. S.; CALEJO, M.; FONTAINAS-FERNANDES, A. SOUSA, M. Copper toxicity in gills of the teleost fish *Oreochromis niloticus*: Effects in apoptosis induction and cell proliferation. **Aquatic Toxicology**, v. 94, Pp. 219-228, 2009.

MONNERET, C. What is an endocrine disruptor? **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, pp. 403-405, 2017.

PALANIAPPAN, P. R.; KARTHIKEYAN, S. Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and binary solutions with nickel. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, pp. 229-236, 2009.

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

PALERMO, F. F.; RISSO, W. E.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the

neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 116, pp. 19-28, 2015.

PEREIRA, B. F. **Análise dos efeitos da exposição a ambientes poluídos na morfologia e no envelhecimento precoce, de brânquias e fígado em peixes**. 2014. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – UNESP, Rio Claro.

PYLE, G.; COUTURE, P. Nickel. **Homeostasis and Toxicology of Essential Metals**, v. 21A, pp. 253-286, 2012.

RECK, B.; MÜLLER, D. B.; ROSTKOWSKI, K.; GRAEDEL, T. E. Anthropogenic nickel cycle: Insights into use, trade and recycling. **Environmental Science Technology**, v. 42, pp. 3394-3400, 2008.

ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Meio ambiente e sustentabilidade**. Editora Bookman., 2011.

SHALABY, F. M.; MIGEED, ABD-EL MIGEED, H. Impact of environmental contaminants on the testes of *Oreochromis niloticus* with special reference to ultrastructure of spermatozoa in Lake Manzala (Egypt). **J Environ Anal Toxicology**, v.2, n. 6; 2012.

SARGENTELLI, V.; MAURO, A. E.; MASSABNI, A. C. Aspectos do Metabolismo do Cobre no Homem. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 290-293, 1995.

TOPAL, A.; ATAMANALP, M.; ORUÇ, E.; EROL, H. S. Physiological and biochemical effects of nickel on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: Assessment of nuclear factor kappa B activation, oxidative stress and histopathological changes. **Chemosphere**, v. 166, pp. 445-452, 2017.

World Health Organisation (WHO). **Guidelines for Drinking-water quality**. 4<sup>a</sup>ed. ISBN 978 92 4 1548151.2011.

ZHENG, G.; LIU, C.; SUN, J.; FENG, Z.; CHENG, C. Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway. **Aquatic Toxicology**, v. 147, pp. 105-111, 2014.

### **Análise do níquel como potencial interferente endócrino através de método histoquímico como indicativo da presença de vitelogenina (VTG) em machos de *Danio rerio***

#### **1. INTRODUÇÃO**

São conhecidas como interferentes endócrinos (IE's) substâncias capazes de assemelhar-se a hormônios naturais do próprio organismo modificando a produção, liberação, transporte e metabolismo e conseqüentemente desequilibrando o sistema endócrino (USEPA, 1998). Como os meios de ação, mecanismos das substâncias e os efeitos a longo prazo não são bem elucidados, a temática tem ganhado interesse entre os pesquisadores, de acordo com o setor de pesquisa e desenvolvimento (ORD) da agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.

Os IE's estão presentes na atmosfera, na água e no solo, passam pelo processo de absorção e bioacumulação. Majoritariamente liberados no ambiente por efluentes industriais, escoamentos terrestres, resíduos domésticos, precipitação. Estes compostos podem modificar ou alterar a síntese e metabolismo de hormônios endógenos, mimetizar ou proporcionar efeitos hormonais antagônicos e influenciar a síntese de neuropeptídeos e neurotransmissores. Tais alterações podem durar depois do período de exposição ou até mesmo para gerações futuras (Cristina et al., 2012; Kabir 2015; Monneret, 2017).

Há um aumento gradativo na quantidade de substâncias identificadas como interferentes endócrino que podem afetar o sistema reprodutivo levando a efeitos adversos na vida aquática e na saúde humana. Os IE's podem ser classificados como: compostos naturais (hormônios esteroides, isoflavonas e outros hormônios), pesticidas clorados, produtos farmacêuticos, metais traço ou potencialmente tóxicos, bifenilpoliclorado, hidrocarbonetos aromáticos. Estes podem agir de maneira complexa, apresentando efeitos estrogênicos ou anti-estrogênicos e, por isso, para avaliar os efeitos é necessário que haja integração de diferentes biomarcadores e múltiplos endpoints.

Na literatura é possível observar a atuação dos metais como IE em peixes. Handy (2003) afirma que o cobre é um potencial IE assim como Cádmiio e Zinco, observado por Alkimin, (2016), respectivamente em concentrações de 1µg/L e 180µg/L. Há estudos que mostram evidências de alterações morfológicas causadas pelo níquel que indicam a possível atuação deste metal como um IE, com sinais de toxicidade hepática causada por este metal em *D. rerio* (Novaes et al., 2018). Neste mesmo organismo-teste foi observado retardo no tempo de eclosão dos ovos (Kienle *et al.*, 2008) e em *Pimephales promelas* observou-se alteração na gônada feminina com diminuição na quantidade de folículos vitelogênicos maduros, atresia folicular e diminuição da fecundidade (Driessnack, *et al.*, 2017).

A expressão da VTG em machos é um biomarcador bem estabelecido para atividade estrogênica em organismos aquáticos (Yamoto, *et al.*, 2017). A vitelogenina, uma fosfolipoglicoproteína precursora do vitelo, reserva energética nos ovos, ou seja, sintetizadas por organismos fêmeas ovíparas em resposta à sinalização estrogênica via ligação a receptores dessa proteína que auxilia no desenvolvimento de óvulos/oócitos. Machos possuem o gene para produção de VTG, porém são inativos. Ao serem ativados, aumentam níveis de estrogênio no sangue, resultando em feminização. (Bars, 2012; Yamamoto, 2017).

Dentre os métodos qualitativos para detectar a presença de vitelogenina no fígado de peixes machos destaca-se o histoquímico por coloração, que permite a marcação da referida proteína, por coloração (Van Der Ven, 2003), a baixo custo e rápida detecção, auxiliando na análise de substâncias potencialmente interferentes endócrinas.

Para detectar a presença de VTG podem ser utilizados métodos, histoquímicos que podem auxiliar nos estudos para indicar metais, assim como outras substâncias, como IE's nocivos aos organismos.

Para contextualizar, este método originou-se do interesse em conhecer a estrutura e composição dos seres vivos. Inicialmente cientistas adotaram novas manchas para discriminar morfológicamente as substâncias até que August Bencke em 1860-1870 passou a utilizar corantes anilina e reagentes, introduzindo assim a bioquímica na histologia. Nesta época havia dicotomia entre os pesquisadores físico-químicos e histologistas até que em o uso da anilina estava generalizado e em 1880 com o desenvolvimento de técnicas de parafinização e fotomicrografia 3 grupos de cientistas surgiram: aqueles que não se importavam com morfologia, aqueles com interesses contemporâneos em química, histologia e tecnologia e os histoquímicos aplicados, voltados para área diagnóstica e histopatologias. Devido corrida científica, surgiram explicações para afinidades aos corantes através de alvos bioquímicos e

posteriormente técnicas relacionadas ao indicativo de ferro, fósforo, presença de complexos orgânicos, como grupos carboidratos, nucleínas, protaminas e outros (Wick, 2012)

O método imuno-histoquímico mais utilizado para detecção de VTG é conhecido como ELISA (do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) através do uso de antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. A marcação pode ser utilizada devido à elevada concentração de grupos fosfato. Entretanto, Van der Ven *et. al.* (2003) destacou a utilização do método de coloração efetivo para detectar a VTG comparado ao ELISA observado em *D. rerio*.

O presente estudo visa avaliar efeitos do níquel em baixa concentração, como em valores nominais pelo órgão fiscalizador de proteção ambiental (CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente) para rios de Classe 2. O valor estabelecido nacionalmente é de 25 µg/L de Níquel no ambiente aquático. Entretanto, vale destacar que as normas americanas estabelecidas pela USEPA (Environmental Protection Agency), estabelecem 52 µg/L para liberação de efluentes em ambientes aquáticos.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a presença de VTG em machos de *D. rerio* como indicativo de efeito estrogênico do níquel em concentração na ordem de 25 µg/L.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Cultivo e manutenção do organismo-teste**

Adultos de *Danio Rerio* foram mantidos em condições laboratoriais controladas (ABNT N °15499, 2015). Manteve-se 1g de peixe por litro de água reconstituída. Utilizou-se água de abastecimento público previamente filtrada em filtro de carvão ativado e por uma tela silkscreen. Essa água foi mantida por aeração para remoção do cloro, por um período de 24h. A dureza foi mantida a 44mg/L CaCO<sub>3</sub>, pH entre 7,3–7,6 e temperatura a 25 ± 1°C. O fotoperíodo foi controlado em 12h de claro e 12h de escuro. Os organismos foram alimentados uma vez ao dia com a ração comercial tetramim® com 97% de proteína bruta. A manutenção da limpeza do aquário foi feita com esponja a cada 15 dias, podendo variar dependendo das condições do aquário, removendo os resíduos decantados. Dentro do aquário



continha carvão ativado dentro do filtro, cerâmicas para a formação de biofilme, removedor de amônia e aeração.

## **3.2 Ensaio Experimental**

### **3.2.1 Teste de toxicidade crônica**

Teste de toxicidade crônica por 21 dias em regime semi-estático, ou seja, com troca total da solução a cada 72h. A concentração utilizada foi baseada na legislação brasileira CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) para rios de Classe 2, sendo então 25 $\mu$  mg/L Ni total. O controle foi realizado apenas com água de cultivo.

Foram selecionados 04 indivíduos machos expostos ao níquel e 04 controle mantidos em água de cultivo.

Após o tempo de exposição, foram selecionados organismos-teste aleatoriamente e eutanasiados em freezer com gelo. Posteriormente foram descartadas as nadadeiras e a cauda e feito um corte na transversal na porção inferior até a altura da cabeça e cada peixe.

### **3.2.2 Processamento do tecido e inclusão em parafina**

Foram colocados dois (02) organismos por cassete para serem dispostos nos cestos do processador de tecidos automático – San Pietro da marca O Patologista, onde passaram por sete (07) submersões em álcool etílico absoluto, três (03) submersões em xilol e duas (02) submersões em parafina histológica. Todos os banhos foram programados para 1h cada.

Ao final do processamento, retiraram-se do cassete os organismos previamente inseridos e foram colocados manualmente na placa aquecedora (PAT-PA10, O patologista, Brasil) a fim de derreter a parafina residual vinda do processador e inserir novamente os indivíduos em parafina de maneira homogênea para melhor disposição dos cortes com o equipamento micrótomo através de navalhas de aço inoxidável de perfil baixo. Para isso, após a parafina ser derretida na placa aquecedora a 65°C, os organismos foram colocados individualmente em placas de alumínio proporcionais aos seus tamanhos e então o espaço era preenchido com parafina líquida e alocado o cassete na porção superior. Em seguida as placas eram colocadas em cima da placa refrigerada (PAT-PR10, O Patologista, Brasil), a fim de enrijecer a parafina, mantendo o indivíduo estático na placa (como demonstrado na figura 1, capítulo).

Após a secagem da parafina na placa refrigerada (cerca de 5 minutos), a placa de alumínio foi retirada, restando apenas o peixe incluso em parafina preso ao cassete, pronto para ser cortado, entre 3-4µm, utilizando-se para isso o micrótomo rotativo (MR-2014, O Patologista, Brasil).

Dessa maneira, era formado um filete de parafina que era retirado com auxílio de uma pinça e um pincel e colocado no equipamento de banho histológico digital (BH-16, O patologista, Brasil) contendo álcool 30% dissolvido em água destilada com o propósito de ajudar a estirar o filete de parafina para ser “pescado” com lâmina (Figura 2, Capítulo 2). A lâmina era posicionada embaixo do filete a fim de retirá-lo do banho histológico. Adiante, as lâminas eram alinhadas em posição vertical e inseridas na Estufa Microprocessada para Cultura Bacteriológica (SX 1.0 DTMC, marca Sterilifer, Brasil) a 40°C por 24h até o momento do processo de coloração.

### 3.2.3 Coloração Histoquímica

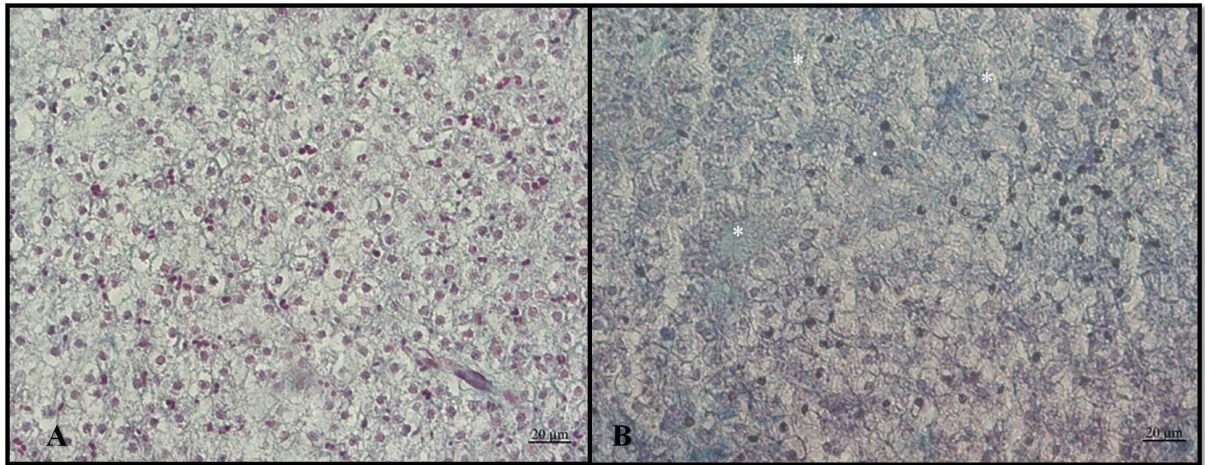
Primeiramente, as lâminas foram submersas a 10mM/L de cloreto de ferro hexahidratado por 1h a 25°C para que as fosfoproteínas presentes nas moléculas de VTG ficassem complexadas ao Ferro (III). Secundariamente foram submetidas a coloração pelo método Pear's Prussian Blue, o qual cora o complexo de ferro (III) e confere tons de azul a substância VTG presente no fígado. Os procedimentos estão descritos passo-a-passo no apêndice D. Para as análises foi utilizado o microscópio óptico Scope A1 Zeiss Axio com câmera acoplada (Axiocam 105 color).

## 4. RESULTADOS

Pode-se observar na Figura 1 a coloração de tons azuis em pontos da lâmina, como um indicativo da presença de vitelogenina (VTG), diferentemente do grupo controle, o qual apresenta uma coloração mais homogênea de tonalidade roxa. Essa diferença ocorre devido a técnica de histoquímica utilizada. Alta concentração de grupos fosfato pode ser detectada (Van Der Ven *et al.*, 2003).

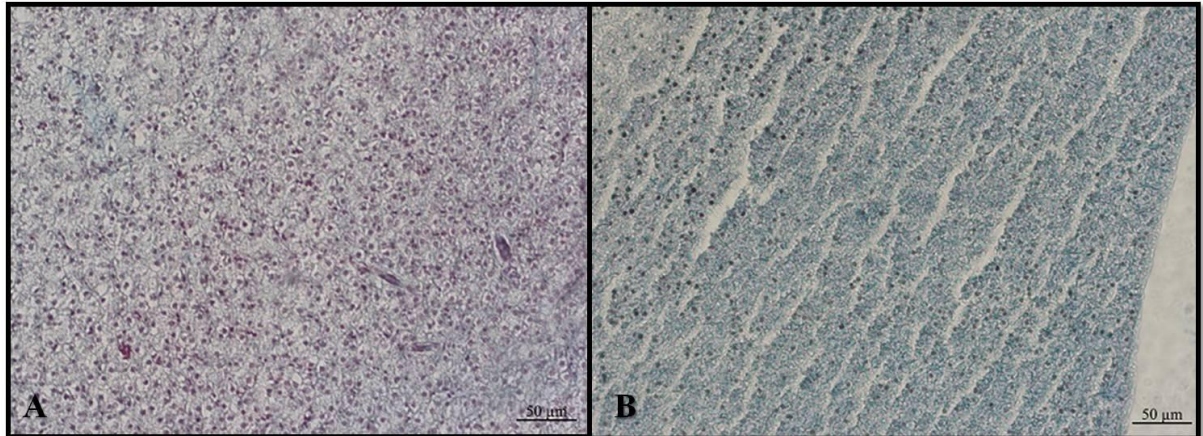
A presença de vitelogenina sinaliza efeito estrogênico do níquel no organismo aquático estudado.

**Figura 1** - Fígado de macho de *D. rerio* controle (A) e após exposição crônica 21 dias ao níquel (B), \* representa pontos de acúmulo de vitelogenina. Aumento de 400x. Fonte: Acervo pessoal.



Observou-se a coloração diferenciada entre a os organismos controle e os organismos expostos ao níquel, conforme a Figura 2.

**Figura 2** - Fígado de *D. rerio* controle (A) e após exposição crônica de 21 dias ao níquel (B). Nota-se coloração azulada como indicativo de vitelogenina no tecido (B), visto no aumento de 200x.



## 5. DISCUSSÃO

Machos adultos de *D. rerio* normalmente não produzem VTG, pois a produção da substância é responsável por garantir a qualidade dos ovos e nutrir o embrião durante seu desenvolvimento. A coloração azul indica detecção de fosfoproteínas, uma vez que complexadas ao  $\text{Fe}^{3+}$  indicam presença de VTG, sinalizando efeitos estrogênicos ocorrendo em machos da espécie (Van Der Ven *et al.*, 2003).

Paschoalini *et al.* (2019) estudou o potencial endócrino do peixe teleósteo *Prochilodus argenteus* contaminado por metais como alumínio (Al), cobre (Cu), cádmio (Cd) e Chumbo (Pb) e identificou incidência de atresia folicular em diferentes estágios do desenvolvimento, evidenciando diâmetros foliculares menores analisados através de métodos quantitativos de análise. Em machos foi visto produção de vitelogenina (efeito estrogênico) e expressão da metalotioneína através de métodos imunohistoquímicos, o que indica a atuação dos metais como interferentes endócrinos. Ademais a proporção de espermatozoides e espermátocitos foram aumentadas. Os estudos do autor citado corroboram com os dados de toxicidade histopatológica da presente pesquisa assim como sugere o capítulo 2 dessa dissertação ao detectar de maneira similar o aumento na proporção de espermatogênias/espermátocitos e a presença da VTG em organismos machos como demonstrado no presente estudo.

O estudo de Alkimin (2016), de maneira análoga aos resultados detectados por essa pesquisa, demonstrou o efeito endócrino dos metais cádmio e zinco nas concentrações de 1µg/L e 180µg/L respectivamente utilizando o mesmo biomarcador descrito para espécies de *D. rerio* pelo método histoquímico por coloração.

Em contrapartida, Moncaleano-Niño *et al.* (2017) observou ostras (*Saccostrea* sp.) em diversas concentrações expostas a cádmio em teste agudo 96h e concluiu que acima de 10µg/L, o metal apresentava efeito inibitório da vitelogênese

Este biomarcador (VTG) tem sido utilizado para analisar impacto em peixes machos de espécies nativas, como *Astynax bifasciatus*, *Chrenicicla iguassuensis* e *Geophagus brasiliensis* em rios contaminados com altos níveis de IE's (neste estudo, foram analisadas espécies expostas ao estradiol no ambiente aquático) e, de maneira oposta, em fêmeas foi observada a diminuição dos níveis de vitelogenina e estradiol no plasma (Yamamoto, 2017). Teta & Naik (2017) também analisaram a VTG em *D. rerio* em efluentes urbanos da indústria têxtil após tratamento e redução na fecundidade.

Portanto, este biomarcador (VTG) tem uma ampla aplicação, podendo ser interessante o seu estudo em espécies *in situ* e não somente em organismos-teste laboratoriais, possibilitando a averiguação da presença de substâncias potencialmente interferentes endócrinas nos corpos de água. O método histoquímico por coloração, se comparado ao Elisa, apresenta baixo custo e fácil análise dos resultados.

O método histoquímico por coloração pode também ser associado à análise de biomarcadores histológicos, o que reforça a evidência da presença de substâncias IE's nos

ambientes, ou reconhece o efeito estrogênico e/ou antiestrogênico de substâncias puras, numa dada concentração e tempo de exposição.

Paschoalini *et al.* (2019) reforça ainda a importância dos estudos químicos, que quantificam poluentes, associados aos ensaios ecotoxicológicos, com o uso de biomarcadores bem estabelecidos, para embasar a legislação no que tange concentrações seguras de exposição, visando proteção da vida aquática a importância das análises ambientais nos organismos.

## **6. CONCLUSÃO**

A análise histoquímica do fígado de machos de *D. rerio* sob a concentração de 25 µg/L de Ni expostos cronicamente indicaram a produção de VTG e, conseqüentemente, potencial para atuar como IE nos ambientes aquáticos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Toxicologia Aquática – Toxicidade crônica de curta duração – método de ensaios com peixes**. Normas ABNT NBR 15499. Rio de Janeiro, 23p., 2015.

ALKIMIN, G. D. **Toxicidade de cádmio e zinco em *Danio rerio*: comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquático e a potencial atuação como interferentes endócrinos**. 2016. Dissertação (mestrado em Ciências Ambientais) – UNESP, Sorocaba, São Paulo.

BARS, R.; *et al.* Risk assessment of endocrine active chemicals: Identifying chemicals of regulatory concern. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 64, pp. 143-154, 2012.

CONAMA N°357, 2015. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. **Diário Oficial (República Federativa do Brasil, Brasília, DF n 53**.

CRISTINA, P.; MARIA, C. U.; CARMEN, V. Endocrine disruptors in the environment and their impact on human health. **Environ. Eng. Manage**, vol. 11, n.9, p. 1697-1706, 2012

DRIESSNACK, M. K.; JAMWAL, A.; NIYOGI, S. Effects of chronic exposure to waterborne copper and nickel in binary mixture on tissue-specific metal accumulation and

reproduction in fathed minnow (*Pimephales promelas*). **Chemosphere**, v. 185, pp. 964-974, 2017.

HANDY, R. D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A** 135, p. 25-38, 2003.

KABIR, E. R. RAHMAN, M. S, RAHMAN, I.A review on endocrine disruptors and their possible impact on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 40, p. 241-258, 2015.

MONCALEANO-NIÑO, A. M. *et al.* Alteration of tissue metallothionein and vitellogenin concentration in tropical cup oysters (*Saccostrea* sp.) following short-term (96h) exposure to cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 185, pp. 160-170, 2017.

MONNERET, C. What is an endocrine disruptor? **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, pp. 403-405, 2017.

NOVAES, G. H. C .F.; AURELIANO, B. C.; FRAGOSO-MOURA, E. N.; CAVALVANTE, W., FRACÁCIO, R. Toxicidade dos metais níquel e cobre s sua possível atuação como interferentes endócrinos em ambientes aquáticos. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 48, pp. 128-141, 2018.

PASCHOALINI, A. L.; SAVASSI, L.A.; ARANTES, F. P., RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from polluted neotropical river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, pp. 539-550, 2019.

TETA, C.; NAIK, Y. S. Vitellogenin induction and reduced fecundity in zebrafish exposed to effluents from the City of Bulawayo, Zimbabwe. **Chemosphere**, v. 167, pp. 282-290, 2017.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Ambient water quality criteria**. Office of Water, Washington, DC, 1995. 143p., 2017.

VAN DER VEN *et al.* Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: evaluation by histochemistry, immuno histochemistry and in situ mRNA hybridization. **Aquatic Toxicology**, v. 65, pp. 1-11, 2003.

WICK, M. R. Histochemistry as a tool in morphological analysis: a historical review. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 16, pp. 71-78, 2012.

YAMAMOTO, F. Y.; GARCIA, J.R.E.; KUPSO, A; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguacu River – Southern Brazil. **Chemosphere**, 40 p., 2017.



## ANEXO A – Fator de Impacto da Revista – Capítulo 1

<b>Revista</b>	<b>Journal Impact Factor 2016</b>	<b>Journal Impact Factor last 5 years</b>
Acta Amazonica	0.775	x
American Journal of Physiology – Regulatory Integrative Comparative Physiology	2.982	3.290
Aquaculture	2.570	2.773
Aquatic Toxicology	4.129	4.425
Arq. Bras. Endocrinologia e Metabologia	1.193	1.198
Chemosphere	4.208	4.506
Ciência Animal Brasileira	x	x
Comparative Biochemistry and Physiology Part C	2.416	2.780
Comptes Rendus Biologies	1.100	1.443
Ecotoxicology and Environmental Safey	3.743	3.577
Environ. Eng. Manage	1.096	0.849
Environmental Pollution	5.099	5.552
Environmental Science Technology	6.198	6.960
Environmental Toxicology	2.937	2.738
Environmental Toxicology and Pharmacology	2.313	2.405
Homeostasis and Toxicology of Essential Metals	x	x
Journal of Environmental Biology	0.697	0.898
Journal of Environmental Sciences	2.865	3.210
Journal of Experimental Biology	3.320	3.482
Journal of Fish Biology	1.519	1.804
Marine Pollution Bulletin	3.146	3.780
Neotropical Ichthyology	1.203	1.367
Química Nova	x	x
Science of the Total Environment	4.900	5.102
Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies	2.052	x
Toxicology and Applied Pharmacology	3.791	4.006
Water Research	6.942	7.715

## **ANEXO B – Protocolo de Coloração**

Os cortes feitos com micrótomo devem medir de 3-4  $\mu\text{m}$ .

Antes de iniciar o procedimento as lâminas com os cortes colocados em estufa histológica a 60 °C por no mínimo 20 minutos. Após retiradas da estufa, segue o seguinte procedimento:

<b>Passo</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Tempo</b>
1	Xilol	3 min
2	Xilol	3 min
3	Xilol	3 min
4	Xilol	3 min
5	Álcool P.A	20 seg
6	Álcool P.A	20 seg
7	Álcool P.A	20 seg
8	Álcool P.A	20 seg
9	Água corrente	20 seg
10	Hematoxilina	2 min
11	Água corrente	20 seg
	Reativo	
12	diferenciador	5 seg
13	Água corrente	3 min
14	Eosina	4 min
15	Álcool P.A	50 seg
16	Álcool P.A	50 seg
17	Álcool P.A	50 seg
18	Álcool P.A	50 seg
19	Xilol	1 min
20	Xilol	1 min
21	Xilol	1 min
22	Xilol	1 min

**OBSERVAÇÃO:** A solução do reativo diferenciador foi preparada com 280 mL de Álcool Absoluto P.A, 180 mL de água destilada e 2 mL de HCl.

### **ANEXO C – Processamento de Tecido Histológico**

Antes de iniciar o processamento é necessário retirar a cauda, barbatana e as nadadeiras e inserir a amostra no fixador durante 18h. Após este período, as amostras devem ser lavadas em água corrente por 5 vezes a cada 15 minutos e inseridas em cassetes para serem levados ao processador de tecidos (San Pietro, O patologista, Brasil).

<b>Banho</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Tempo</b>
1	Álcool P.A	1h
2	Álcool P.A	1h
3	Álcool P.A	1h
4	Álcool P.A	1h
5	Álcool P.A	1h
6	Álcool P.A	1h
7	Álcool P.A	1h
8	Xilol	15 min
9	Xilol	1h
10	Xilol	1h
11	Parafina	1h
12	Parafina	1h

**OBSERVAÇÃO:** A solução para fixação do tecido histológico é preparada com 10 mL de formaldeído (37%), 90 mL de água destilada e estocada em frasco âmbar. O fixador deve ter 10x mais o volume da amostra.

#### **ANEXO D – Protocolo de Coloração Histoquímica para análise da vitelogenina (VTG)**

Antes de iniciar o procedimento as lâminas com os cortes devem ser levadas e estufa histológica a 60°C por mais ou menos 20 minutos. Utilizar cortes de fígado de aproximadamente 4µm, quanto mais espesso o corte mais difícil da coloração adentrar e isso resultará em modificações nos procedimentos a seguir.

	Procedimento	Tempo
1	Xilol 1	2 min
2	Xilol 2	2 min
3	Álcool PA 1	10X
4	Álcool PA 2	10X
5	Solução de Cloreto de Fe hexahidratado (10 mM/L)	60 min
6	Água	15X
7	Solução Prussin Blue	10 min
8	Água	10X/3min
9	Solução de vermelho neutro	1 min
10	Água	~1min
11	Álcool PA 1	15X
12	Xilol 1	15X