

**FILIPPE SILVEIRA AZEVEDO**

**AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM PEIXES COLETADOS À JUSANTE DAS BARRAGENS EUSTÁQUIO E SANTO ANTÔNIO, NO MUNICÍPIO DE PARACATU-MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Reggiani Vilela Gonçalves

Coorientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A994a  
2023  
Azevedo, Filipe Silveira, 1998-  
Avaliação de estresse oxidativo e análise histopatológica  
em peixes coletados à jusante das barragens Eustáquio e Santo  
Antônio, no município de Paracatu-MG / Filipe Silveira  
Azevedo. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (59 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Reggiani Vilela Gonçalves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Animal, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.664>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Peixes - Histopatologia. 2. Peixes - Efeito dos metais  
pesados. 3. Barragens de rejeitos. 4. Estresse oxidativo.  
I. Gonçalves, Reggiani Vilela, 1979-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 571.9543

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317


**FILIFE SILVEIRA AZEVEDO**

**AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM PEIXES COLETADOS À JUSANTE DAS BARRAGENS EUSTÁQUIO E SANTO ANTÔNIO, NO MUNICÍPIO DE PARACATU-MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*


APROVADA: 01 de agosto de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **FILIFE SILVEIRA AZEVEDO**  
Data: 25/10/2023 09:22:10-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Filipe Silveira Azevedo  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 **REGGIANI VILELA GONCALVES**  
Data: 26/10/2023 22:42:15-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Reggiani Vilela Gonçalves  
Orientadora

## AGRADECIMENTOS

Demorou um tempo para a ficha cair...Perceber que cheguei até aqui, tão longe de onde comecei e tão longe de onde quero chegar. O Filipe do passado estaria extremamente orgulhoso de mim, e o Filipe do futuro provavelmente está pensando “Você ainda tem muito caminho para trilhar”. Mas estou indo, estou evoluindo e aprendendo cada dia mais nesse caminho que decidi trilhar.

A biologia foi uma decisão difícil de ser escolhida, era o amor pela profissão versus a supervalorização de outras profissões, que na cabeça de um adolescente, contam muito peso. Mas como sempre dizem que temos que trabalhar com amor, eu escolhi. E foi a melhor escolha da minha vida profissional.

Sempre ouvi minha avó falando que médicos salvam e mudam a vida de muitas pessoas e pensava “como vou mudar a vida das pessoas sendo biólogo?”. Foi com esse pensamento que eu conheci a licenciatura, e me apaixonei e recordei da forma como todos os professores que passaram pela minha formação tocaram a minha vida e deixaram um pedacinho de seus corações nela. Hoje eu sei valorizar o que eu escolhi. Logo poderei estar formando médicos e salvando indiretamente muitas vidas, fazendo a diferença na vida dos meus alunos e mostrando como a biologia é linda (em especial a celular).

Eu não poderia chegar até aqui e conseguir trilhar esse caminho sem a luz de muitos que estiveram presentes e torceram por mim até aqui. As minhas amigas do coração, Carol, Luísa, Jade, que acompanharam de pertinho toda essa jornada, desde a graduação e os sofrimentos para passar de cálculo, até aqui no fim do mestrado, sempre me lembrando como eu sou capaz de levar as situações com extrema leveza. Agradeço a Duda, a Patrícia e ao Allan, por todo companheirismo durante esses dois anos de mestrado e por me acolherem, já que entrei como um forasteiro no laboratório deles. Agradeço ao Felipe, meu companheiro de toda hora, que me incentiva todo dia e está sempre do meu lado.

Agradeço ao LAFAP, por me iniciar na carreira acadêmica, de produção de ciência e por me mostrar como é ter uma família no local de trabalho, em especial ao Jener e Juliana, que me deram a mão e fizeram grande parte do que eu me tornei hoje no âmbito científico. E ao chegar no LAPEX, estava com grandes esperanças de encontrar outra família. E não teve outra. Fui abraçado por todos e espero continuar sendo abraçado por essa equipe sensacional e sinto que ali é o meu lugar e que voarei longe se continuar caminhando juntamente com todos. Um agradecimento em especial à Mariáurea e à Reggiani, que são exemplos vivos do que eu quero me tornar. As duas me mostraram que é possível fazer TUDO que é preciso sem desespero, de maneira coesa. Me mostraram que é possível ser gentil e rígido de forma a fazer um laboratório funcionar e ainda ser querido por todos. Vocês são inspiração.

Agradeço a todos as demais pessoas que me ajudaram no meu projeto, todos sabemos que ciência não se faz sozinho e muitas vezes não damos valor ao mínimo de ajuda que nos é fornecida. Em especial ao Luiz Otávio, que foi um pilar nas minhas análises e esteve presente em muitos momentos cruciais. E ao Sérgio da Matta, sem ele seria impossível realizar este trabalho.

Por fim, agradeço à minha família, por sempre estar presente mesmo que longe, sempre me apoiar e nunca duvidar de mim. Eu cheguei até aqui graças a vocês. Eu cheguei...

Agradeço também, À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

AZEVEDO, Filipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Avaliação de estresse oxidativo e análise histopatológica em peixes coletados à jusante das barragens Eustáquio e Santo Antônio, no município de Paracatu-MG.** Orientadora: Reggiani Vilela Gonçalves. Coorientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

Monitorar a qualidade de vida da ictiofauna próxima a barragens é crucial para avaliar as atividades de extração, em especial das espécies nativas. Neste contexto, peixes são modelos desejáveis, uma vez que estão em contato direto com os poluentes através das brânquias e fazem parte dos últimos níveis tróficos das cadeias alimentares, sendo os últimos a serem submetidos às propriedades bioacumulativas dos metais pesados. Baseado nisto, nosso objetivo foi investigar possíveis alterações histopatológicas em tecidos de peixes encontrados em locais potencialmente impactados pelas barragens. Também objetivamos entender a patogênese destas lesões relacionadas ao estresse oxidativo em brânquias, fígado, gônadas e músculos. Para realizar estas análises foram coletados 113 peixes para as análises histopatológicas e 82 peixes para as análises de estresse oxidativo. Foram distribuídos em 2 grupos: peixes de localidades não impactadas pela contaminação (área de referência (AR)) e peixes de localidades possivelmente impactadas pela contaminação (área diretamente afetadas/áreas de influência (ADA/AI)). Foram retirados fígado, brânquias, músculos e gônadas para análises histopatológicas e músculos e brânquias para análises de estresse oxidativo. Nos fígados, houve aumento de infiltrados inflamatórios nos peixes de ADA/AI. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas em regiões de isquemia e hemorragia. Não houve diferenças no metabolismo e armazenamento de glicogênio e não foram encontrados sinais de morte celular e fibrose nos tecidos hepáticos em ambas as áreas. Para as brânquias, as regiões ADA/AI tiveram aumento na fusão lamelar, hiperplasias e maior destruição do epitélio secundário. Em relação ao tecido muscular, não foram encontradas patologias significativas entre as áreas AR e ADA/AI não houve diferença na área de suas fibras musculares. Para as gônadas, foram encontrados alguns ovócitos em atresia, mas não houve diferença significativa entre as áreas. Em relação ao estresse oxidativo, houve diminuição na atividade da enzima antioxidante catalase e do marcador de peroxidação lipídica malondialdeído nos

músculos das áreas ADA/AI comparadas com AR. Houve também aumento de óxido nítrico (NO) nos músculos nas áreas ADA/AI em relação as áreas AR. Diferentes espécies possuem predisposição a serem afetadas a certos metais, justificando as diferenças apontadas nas espécies do estudo. As diferenças entre as localidades se relacionam as características físicas e químicas dos rios e as diferentes concentrações de metais. Isto pode justificar o aumento dos processos inflamatórios em áreas ADA/AI e a patogênese pode estar associada pelas ligações específicas que alguns metais estabelecem com as células hepáticas, especialmente devido ao fenômeno de explosão respiratória que está diretamente ligado ao estresse oxidativo nos tecidos. Em nosso estudo, observamos que as brânquias apresentaram hiperplasia e algumas regiões de fusão lamelar em áreas ADA/AI. Estas modificações estão associadas principalmente às funções de defesa deste órgão. Geralmente em condições de estresse as brânquias aumentam as células do epitélio lamelar para impedir a chegada dos metais na corrente sanguínea, explicando a hiperplasia e fusão lamelar. Em condições mais drásticas, o epitélio lamelar é completamente perdido, como foi observado para as áreas ADA/AI. A diminuição de malondialdeído (MDA), juntamente com a catalase (CAT), nas regiões ADA/AI indicam que o balanço oxidativo está em equilíbrio nesses peixes. Por outro lado, houve um aumento de óxido nítrico no tecido muscular nas áreas ADA/AI. Este achado possivelmente está relacionado a outras atividades do NO dentro das células como vasodilatação e sinalização celular, já que o estresse oxidativo dentro destes tecidos parece estar controlado. Conclui-se que os peixes das localidades a jusantes das barragens de Eustáquio e Santo Antônio, não apresentaram contaminação severa a partir de análises histopatológicas e de estresse oxidativo feitas com tecidos do fígado, brânquias, gônadas e músculos.

Palavras-chave: Barragem. Estresse Oxidativo. Histopatologia. Metais Pesados.

## ABSTRACT

AZEVEDO, Filipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **Oxidative stress evaluation and histopathological analysis in fish collected downstream of the eustáquio and santo antônio dams, in the city of paracatu, minas gerais, brazil.** Adviser: Reggiani Vilela Gonçalves. Co-adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

Monitoring the quality of life of the ichthyofauna near dams is crucial to assess extraction activities, especially for native species. In this context, fish are desirable models, since they are in direct contact with pollutants through the gills and are part of the last trophic levels of food chains, being the last to be subjected to the bioaccumulative properties of heavy metals. Based on this, our objective was to investigate possible histopathological alterations in fish tissues found in sites potentially impacted by dams. We also aimed to understand the pathogenesis of these injuries related to oxidative stress in gills, liver, gonads and muscles. For these analyses, 113 fish were collected for histopathological analysis, and 82 fish were collected for oxidative stress analysis. They were divided into 2 groups: fish from non-impacted areas (reference area, RA) and fish from potentially impacted areas (directly affected areas/influence areas, DAA/IA). Liver, gills, muscles, and gonads were removed for histopathological analysis, while muscles and gonads were used for oxidative stress analysis. In the livers, there was an increase in inflammatory infiltrates in the DAA/IA fish. However, no significant differences were found in regions of ischemia and hemorrhage. There were no differences in glycogen metabolism and storage, and no signs of cell death and fibrosis were found in liver tissues in either area. For the gills, the DAA/IA regions had an increase in lamellar fusion, hyperplasia and greater destruction of the secondary epithelium. Regarding muscle tissue, no significant pathologies were found between the RA and DAA/IA areas, there was no difference in the area of their muscle fibers. For the gonads, some oocytes were found in atresia, but there was no significant difference between the areas. Regarding oxidative stress, there was a decrease in the activity of the antioxidant enzyme catalase and the lipid peroxidation marker malondialdehyde in the muscles of the DAA/IA areas compared to the RA. There was also an increase in nitric oxide in the muscles in the DAA/IA areas compared to the RA áreas. Different species have a predisposition to be affected by certain metals, justifying the differences observed

among the species in the study. The differences between the locations are related to the physical and chemical characteristics of the rivers and the varying concentrations of metals. This can explain the increase in inflammatory processes in DAA/AI areas, and the pathogenesis may be associated with the specific interactions that certain metals establish with hepatic cells, particularly due to the phenomenon of respiratory burst, which is directly linked to oxidative stress in tissues. In our study, we observed that the gills exhibited hyperplasia and some regions of lamellar fusion in DAA/AI areas. These modifications are primarily associated with the defense functions of this organ. Generally, under stressful conditions, the gills increase the cells of the lamellar epithelium to prevent the metals from entering the bloodstream, thereby explaining the hyperplasia and lamellar fusion. Under more severe conditions, the lamellar epithelium is completely lost, as observed in the DAA/AI areas. The decrease in malondialdehyde (MDA), along with catalase (CAT), in the DAA/AI regions indicates that the oxidative balance is in equilibrium in these fish. On the other hand, there was an increase in nitric oxide in the muscular tissue in the DAA/AI areas. This finding is possibly related to other activities of NO within cells, such as vasodilation and cellular signaling, since oxidative stress within these tissues appears to be under control. It can be concluded that the fish in the downstream areas of the Eustáquio and Santo Antônio dams did not show severe contamination based on histopathological and oxidative stress analyses conducted on liver, gills, gonads, and muscles tissues.

**Keywords:** Dam. Oxidative Stress. Histopathology. Heavy Metals.

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
2.1. <i>Objetivo Geral</i> .....	12
2.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	12
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
2.1. <i>Coleta de indivíduos</i> .....	18
2.2. <i>Estresse Oxidativo</i> .....	19
2.3. <i>Análise de Óxido Nítrico</i> .....	20
2.4. <i>Atividade Superóxido Dismutase</i> .....	20
2.5. <i>Atividade Catalase</i> .....	21
2.6. <i>Determinação de Malondialdeído</i> .....	21
2.7. <i>Oxidação de Proteínas</i> .....	21
2.8. <i>Proteínas Totais</i> .....	22
2.9. <i>Histopatologia</i> .....	22
2.10. <i>Análise Estatística</i> .....	25
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. <i>Análises de Estresse Oxidativo – Brânquias</i> .....	26
3.2. <i>Análises de Estresse Oxidativo – Músculos</i> .....	27
3.3. <i>Histopatologias hepáticas</i> .....	28
3.4. <i>Histopatologias branquiais</i> .....	34
3.5. <i>Áreas das fibras musculares</i> .....	38
3.6. <i>Histopatologias nas gônadas</i> .....	40
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

As barragens são estruturas criadas com o objetivo de reter os rejeitos derivados das atividades industriais para que não entrem em contato com outros segmentos de rios. A contaminação causada pelos rejeitos pode alcançar a fauna e a flora dos ecossistemas aquáticos e terrestres, alterando a composição química e física do meio, comprometendo a ciclagem de nutrientes e a diversidade de espécies desse local (SOBREIRA, 2021). Os rejeitos que causam maiores danos aos ecossistemas são os metais pesados, podendo ser inseridos no ambiente de maneira natural ou antropológica através da mineração (Briffa et al., 2020).

Ao serem descartados em corpos d'água, os metais pesados entram em contato com os organismos aquáticos através do corpo d'água, solos contaminados, difusão nas brânquias dos peixes e pelo consumo direto entre espécies contaminadas (Garai et al., 2021) (Rajeshkumar & Li, 2018). Os metais pesados têm características bioacumulativas e são facilmente detectáveis em tecidos como fígado e brânquias (El-Shenawy et al., 2021). Neste sentido, os peixes são modelos ideais para estudos toxicológicos em determinados rios, uma vez que a bioacumulação de metais será maior em seus tecidos. Além disto, algumas espécies são o topo da cadeia alimentar e, por isto, os danos em seus órgãos são considerados parâmetros para determinação da qualidade de água em dado local (Almeida et al., 2021).

Os metais pesados possuem elétrons instáveis e são ótimos aceptores de elétrons, e por isto, podem ser considerados radicais livres (RL) (Engwa et al., 2019). Como consequência disso, um dos principais danos causados no organismo é a elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) que, quando em excesso, causam danos nas membranas lipídicas, DNA e proteínas das células promovendo um desequilíbrio entre a síntese e degradação de RL e ERO's. Este processo é conhecido como estresse oxidativo e geralmente está associado a alterações danosas em células e tecidos (Fu & Xi, 2020). Os animais, entre eles os peixes, possuem mecanismos fisiológicos capazes de reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio auxiliando na manutenção da homeostase durante a exposição a metais pesados (Rehman et al., 2021).

Esses mecanismos são compostos por uma gama de enzimas antioxidantes capazes de converter essas espécies reativas em subprodutos não tóxicos para o organismo, como água e oxigênio molecular e assim proteger as células da ação destes compostos (Hoseinifar et al., 2020). Entre as enzimas antioxidantes podemos destacar SOD, CAT e GST. Essas enzimas atuam na estabilização dos RL formados durante a fosforilação oxidativa e a contaminação por metais pesados, que aumentam a produção de ERO's na mitocôndria, além de atuarem diretamente na proteção contra a peroxidação lipídica das membranas (Sun et al., 2022). A SOD e a CAT são capazes de controlar os RL superóxido e peróxido de hidrogênio, reduzindo-os a água, enquanto a GST é capaz de diminuir a citotoxicidade causada pelos RL reduzindo-os a álcool (Kapoor et al., 2019).

O dano causado nos tecidos é indicativo de toxicidade desses metais. Os principais órgãos a serem afetados são o fígado, as brânquias e os rins e, em condições mais críticas, todo o organismo pode ser afetado, incluindo gônadas e músculos. Neste sentido, um método efetivo de avaliação da saúde dos animais afetados é a histopatologia, que detecta mudanças morfológicas nos órgãos (Yacoub et al., 2021). Neste contexto, podemos destacar o fígado, que é o principal metabolizador de substâncias tóxicas no organismo e, portanto, é o primeiro órgão a

sofrer danos pela exposição aos metais pesados (Javed & Usmani, 2019). O excesso dos metais pode aumentar a geração de ERO's dentro das células e atacar as ligações saturadas dos lipídeos das membranas dos hepatócitos promovendo uma peroxidação em cadeia das membranas e consequente formação de poros, alterando o equilíbrio hidroeletrolítico das células. As consequências são o desenvolvimento de processos degenerativos reversíveis que podem evoluir para morte celular e fibrose (Weber et al., 2020). Associado a isto, normalmente o tecido hepático agredido também apresenta alterações vasculares significativas como congestão, marginação leucocitária e hiperemia, comprometendo a nutrição do tecido (Hedayati et al., 2022).

Além do fígado, outro órgão que sofre a ação direta dos metais pesados são as brânquias, pois estão em contato direto com o meio externo e possuem um epitélio com células muco-secretoras em seus segmentos, que funcionam como uma barreira física e fisiológica contra a ação de poluentes (Shahid et al., 2020). Na presença de poluentes, há redução na superfície de contato das brânquias entre o ambiente, podendo levar o peixe a morte por hipóxia, uma vez que por consequência, a troca de gases também é comprometida (Santos, 2011). A exposição prolongada a metais pesados pode comprometer essas barreiras de defesa e permitir que ocorra a difusão destes metais para outros órgãos importantes, como os rins, músculos e gônadas (Paschoalini et al., 2021). As alterações histológicas causadas pelos danos nas brânquias envolvem fusão lamelar, descolamento de epitélio, hipertrofia, entre outros (Carvalho et al., 2020).

A bioacumulação de metais também afeta o sistema reprodutor dos peixes agindo direta e indiretamente na reprodução e na formação de gametas (Abdel-Kader and Mourad, 2019). A formação de gametas é afetada pelos metais devido à inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal que agem na produção de hormônio folículo estimulante (FSH), progesterona, estrógeno e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Chakraborty, 2021). A atividade das enzimas antioxidantes é diminuída a medida em que se aumenta a bioacumulação de metais pesados nos tecidos, danificando ainda mais as células (Bhat et al., 2023). Esses danos podem ser observados pelas alterações histológicas dos órgãos reprodutores. Entre elas, estão a vacuolização das células, atrofia em folículos e espermatócitos, desorganização de túbulos seminíferos, não formação de corona radiata, necrose tecidual, entre outros (Gárriz et al., 2018).

A bioacumulação de metais pesados em músculos é muito baixa, devido à presença de metalotioneínas no fígado que armazenam as moléculas de metais para serem degradadas, impedindo que elas consigam alcançar os músculos (Mahboob et al., 2020). Mas é possível, que devido a alguma falha nessa função do fígado, ou ao acúmulo exagerado de metais pesados, o músculo seja comprometido. Sendo assim, quando os músculos dos peixes são afetados existe um risco maior para a saúde humana, já que é a parte mais utilizada na culinária (Taslina et al., 2022) e tem como característica, servir como fonte de proteína e ômega 3 para os humanos (Jaber et al., 2021) e quando contaminados, podem facilmente comprometer a saúde do corpo, além de alterar a eficácia de vitaminas e óleos presentes nessa fonte de alimento (Monferran et al., 2016). Então, visando analisar o possível impacto das barragens no ecossistema, este estudo caracterizou uma linha de base em que foram avaliados os peixes dos rios à jusante das barragens de Eustáquio e Santo Antônio em Paracatu – MG previamente a qualquer rompimento, para a constatar se há algum tipo de falha no sistema de contenção de metais pesados das barragens.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo Geral*

Caracterizar uma linha de base quanto à ictiofauna silvestre de localidades à jusante das barragens de Eustáquio e Santo Antônio, para fins de futura avaliação de impacto ambiental em caso de rompimento de barragem, visando retratar a situação ambiental a um cenário pré-desastre, que será utilizado como base para avaliação quali-quantitativa dos impactos e para o norteamo de ações de mitigação, reversão e compensação dos danos.

Nesse sentido, foram avaliados parâmetros envolvendo estresse oxidativo e histopatologias em brânquias, fígado, músculos e gônadas de peixes coletados em cursos d'água localizados em áreas classificadas como área diretamente afetada/área de influência (ADA/AI) e área de referência (AR). Conforme definição do TERMO DE REFERÊNCIA PARA CARACTERIZAÇÃO DE LINHA DE BASE QUANTO A FAUNA SILVESTRE E SERVIÇOS ECOSSISTÊMICOS ASSOCIADOS - PLANO DE AÇÃO DE EMERGÊNCIA (PAE), as áreas afetadas são aquelas localizadas na área de projeção da mancha de inundação (ADA) e áreas circunvizinhas cujos atributos físicos ou bióticos possam sofrer influência em caso de rompimento de barragem (AI), e a área de referência é composta por ambientes que não serão atingidos em caso de desastre.

### 2.2. *Objetivos Específicos*

- Investigar as principais modificações histopatológicas em brânquias, fígado, gônadas e músculos;
- Investigar a formação de espécies reativas de oxigênio e os danos causados as macromoléculas a partir do *status* oxidativo;

## 3. REFERÊNCIAS

- Almeida, S. S., Oliveira, S. V., Dantas, R. M., Borges, L. L., Sabóia-Morais, T. M. S., Rocha, L. T., Bailão, C. L. F. E. Environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induce differential histopathological responses in gills and liver of freshwater fish. *Environmental Science and Pollution Research* 28(33): 44890-44901, 2021. doi: 10.1007/s11356-021-13839-0.
- Bhat, R. A., Bakhshalizadeh, S., Guerrera, M. C., Kesbiç, O. S., Fazio, F. Toxic effect of heavy metals on ovarian deformities, apoptotic changes, oxidative stress, and steroid hormones in rainbow trout. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 75: 127106, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.127106>
- Briffa, J., Sinagra, E., Blundell, R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* 6(9): e04691, 2020

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>.

Carvalho, T. L. A. D. B., Nascimento, A. A. D., Gonçalves, C. F. D. S., Santos, M. A. J. D., Sales, A. Assessing the histological changes in fish gills as environmental bioindicators in Paraty and Sepetiba bays in Rio de Janeiro, Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Research* 48(4): 590-601, 2020. <http://dx.doi.org/10.3856/vol48-issue4-fulltext-2351>

Chakraborty, S. B. Non-essential heavy metals as endocrine disruptors: evaluating impact on reproduction in teleosts. In *Proceedings of the Zoological Society* 74(4): 417-431, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12595-021-00399-x>

dos Santos, D. C. M., da Matta, S. L. P., de Oliveira, J. A., dos Santos, J. A. D. Histological alterations in gills of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64(7-8): 861-866, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.03.007>

El-Shenawy, N. S., EL-Hak, H. N. G., Ghobashy, M. A., Mansour, F. A., Soliman, M. F. Using antioxidant changes in liver and gonads of *Oreochromis niloticus* as biomarkers for the assessment of heavy metals pollution at Sharkia province, Egypt. *Regional Studies in Marine Science* 46: 101863, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101863>.

Engwa, G. A., Ferdinand, P. U., Nwalo, F. N., Unachukwu, M. N. Mechanism and health effects of heavy metal toxicity in humans. *Poisoning in the modern world- new tricks for an old dog* (10): 70-90, 2019.

Fu, Z., & Xi, S. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods* 30(3): 167-176, 2021. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>

Garai, P., Banerjee, P., Mondal, P., & Saha, N. C. Effect of heavy metals on fishes: toxicity and bioaccumulation. *Journal of Clinical Toxicology* 18(11): 001, 2021.

- Gárriz, Á., Del Fresno, P. S., Carriquiriborde, P., Miranda, L. A. Effects of heavy metals identified in Chascomús shallow lake on the endocrine-reproductive axis of pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). *General and Comparative Endocrinology* 273: 152-162, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.06.013>
- H Abdel-Kader, H., H Mourad, M. Bioaccumulation of heavy metals and physiological/histological changes in gonads of catfish (*Clarias gariepinus*) inhabiting Lake Maryout, Alexandria, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 23(2): 363-377, 2019. DOI: 10.21608/ejabf.2019.32036
- Hedayati, S. A., Sheikh Veisi, R., Hosseini Shekarabi, S. P., Shahbazi Naserabad, S., Bagheri, D., Ghafarifarsani, H. Effect of dietary *Lactobacillus casei* on physiometabolic responses and liver histopathology in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to iron oxide nanoparticles. *Biological Trace Element Research* 200(7): 3346-3354, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02906-9>
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., Carnevali, O. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 29(2): 198-217, 2020
- Jaber, M. M. T., Al-Jumaa, Z. M., Al-Taei, S. K., Nahi, H. H., Al-Hamdany, M. O., Al-Salh, M. A., Al-Mayahi, B. Bioaccumulation of heavy metals and histopathological changes in muscles of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in the Iraqi rivers. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 35(2): 245-249, 2021. DOI: 10.33899/ijvs.2020.126748.1368
- Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Al-Balawi, H. F., Al-Misned, F., Ahmed, Z. Toxicological effects of heavy metals on histological alterations in various organs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from freshwater reservoir. *Journal of King Saud University-Science* 32(1): 970-973, 2020.

- Javed, M., & Usmani, N. An overview of the adverse effects of heavy metal contamination on fish health. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 89: 389-403, 2019.
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., Singh, J. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene* 19: 100182, 2019.
- Monferran, M. V., Garnero, P. L., Wunderlin, D. A., de los Angeles Bistoni, M. (2016). Potential human health risks from metals and as via *Odontesthes bonariensis* consumption and ecological risk assessments in a eutrophic lake. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129: 302-310, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.030>
- Paschoalini, A. L., Bazzoli, N. Heavy metals affecting Neotropical freshwater fish: A review of the last 10 years of research. *Aquatic Toxicology* 237: 105906, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105906>
- Rajeshkumar, S., Li, X. Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Toxicology Reports* 5: 288–295, 2018. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.01.007
- Rehman, T., Naz, S., Hussain, R., Manan Mustafa Chatha, A., Ahmad, F., Yamin, A., Shaheen, A. Exposure to heavy metals causes histopathological changes and alters antioxidant enzymes in fresh water fish (*Oreochromis niloticus*). *Asian Journal of Agriculture and Biology*: 1, 2021
- Shahid, S., Sultana, T., Sultana, S., Hussain, B., Irfan, M., Al-Ghanim, K. A., Mahboob, S. Histopathological alterations in gills, liver, kidney and muscles of *Ictalurus punctatus* collected from pollutes areas of River. *Brazilian Journal of Biology* 81(3): 814-821, 2020. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234266>
- Shahjahan, M., Taslima, K., Rahman, M. S., Al-Emran, M., Alam, S. I., Faggio, C.

Effects of heavy metals on fish physiology—a review. *Chemosphere* 134519: 300, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134519>

Sobreira, A. P. Estudos sobre as barragens de rejeitos do estado de Goiás. *Epitaya E-books* 1(11): 152-169, 2021. <https://doi.org/10.47879/ed.ep.2021366p152>.

Sun, Q., Li, Y., Shi, L., Hussain, R., Mehmood, K., Tang, Z., Zhang, H. Heavy metals induced mitochondrial dysfunction in animals: Molecular mechanism of toxicity. *Toxicology* 469: 153136, 2022.

Taslina, K., Al-Emran, M., Rahman, M. S., Hasan, J., Ferdous, Z., Rohani, M. F., Shahjahan, M. Impacts of heavy metals on early development, growth and reproduction of fish—A review. *Toxicology Reports* 9: 858-868, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.04.013>

Weber, A. A., Sales, C. F., de Souza Faria, F., Melo, R. M. C., Bazzoli, N., Rizzo, E. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: a case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190: 110165, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>

Yacoub, A. M., Mahmoud, S. A., Abdel-Satar, A. M. Accumulation of heavy metals in tilapia fish species and related histopathological changes in muscles, gills and liver of occurring in the area of Qahr El-Bahr, Lake Al-Manzalah, Egypt. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 50(1): 1-15, 2021. <https://doi.org/10.2478/oandhs-2021-0001>

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes são considerados organismos ideais para o estudo de regiões afetadas por ações antrópicas, como mineração, metalúrgicas, agricultura, esgoto urbano e turismo, que resultam na liberação de resíduos químicos e de processamento de metais nos corpos d'água. Esta característica se deve principalmente a posição final destes animais nas cadeias alimentares, e por isto são os organismos que mais acumulam tais contaminantes (Zaynab et al., 2021). Entre os compostos originados destas atividades extrativistas, estão os metais pesados e pesticidas que possuem características bioacumulativas, tóxicas, não-degradáveis e permanecem em diferentes tecidos dos organismos aquáticos (Onita et al., 2021).

O contato entre os contaminantes e os peixes, se dá comumente através das brânquias e da ingestão de alimentos já contaminados que percorrem a corrente sanguínea e alcançam outros órgãos, como o fígado que é o principal órgão desintoxicante do organismo, músculos, sistema reprodutor e nervoso, podendo levar o animal a morte (Agbugui & Abe, 2022). Além disso, existe a possível contaminação humana pelo consumo de peixes e tecidos contaminados, em especial, os músculos, que são ricas fontes de proteínas (Sheikhzadeh et al., 2021). As principais consequências do consumo de carne contaminada para a saúde humana são o desenvolvimento de doenças renais, no sistema nervoso, cardiovasculares entre outras (Briffa et al., 2020).

Por estarem muito expostos a alterações ambientais, peixes desenvolveram vários mecanismos fisiológicos que os auxiliam na manutenção da homeostase corporal e, portanto, da sua saúde durante a exposição à contaminantes. Esses mecanismos podem ser monitorados e, concomitantemente, ocorre a ativação de vias celulares específicas que sugerem a exposição desses organismos a agentes contaminantes. Existem marcadores celulares e teciduais como enzimas antioxidantes e alterações histopatológicas que podem indicar se há algum impacto do meio ambiente sobre os órgãos e tecidos dos animais. Sendo assim, estudos dessa natureza, são ferramentas promissoras na identificação de distúrbios ambientais em dado local.

Esses contaminantes induzem o aumento da produção radicais livres, e de espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas extremamente reativas que se não forem combatidas pelos sistemas de defesa antioxidante dos indivíduos, podem causar danos celulares irreversíveis. As espécies reativas de oxigênio são geradas nas mitocôndrias, e aumentadas quando há um excesso de radicais superóxido, que, por sua vez, representam o primeiro passo para a geração de outras EROs nas células e nos tecidos. Quando não combatidos pelo sistema de defesa, esses superóxidos podem gerar peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radicais hidroxilas e óxido nítrico (NO) (et al., 2020). Todos estes compostos são nocivos ao ambiente celular, e podem provocar danos a lipídios, proteínas estruturais e ao DNA, causando a morte das células (Rahman et al., 2019).

Para evitar estes danos, os sistemas de defesa antioxidantes são acionados periodicamente, desencadeando tanto as defesas endógenas, conhecidas como enzimas antioxidantes que são produzidas pelo corpo, quanto as exógenas, que são compostas pelas substâncias antioxidantes que estão contidas nos alimentos (Moussa et al., 2019). Ambas as vias agem conjuntamente para combater e neutralizar o excesso de EROs produzido pela exposição a poluentes ambientais, evitando os danos celulares. As principais enzimas antioxidantes que atuam nesse processo são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione S-transferase (GST).

Estas enzimas conseguem neutralizar os efeitos dos radicais livres e EROs, e, portanto, contribuem para manter o balanço oxidativo ideal, funcionalidade celular e saúde tecidual.

Existem alterações teciduais decorrente dos danos do desbalanço oxidativo que indicam contaminação por agente agressor. A presença de inflamação nos tecidos, hemorragias, isquemias e processos degenerativos podem ser indicativos de uma lesão moderada que, eventualmente, pode evoluir para alterações irreversíveis nos núcleos das células, o que, por sua vez, altera a homeostase celular e pode causar a morte por apoptose ou necrose, e comprometendo a função dos órgãos e tecidos (Baldisserotto, 2002; Sanjeev et al., 2019). Em geral, os sinais patológicos nos tecidos aparecem em uma sequência cronológica, mas regiões de inflamação (resposta a um agente agressor ou lesão tecidual com o objetivo de erradicar o agente irritante e recuperar o tecido) também podem coexistir com regiões de congestão vascular (acúmulo de sangue dentro dos vasos) e hemorragia (extravasamento do sangue para os tecidos). Geralmente estas alterações vasculares estão associadas a quadros de isquemia (ausência de vascularização que pode desencadear processos reversíveis ou irreversíveis para as células). Por consequência, essas alterações vasculares promovem o acúmulo de substâncias dentro das células, em locais que elas normalmente não as armazenam (degenerações) e/ou morte celular caracterizada pela presença de núcleos picnóticos (condensação da cromatina), fragmentação nuclear (cariorrexe) e ausência de núcleo (cariólise), levando à morte celular por necrose ou apoptose (Zulkipli et al., 2021).

Neste contexto, pode haver um desequilíbrio dos ecossistemas e, em casos mais graves, extinção de espécies devido ao impacto ambiental gerado pela presença de contaminantes nos corpos d'água. Por isso, este trabalho foi feito na cidade de Paracatu - Minas Gerais, que abriga duas das maiores barragens do Brasil. As barragens de Eustáquio e de Santo Antônio, somadas, apresentam cerca de mais de um bilhão de metros cúbicos de capacidade de armazenamento de rejeitos. Portanto, objetivamos, seguindo a legislação estadual, como parte integrante do Plano de Ação de Emergência para Barragens de Mineração (PAEBM), a caracterização da condição ambiental e de saúde da fauna anteriores a um possível rompimento de barragem, com o objetivo de fornecer subsídios para futuras avaliações de impacto ambiental em caso de desastre. O entendimento da situação atual de saúde da ictiofauna, grupo diretamente afetado em casos de contaminação aquática, contempla estudos histopatológicos e de estresse oxidativo nesses animais. Os estudos preconizados pela legislação permitem o prosseguimento das atividades minerárias com maior segurança para o meio ambiente e para a empresa mineradora envolvida.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### *2.1. Coleta dos indivíduos*

Espécies de peixes que vivem na Bacia hidrográfica do Rio Paracatu na cidade de Paracatu - Minas Gerais, foram coletadas em 15 sítios diferentes nas proximidades das barragens de Eustáquio e Santo Antônio. Destes sítios, 5 foram agrupados como áreas de referência (AR) e 10 agrupados como áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI). Cada sítio cobria aproximadamente 1 Km<sup>2</sup> de área.

Foram dispostas 20 redes de espera de 10 m<sup>2</sup>, com malhas de tamanhos diferentes, variando entre 15 mm e 80 mm de comprimento em cada ponto de coleta. As redes de espera foram montadas no pôr do sol e retiradas na manhã seguinte, ao meio-dia.

Dentre as espécies coletadas estão, *Astyanax bimaculatus*, *Psalidodon fasciatus*, *Orthospinus franciscensis*, *Moenkhausia costae*, *Tetranopterus chaulceus*, *Bryconops affinis*, *Cyphocharax gilbert*. Após a coleta, os espécimes foram eutanasiados com Eugenol® 1500 µl/L, identificados, pesados, medidos biometricamente, abertos ventralmente por incisão e armazenados inteiros em nitrogênio líquido, para análises referentes ao estresse oxidativo e em fixador histológico Bouin para análises referentes à histopatologia, para que os órgãos sejam devidamente preservados.

As espécies variaram de acordo com a aleatoriedade e chance de captura, o que explica as diferenças no número de indivíduos (N) e variedade de espécies em cada ponto amostrado.

## 2.2. Estresse Oxidativo

Para estas análises foram coletados 82 exemplares, de 3 espécies e imersos em nitrogênio líquido. Destes, 40 indivíduos são parte do grupo de áreas de referência (AR) e foram coletados no ponto de coleta BAR06 e 42 indivíduos foram coletados em 3 localidades de áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI) (BA11, BA13, BA18) (Tabela 1). Em função do pequeno tamanho dos animais amostrados para estas análises, foi feito pool de cada tipo de tecido (Yelin et al., 2020) e apenas as brânquias e os músculos foram utilizados, por serem tecidos mais fáceis de serem retirados.

Tabela 1: Distribuição do número de indivíduos por espécie coletados nos pontos de áreas de referência (AR) e de áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI) para as análises de estresse oxidativo.

Área	Ponto	Espécie	Total de indivíduos
Área de referência (AR)	BAR06	<i>Psalidodon fasciatus</i>	40
Área diretamente afetadas e de influência (ADA/AI)	BA11	<i>Psalidodon fasciatus</i>	7
	BA13	<i>Psalidodon fasciatus</i> <i>Bryconops affinis</i>	10
	BA18	<i>Psalidodon fasciatus</i> <i>Cyphocharax gilbert</i>	25

Amostras de 100 mg de brânquias e músculo foram coletadas dos indivíduos congelados em nitrogênio líquido para posterior homogeneização em 0.2 mol/L de tampão fosfato, 1 mmol/L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pH 7,4 com o auxílio de um homogeneizador (OMNI). Sempre que necessário, foi realizado um pool de tecidos de animais provenientes da mesma espécie para totalizar 100 mg de tecido. Os homogenatos foram, em seguida, centrifugados a 15000 g à 4 °C por 10 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram usados para as análises de Óxido nítrico (ON), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Malondialdeído (MDA) e Proteínas carboniladas (PC). Todas as análises enzimáticas foram avaliadas em duplicatas, com a utilização de um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu, Japan) ou leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

#### *2.2.1. Análise de Óxido Nítrico (ON)*

A quantidade de óxido nítrico gerado pelos espécimes foi quantificada pela reação de Griess padrão, em que 50 µL de sobrenadante descrito anteriormente foram incubados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de N- (1-naftil) etilenodiamina e 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à temperatura ambiente, por 10 minutos (Tsikas, 2007). A absorvância foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro de varredura de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). A conversão da absorvância em concentrações micromolares de ON foi obtida a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0–100 µM) e expressa como concentrações de ON (µmol / L).

#### *2.2.2. Atividade de Superóxido dismutase*

A atividade da Superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela habilidade da enzima em catalisar a reação do superóxido (O<sup>2-</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a partir da diminuição da auto-oxidação do pirogalol (HEART, 2015). Foram adicionados 99 µl de tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7.0) à 30 µl de amostra. A reação teve início com a adição de 15 µl de pirogalol (100 µmol/L). A leitura da absorvância foi realizada em leitor de microplacas a 570 nm. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

### 2.2.3. Atividade da Catalase

A atividade da Catalase (CAT) foi mensurada de acordo com Aebi (1984), utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como substrato. Foi adicionado 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à reação contendo 10  $\mu\text{l}$  de amostra e 1 mL de tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7.0). A atividade de CAT foi definida pela degradação da enzima pelo peróxido de hidrogênio. A leitura foi monitorada a 240 nm durante 1 minuto com intervalos de 30 segundos. Um coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{240} = 0.036 \text{ mmol/L cm}$  foi utilizado nos cálculos. Os resultados foram expressos em U CAT/mg de proteína.

### 2.2.4. Determinação de Malondialdeído

A peroxidação lipídica foi mensurada de acordo com Buege e Aust (1975). A análise avalia a formação do Malondialdeído total, com a utilização de um marcador da peroxidação lipídica. Para a realização desse procedimento foram necessários, 0,2 mL do sobrenadante dos tecidos que foram homogeneizados em 0,4 mL de solução a base de ácido tricloroacético (TCA, 15%) / ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,375%) / ácido clorídrico (HCl, 0,6%) vortexados. A mistura passou por 40 minutos em banho maria a 90°C. Depois de esfriar sobre o gelo, foram adicionados 0,6 mL de álcool butanol e o soluto foi vortexado por 2 minutos e centrifugado durante 10 minutos a 9000 g. A absorbância foi lida a 535 nm em espectrofotômetro de varredura de microplacas. A concentração de MDA foi determinada usando curva padrão de concentrações conhecidas de 1,1,3,-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  por mg de proteína.

### 2.2.5. Oxidação de proteínas (Proteínas carboniladas)

A oxidação de proteínas foi mensurada pelo método de Levine et al., (1994), no qual se utiliza os pellets obtidos após a homogeneização dos tecidos. A análise consiste na reação dos grupos carbonilas com o DNPH. Os pellets foram suspensos com TCA a 10%, gelado, e em seguida, centrifugados (5000 g durante 10 min a 4°C). O sobrenadante foi retirado, adicionando 0,5 mL de solução DNPH 10mmol/L diluída em ácido clorídrico (7%), misturado em vórtex e mantidos à temperatura ambiente no escuro durante 30 minutos e agitadas periodicamente. Posteriormente, 0,5 mL de TCA gelado foi adicionado em cada tubo. O precipitado é novamente centrifugado e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de Acetato

de Etila e Etanol (1:1 v/v). Então, 1 mL de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 6% foi adicionado em cada tubo. Os tubos foram, por fim, centrifugados com a finalidade de se dissolver os pellets, e o sobrenadante foi mensurado pela absorvância de 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mL de proteína com base no coeficiente de extinção molar de  $\epsilon_{370} = 22 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$ .

### 2.2.6. Análise de proteína total

A proteína total foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Os dados bioquímicos referentes às análises de SOD, CAT, e MDA descritos acima foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante.

### 2.3. Histopatologia

Para as análises histopatológicas foram coletados 113 animais de 6 espécies diferentes. Destes, 34 indivíduos são provenientes de áreas de referência (AR) e foram coletados em 5 localidades diferentes (BAR01, BAR03, BAR04, BAR06 e BAR19) e os outros 79 indivíduos foram coletados em 10 localidades de áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI) (BA07, BA08, BA09, BA10, BA11, BA14, BA16, BA18, BA20 e BA21). Como algumas espécies ocorreram em mais de uma localidade, foram formados 20 grupos amostrais, que contemplam todas as espécies que ocorreram em todas as localidades (Tabela 2). De todos os animais foram coletadas amostras de brânquias, fígado, músculo e gônadas para a realização das lâminas.

Tabela 2: Distribuição do número de indivíduos por espécie coletados nos pontos de áreas de referência (AR) e de áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI) para as análises histopatológicas.

Área	Ponto	Espécie	Total de indivíduos
Área de referência (AR)	BAR01	<i>Astyanax rivularis</i>	6
	BAR03	<i>Astyanax bimaculatus</i>	7
	BAR04	<i>Astyanax bimaculatus</i>	3
		<i>Tetragonopterus chalceus</i>	5
	BAR06	<i>Psalidodon fasciatus</i>	6
	BAR19	<i>Astyanax bimaculatus</i>	7
	BA07	<i>Psalidodon fasciatus</i>	6

	BA08	<i>Astyanax bimaculatus</i>	6
	BA09	<i>Psalidodon fasciatus</i>	7
	BA10	<i>Astyanax bimaculatus</i>	8
		<i>Psalidodon fasciatus</i>	6
Área diretamente afetadas/Áreas impactadas (ADA/AI)	BA11	<i>Psalidodon fasciatus</i>	6
	BA14	<i>Astyanax bimaculatus</i>	5
		<i>Tetragonopterus chalceus</i>	6
	BA16	<i>Astyanax bimaculatus</i>	5
	BA18	<i>Psalidodon fasciatus</i>	6
	BA20	<i>Moenkhausia costae</i>	6
		<i>Orthospinus franciscencis</i>	5
	BA21	<i>Astyanax bimaculatus</i>	4
<i>Orthospinus franciscencis</i>		3	
Total Geral			113

#### 2.4. Análises histopatológicas

Após 24 h de fixação em Bouin, as espécies foram armazenadas em etanol 70%. Os órgãos fígados, brânquias, músculos e gônadas foram retirados de todos os animais, separados e identificados de acordo com cada sítio amostral. Foi realizado um pool dos órgãos de cada espécie para passarem por desidratações crescentes em etanol (80, 90 e 100%) e serem embebidos em metacrilato de glicol (Historesin®, Leica) para realizar a inclusão do material. Após a inclusão, os materiais foram colados em blocos de madeira para a realização de secções semi-seriadas com a espessura de 3 µm no micrótomo rotativo (RM2265 – LEICA). Para evitar a análise repetida dos constituintes analisados dos tecidos, secções semi-seriadas foram realizadas aproveitando um a cada dez cortes.

As lâminas contendo os cortes do fígado foram corados com reagente de hematoxilina-Eosina (HE) para a verificação da presença de modificações teciduais, entre elas, congestões vasculares, hemorragias, isquemias, infiltrado inflamatório (inflamação) e degenerações citoplasmáticas (esteatose). Além disso, foi realizada a coloração de Picro-Sirius para avaliação de fibrose no tecido hepático em microscópio

com lente polarizadora. Essa coloração é baseada na birrefringência das fibras colágenas, com o colágeno do tipo I corando-se em vermelho e o colágeno do tipo III corando-se em verde. Um aumento na quantidade de colágeno tipo I pode ser um indicativo de fibrose e remodelação tecidual após intensa atividade de morte celular (Kisseleva & Brenner, 2020). Foi, ainda, realizada a coloração histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para avaliar o metabolismo do fígado através da dosagem do conteúdo de glicogênio.

Nas brânquias foi realizada a coloração com Azul de Toluidina e foram avaliadas as seguintes alterações histopatológicas: hiperplasia lamelar e interlamelar, deleção do epitélio lamelar secundário, fusão lamelar, destacamento epitelial, aneurismas e dilatação do seio venoso central. Todas estas alterações, quando encontradas, demonstram dificuldade nas trocas gasosas dos peixes e consequentemente dificuldade de manter o metabolismo normal e a homeostase. As gônadas também foram coradas com azul de toluidina foram analisadas as seguintes alterações: atresia, degenerações (esteatose) e necrose.

Nos músculos foi realizado a coloração com reagente Hematoxilina-Eosina (H.E) para visualização das fibras em corte vertical e medição da área da secção vertical das fibras através do Software Image Pro-Plus para avaliar se houve algum tipo de patologia associado a hipertrofia/hipotrofia das fibras musculares nas áreas estudadas.

A visualização das lâminas e a captação das imagens foram realizadas por meio do microscópio de luz BX-60® (Olympus, São Paulo, Brasil) acoplado a uma câmera fotográfica digital modelo QColor-3® (Olympus, São Paulo, Brasil). Para cada corte foram obtidas, de forma randomizada, 10 imagens com resolução de 2048 X 1536 pixels, com objetiva de 40x para fígado e brânquias e 20x para gônadas e músculos, totalizando 60 imagens por grupo e 1200 imagens por coloração. A partir das imagens digitalizadas, foi realizada a contagem das diferentes estruturas celulares e extracelulares de todos os tecidos com o uso de uma grade de 300 intersecções associada ao software de análise de imagens Image Pro-plus 4.5 (Media Cybernetics®, Silver Spring, USA). Ao fim desta análise foi possível avaliar qual a porcentagem de patologias presentes em cada fotomicrografia, considerando 300 pontos de intersecções 100% e assim estimar a frequência de aparecimentos das patologias descritas acima.

## 2.5. Análise estatística

Para avaliação das histopatologias, todas as amostras obtidas referentes às 6 espécies amostradas foram avaliadas nas áreas ADA/AI e AR, e as variáveis de resposta foram transformadas em log, quando necessário, para reduzir a assimetria residual. Todos os modelos estatísticos usaram distribuição normal e foram executados em R (R Core Team, 2022). Para avaliar os dados histopatológicos, foram ajustadas ANOVAS one-way. Foram usados modelos lineares generalizados de efeitos mistos (GLMMs) com local de amostragem como fator aleatório, em seguida, foi testado o desempenho dos fatores aleatórios por meio da simplificação do modelo usando o critério de Informação de Akaike (AIC). Para avaliar qual sítio amostral se diferencia dos demais foi utilizado a análise contrastes múltiplos GrandMean do pacote multcomp” (Hothorn et al., 2008). Quando não houve necessidade de inserir o efeito o misto, os modelos foram comparados usando teste F, quando houve necessidade de inserir o efeito misto, os modelos foram comparados usando qui-quadrado (Ferreira et al., 2020; Ferreira, 2022). Modelo usado conforme equação abaixo:

$$Y \sim \text{Area} + (1|\text{Ponto de amostragem}) + \varepsilon \quad (\text{eq. 1})$$

onde Y: análise histopatológica (log-transformado); Area (fator explicativo de dois níveis; (1| Ponto de amostragem): fatores aleatórios;  $\varepsilon$ : resíduo. Ao incluir estes interceptos aleatórios, a estrutura hierárquica, aninhada (Zuur et al., 2009), desbalanceada de nossos dados foi totalmente tratada (Pinheiro et al., 2014). Para avaliar o efeito dos dados desbalanceados nas análises estatísticas, realizamos o bootstrap com 1000 interações, retirando amostras igual a quantidade de indivíduos encontrados em menor quantidade em cada análise por área em cada interação. A amostragem bootstrap nos permitiu gerar aleatoriamente valores de p de forma empírica. Em cada amostra de bootstrap, testes de GLMM/GLM foram executados com 1000 interações para avaliar as diferenças entre as áreas (Bernardes et al., 2022). Os valores encontrados foram colocados em uma tabela para a validação dos valores de p encontrados. (Quadro Suplementar 1).

Foram usados os pacotes glmmTMB (Mollie et al., 2017), car (John Fox & Sanford Weisberg, 2019), ggplot2 (Wickham, 2016). Para as análises referentes ao estresse oxidativo, os dados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. Para

as comparações entre os grupos foi realizado o teste t de student, considerando  $p < 0.05$  como significativo.

Para as análises das brânquias, foram utilizados modelos lineares generalizados de efeitos mistos (GLMMs) com distribuição binomial negativa. Este procedimento é adequado para contar dados e evitar a superdispersão (alta deviance residual em relação aos graus de liberdade residuais) (Crawley, 2012). Em cada GLMM, a análise da brânquia foi a variável dependente e a área foi a variável explicativa. Quando não houve ajuste nos modelos, foi usado o teste de Wilcoxon\Mann-Whitney, para comparar as áreas. As diferenças entre os sítios de coleta foram avaliadas com análises de contraste pareadas, por simplificação gradual do modelo e níveis de agrupamento que não foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) (Crawley, 2012).

### 3. RESULTADOS

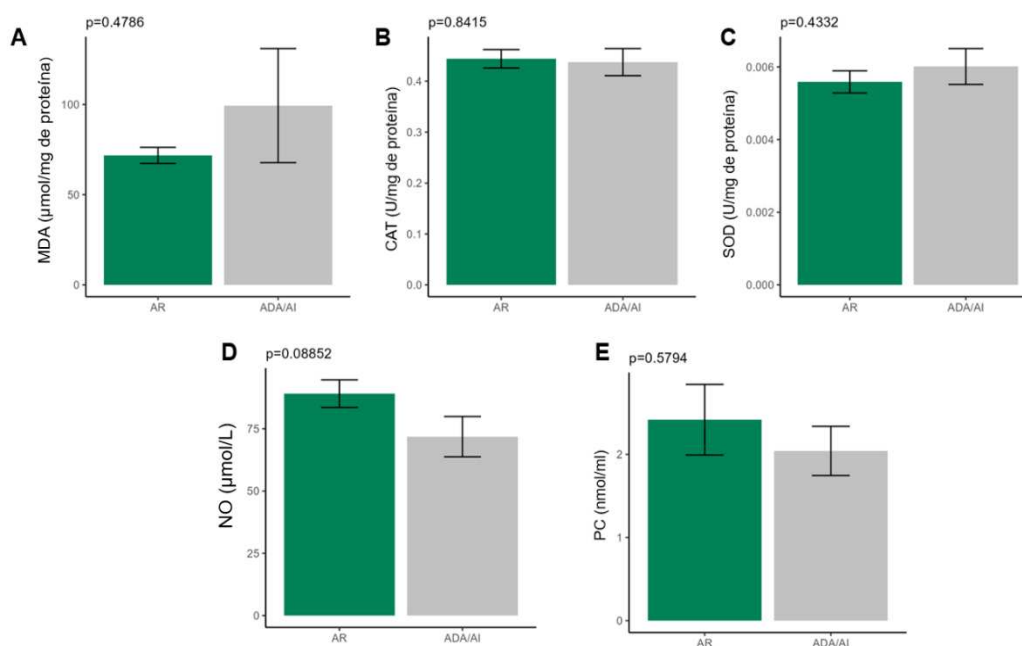
#### 3.1. *Análises de estresse oxidativo*

##### 3.1.1. *Brânquias*

Em relação ao estresse oxidativo, os valores obtidos para as 6 espécies amostradas em ambas as áreas foram considerados compatíveis com os valores de outros caracídeos observados na literatura. Dessa forma, não houve valores mais elevados de marcadores de danos oxidativos (especialmente PC) nas amostras de brânquias coletadas (PC:  $2.30 \pm 0.98$  nmol/mL) quando comparadas com valores encontrados na literatura para *Astyanax bimaculatus*, espécie com maior quantidade de dados disponíveis (PC:  $3.86 \pm 0.47$  nmol/mL). Avaliações do estresse oxidativo requerem comparações com controles, portanto consideramos as áreas AR como áreas de menor interferência para fins de comparações.

Para as análises de estresse oxidativo, não foram observadas diferenças significativas entre peixes das duas áreas amostradas em relação à produção de enzimas antioxidantes ou de danos oxidativos (maiores níveis de NO, MDA e PC) causados pelas espécies reativas de oxigênio nas brânquias (Fig. 1).

Figura 1. Quantidade de marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes em análises de balanço oxidativo nas brânquias. (A) Malondialdeído, (B) Catalase, (C) Superóxido Dismutase, (D) Óxido Nítrico e (E) Proteínas Carboniladas. Gráfico gerado por Teste T. Efeito significativo ( $p < 0,05$ ) representado por \*, efeito significativo ( $p < 0,01$ ) representado por \*\* e efeito significativo ( $p < 0,001$ ) representado por \*\*\*.

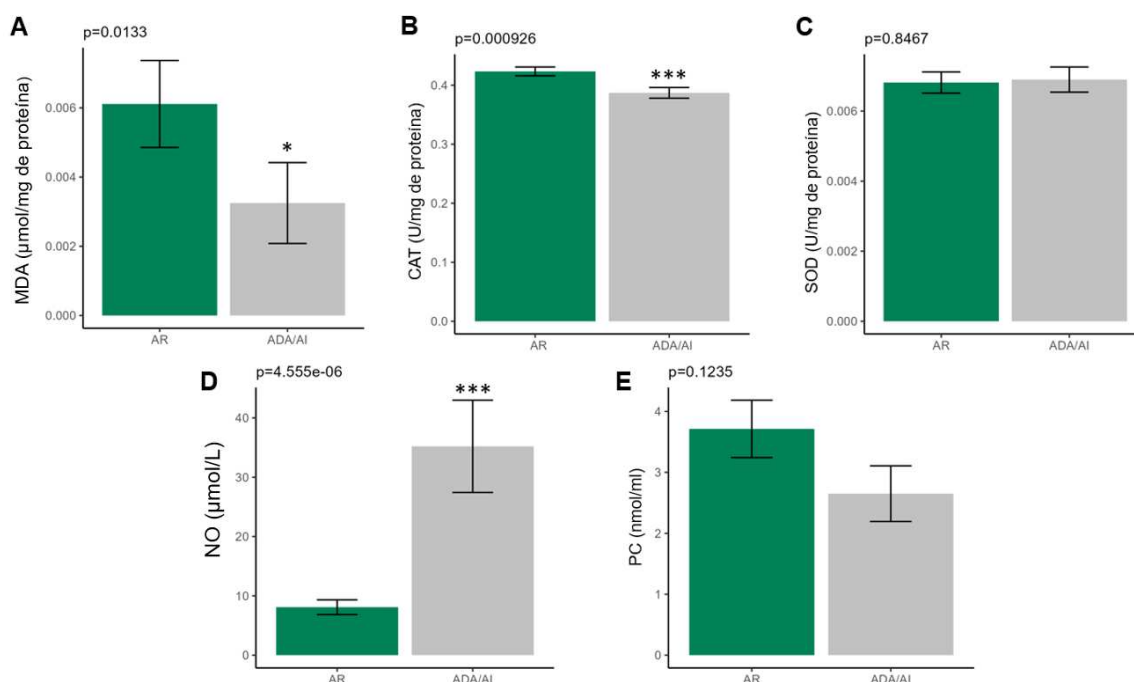


### 3.1.2. Músculos

Nos músculos os valores obtidos para as 6 espécies amostradas em ambas as áreas foram considerados compatíveis com os valores observados na literatura para outros caracídeos. Assim, não houve valores mais elevados de marcadores de danos oxidativos (MDA e PC) nas amostras de músculos coletadas (MDA:  $0.006 \pm 0.003$  µmol /mg de proteína e PC:  $3.80 \pm 2,98$  nmol/mL) quando comparadas com valores encontrados para *Astyanax bimaculatus*, a espécie com maior quantidade de dados disponíveis na literatura (MDA:  $0.13 \pm 0.04$  e PC:  $3,5 \pm 5,0$  nmol/mL).

Foram observadas menor quantidade da enzima antioxidante catalase e menor quantidade do marcador de estresse oxidativo malondialdeído nos peixes das áreas diretamente afetada e de influência (ADA/AI), quando comparados com a área de referência (AR). Além disso, foram observados maiores níveis de óxido nítrico nos músculos dos peixes dessas mesmas áreas (Fig. 2).

Figura 2. Quantidade de marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes em análises de balanço oxidativo nos músculos. (A) Malondialdeído, (B) Catalase, (C) Superóxido Dismutase, (D) Óxido Nítrico e (E) Proteínas Carboniladas. Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLMM. Gráfico gerado por Teste T. Efeito significativo ( $p < 0,05$ ) representado por \*, efeito significativo ( $p < 0,01$ ) representado por \*\* e efeito significativo ( $p < 0,001$ ) representado por \*\*\*.



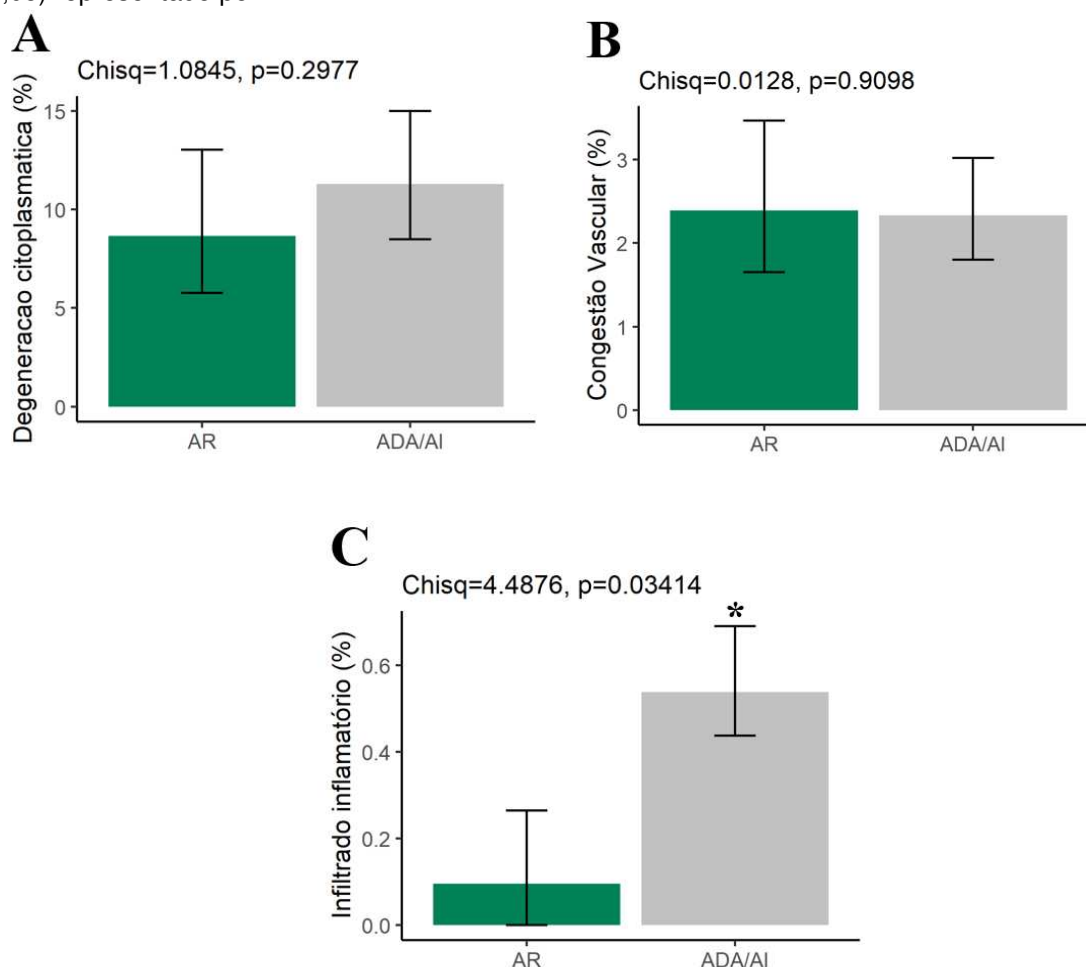
### 3.2. Histopatologias hepáticas

Considerando todos os animais analisados foi observado cerca de 10% de degeneração hepática, 2% de congestão vascular e cerca de 0.3% de infiltrado inflamatório no fígado. Também observamos baixa porcentagem de fibrose (porcentagem de fibras de colágeno menor que 0.5%) e porcentagem de glicogênio normal para vertebrados. Estes resultados indicam a presença de pequenas alterações hepáticas transitórias no cômputo geral de amostras, que não representam danos histopatológicos irreversíveis nos animais.

Para as histopatologias descritas no fígado – degeneração citoplasmática (esteatose), congestão vascular e infiltrado inflamatório – houve diferença significativa apenas na quantidade de infiltrado inflamatório nos grupos de animais encontrados em áreas afetadas (ADA/AI) quando comparados com tecidos obtidos de animais de área referência (AR) (Figuras 3 e 6). Apesar das alterações histopatológicas encontradas, não foram observados fígados com hemorragias e isquemias, o que indica que possivelmente não houve a evolução da congestão vascular para tais patologias.

Figura 3: Porcentagem de histopatologias encontradas em fígado de peixes em áreas de referência (AR) e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI); (A) Degenerações citoplasmáticas (esteatose); (B) congestões vasculares; (C) infiltrados inflamatórios. Gráficos gerados pelos valores

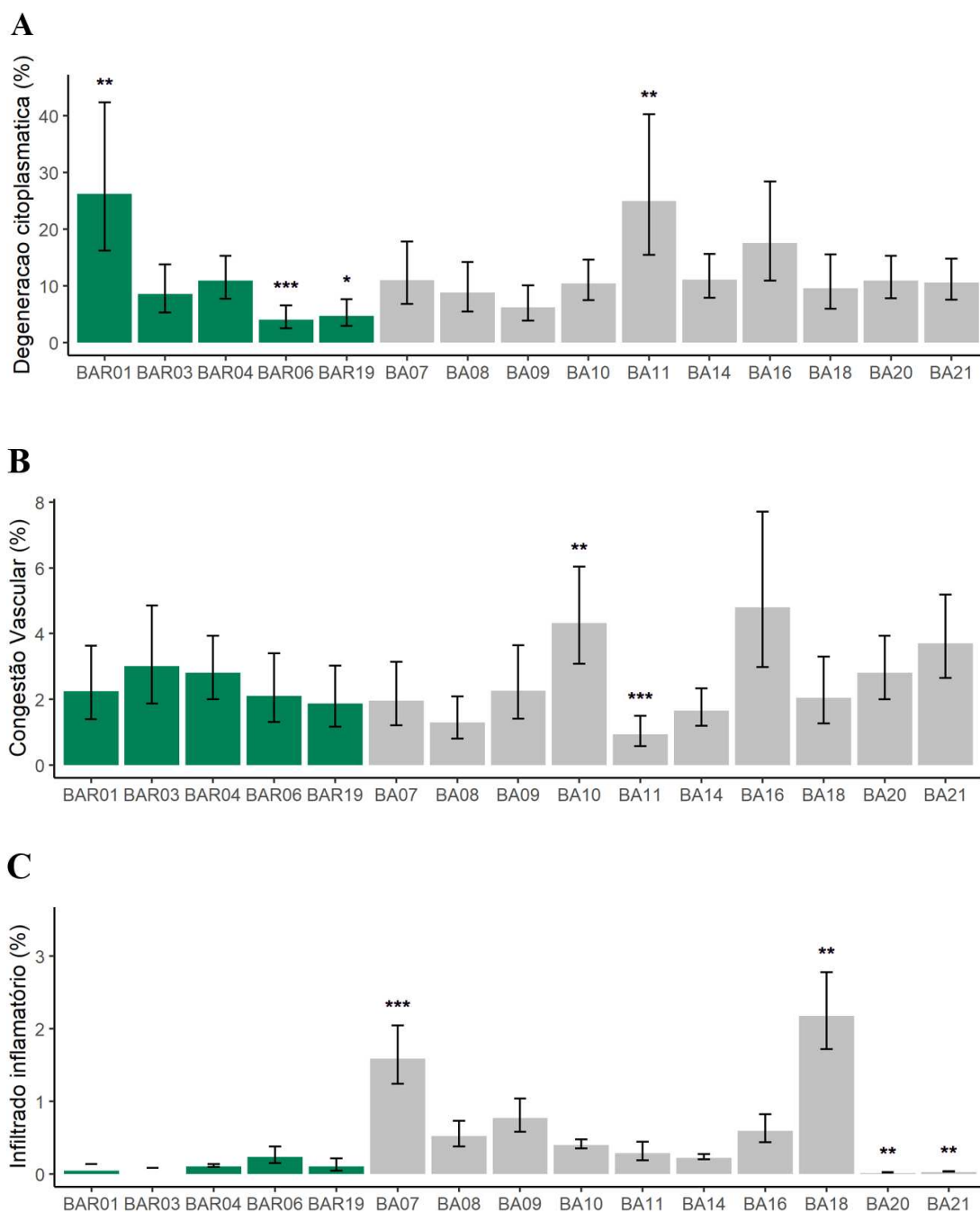
preditos dentro do modelo GLMM ( $\log(\text{dano histopatológico}) \sim (\text{Area}) + (1|\text{Ponto})$ ). Efeito significativo ( $p < 0,05$ ) representado por \*.



### 3.2.1. Pontos de coleta

Em relação a cada ponto de coleta, foram observadas maior porcentagem de degeneração citoplasmática nos tecidos de animais dos pontos BA11 e BAR01 e menor porcentagem dessa alteração nos tecidos de animais dos pontos BAR06 e BAR19. Observou-se maior congestão vascular em animais do ponto BA10, e menor no ponto BA11, comparados aos demais pontos de coleta. Para infiltrado inflamatório, a maior porcentagem foi observada nos pontos BA07 e BA18 e a menor porcentagem nos pontos BA20 e BA21 (Figura 4).

Figura 4: Porcentagem de histopatologias encontradas em fígado de peixes nos diferentes pontos de coleta de áreas de referência (AR) e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI). (A) Degenerações citoplasmáticas (esteatoses); (B) congestões vasculares; (C) infiltrados inflamatórios. Gráficos gerados pela comparação de cada ponto de coleta com a média geral de todos os pontos. Teste  $\text{GrandMean glmm}(\log(\text{dano histopatológico}) \sim \text{Ponto})$  com Teste F significativo em  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$ (\*\*)  $p < 0,001$ (\*\*\*).



### 3.2.2. Espécies

As análises por comparação de espécies foram realizadas apenas nas espécies que foram encontradas em ambas as localidades (AR e ADA/AI). Desta forma, observou-se maior porcentagem de regiões teciduais com infiltrado inflamatório nas espécies *Astyanax bimaculatus* e *Psalidodon fasciatus* dos pontos localizados em ADA/AI, quando comparado com essas mesmas espécies coletadas na área de referência (AR). Para a espécie *Tetragonopterus chalceus* foi observada maior

porcentagem de degenerações citoplasmáticas nos pontos localizados em ADA/AI quando comparado com os pontos da AR (Figura 5).

Figura 5: Porcentagem de histopatologias encontradas em fígado das espécies *Astyanax bimaculatus*, *Psalidodon fasciatus* e *Tetragonopterus chalceus* em áreas de referência (AR) e áreas diretamente impactadas e de influências (ADA/AI). Nos gráficos é possível observar as porcentagens de degenerações citoplasmáticas, congestão vascular e infiltrado inflamatório para *Astyanax bimaculatus* (A); *Psalidodon fasciatus* (B); *Tetragonopterus chalceus* (C). Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo glm (log(histopatologia)~(Area)). \*Efeito significativo  $p < 0,05$ .

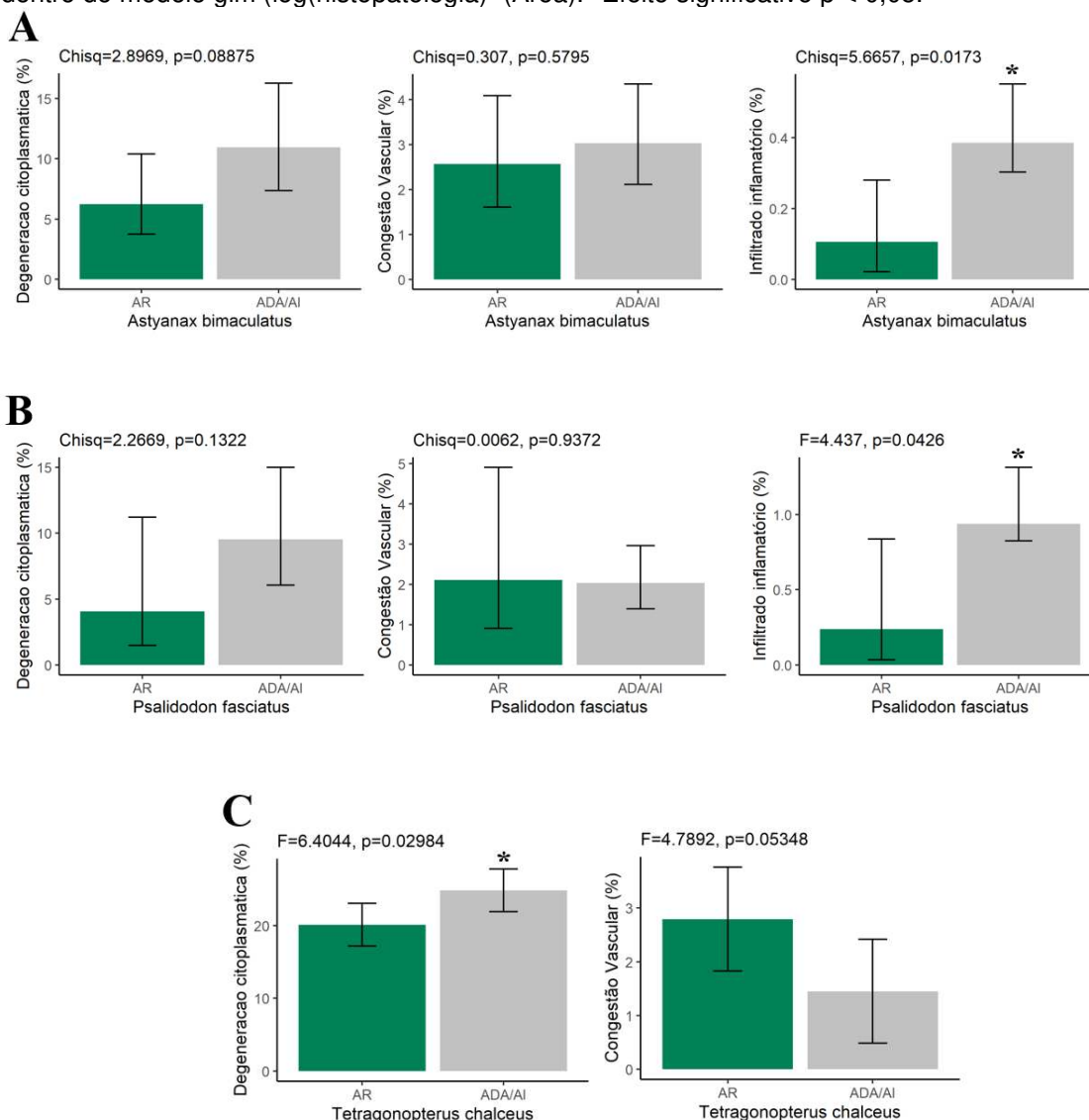
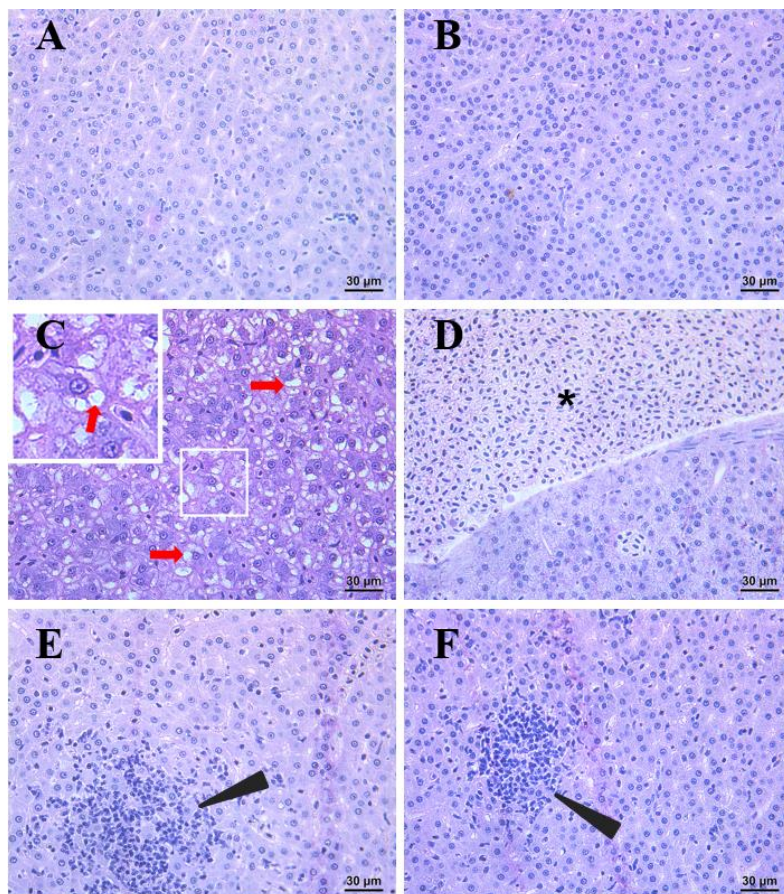


Figura 6: Fotomicrografias obtidas usando objetiva de 40x representando as histopatologias encontradas no fígado de peixes de áreas de referência (AR) em (A) e (B) e em áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI) em (C), (D), (E) e (F). Degenerações citoplasmáticas (esteatoses) indicadas pela seta vermelha; congestão vascular representada pelo asterisco; infiltrado inflamatório indicado pela ponta da seta. Coloração em hematoxilina-eosina (HE).



### 3.3. Glicogênio hepático

Para demonstrar que não houve nenhuma alteração na função hepática foram realizadas análises para quantificar o armazenamento de glicogênio hepático dos peixes da área de referência (AR) quando comparados com os peixes das áreas afetadas (ADA/AI) (Fig. 7 e 8). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na produção/armazenamento de glicogênio entre as áreas amostradas.

Figura 7: Porcentagem de glicogênio armazenado no fígado de peixes de áreas de referência (AR) e de peixes de áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI). Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLMM (dano histopatológico)  $\sim(\text{Area})+(1|\text{Ponto})$ . \*Efeito significativo  $p < 0,05$ .

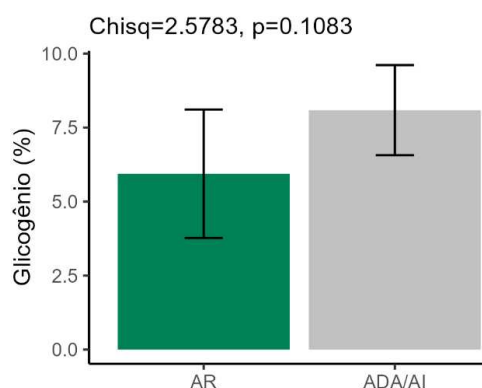
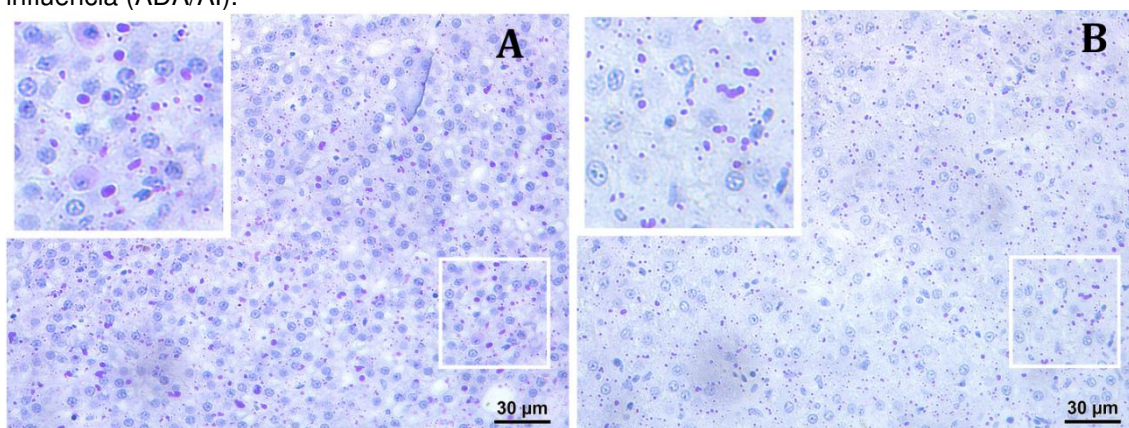


Figura 8: Fotomicrografias obtidas usando objetiva de 40x representando a coloração de Ácido Período de Schiff (PAS) para identificação de armazenamento de glicogênio no fígado. O glicogênio nessa coloração se apresenta como acúmulos na cor púrpura dentro das células hepáticas. Em (A) observa-se o fígado de peixes de áreas de referência (AR) e em (B) peixes de áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI).



### 3.4. Colágeno Tipo I e III no fígado (Fibrose)

A quantificação de colágeno do tipo I e do tipo III usando Picro-Sirius pode evidenciar um processo de fibrose relacionado ao remodelamento tecidual após grande quantidade de morte celular. Nessa técnica, a marcação em vermelho e amarelo indica fibras colágenas do tipo I, que estão mais diretamente relacionadas à fibrose e a marcação em verde indica fibras colágenas do tipo III, menos relacionadas ao processo fibrótico. Os resultados encontrados não apresentaram diferenças significativas entre as regiões amostradas, sugerindo não haver evolução das lesões para quadros irreversíveis (necrose ou apoptose) (Fig. 9 e 10).

Figura 9: Porcentagem de fibras colágenas encontradas no fígado de peixes de Áreas de referências (AR) e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI). Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLM/GLMM: (Colágeno)~(Area). // (dano histopatológico)~(Area)+(1|Ponto)). \*Efeito significativo  $p < 0,05$ .

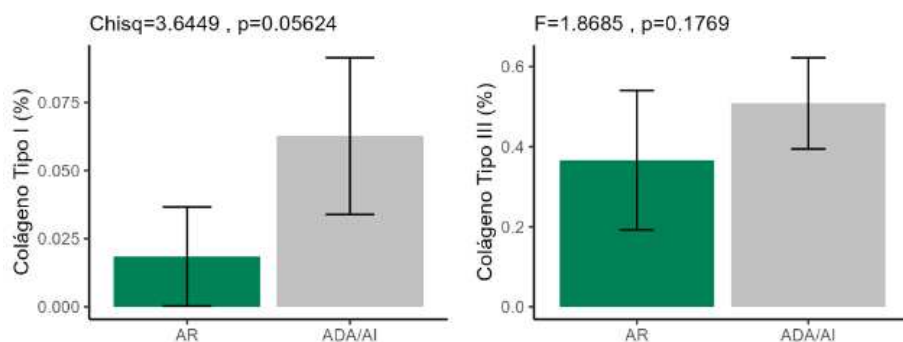
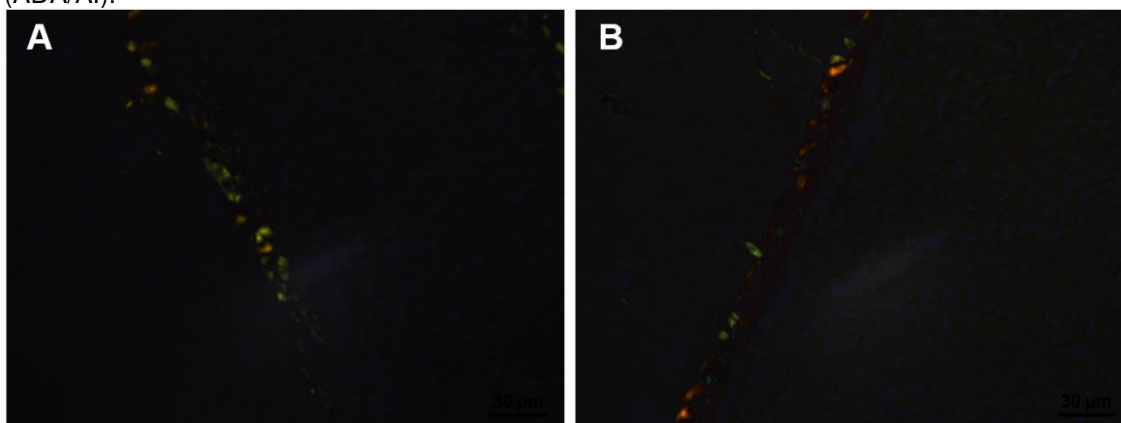


Figura 10: Fotomicrografias obtidas usando objetiva de 40x após coloração com Sirius-Red para identificação de fibras colágenas tipo I (pontos em vermelho) e tipo III (pontos em verde). Esta é uma metodologia para observar fibrose hepática, histopatologia encontrada no fígado, baseada na diferença de birefringência das fibras colágenas, com o colágeno do tipo I corando em vermelho (Indicativo de fibrose após morte celular) e o colágeno do tipo III corando-se em verde. Em (A) observa-se o fígado de peixes de áreas de referência (AR) e em (B) peixes de áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI).



### 3.4. Histopatologias Branquiais

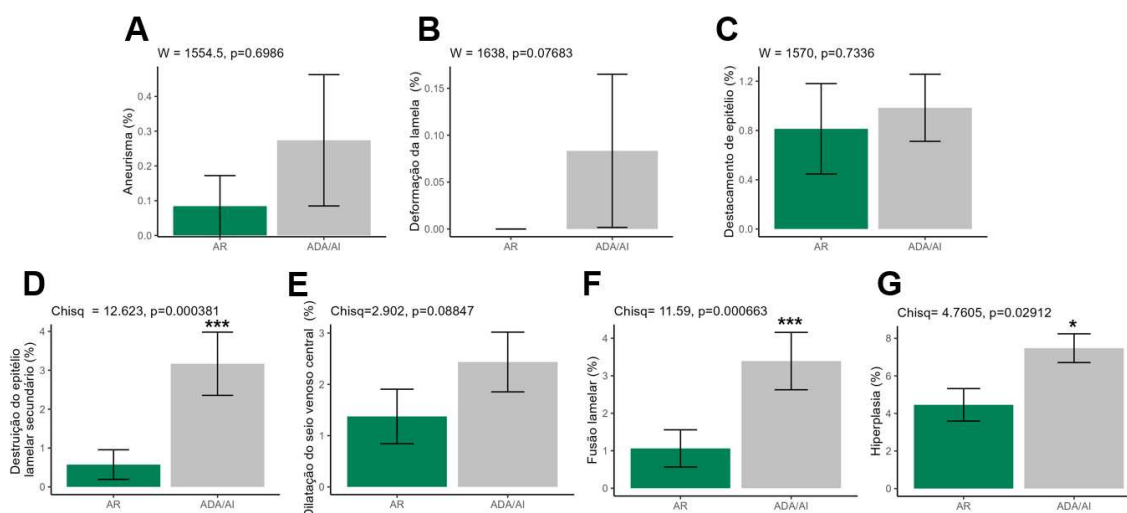
Considerando todos os tecidos animais utilizados para esta descrição de linha de base e todas as 6 espécies amostradas, as brânquias representaram o tecido com maior quantidade de alterações histopatológicas nos animais, em comparação com os outros tecidos avaliados. As histopatologias mais encontradas foram: destacamento da lamela secundária (1-3%), dilatação do seio venoso (1-2%), fusão lamelar (1-3%), hiperplasia (4-7%) e destruição do epitélio lamelar secundário (4-7%) (Figura 11). Porém, nas proporções observadas, estas alterações são consideradas transitórias e suas incidências são esperadas na ictiofauna silvestre.

Mesmo considerando que todas as áreas amostradas (ADA/AI e AR) não apresentam alterações referentes a impactos diretos de rompimento de barragens, as duas áreas foram comparadas para efeito de avaliação da saúde dos animais à

jusante da barragem e em áreas livres de qualquer influência direta da barragem no curso do rio.

Entre as áreas, a avaliação histopatológica das brânquias mostrou maior quantidade de alterações nos peixes provenientes das áreas ADA/AI quando comparados com os peixes da AR. Essas alterações incluem maior degeneração tecidual por destruição total do epitélio lamelar secundário, fusão de lamelas secundárias e hiperplasia das lamelas secundárias (Fig. 11). Em relação às alterações vasculares e irreversíveis, não foram observados hemorragias, isquemias ou processos de morte celular (necrose/apoptose) nas brânquias analisadas. Aneurisma, destacamento de epitélio e dilatação do seio venoso central foram observados tanto em AR, quanto em ADA/AI, porém sem diferença significativa. Deformação de lamela foi uma alteração observada apenas em brânquias de animais da ADA/AI (Fig. 11).

Figura 11: Porcentagem de histopatologias encontradas nas brânquias de peixes em áreas de referência (AR) e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI). (A) aneurismas; (B) deformações lamelares; (C) destacamento de epitélios; (D) epitélios lamelares secundários destruídos; (E) seios venosos centrais dilatados; (F) fusões lamelares; (G) hiperplasias. Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLMM (dano histopatológico)  $\sim$ (Area)+(1|Ponto)). Efeito significativo ( $p < 0,05$ ) representado por \* e efeito significativo ( $p < 0,001$ ) representado por \*\*\*.

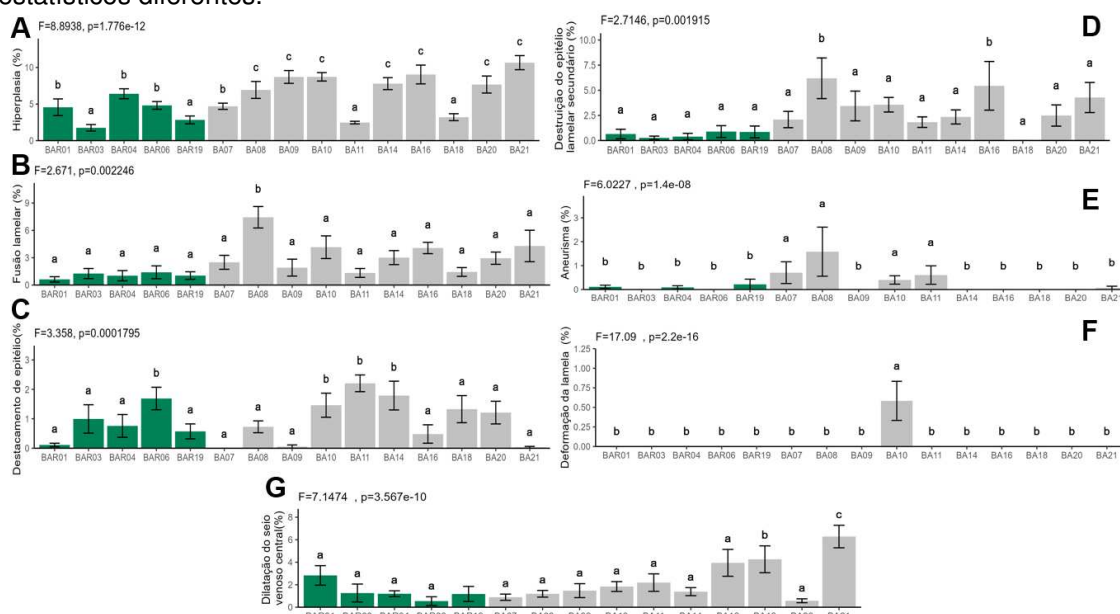


### 3.4.1. Pontos de coleta

Em relação aos pontos de coleta, houve maior porcentagem de hiperplasia nos pontos BA08, BA09, BA10, BA14, BA16, BA20 e BA21 em comparação com os outros pontos de coleta. Entretanto, os pontos BAR01, BAR04, BAR06 e BA07 também foram estatisticamente diferentes do restante. Para a variável de fusão

lamelar, apenas o ponto BA08 apresentou diferença estatística em relação aos demais pontos, com maior porcentagem dessa alteração morfológica. Em relação ao destacamento de epitélio, houve maior porcentagem nos pontos BA10, BA11, BA14 e BAR06. A destruição do epitélio lamelar secundário das brânquias foi estatisticamente maior nos pontos BA08 e BA16 quando comparados com os demais. Peixes dos pontos BA07, BA08, BA10 e BA11 apresentaram maior porcentagem de aneurismas no tecido branquial. Apenas as amostras do ponto BA10 apresentaram deformação da lamela. Maior dilatação do seio venoso central foi observada nos animais dos pontos BA18 e BA21, quando comparados com os peixes dos outros pontos, sendo que esse parâmetro foi significativamente maior em BA21 do que em BA18 (Fig. 12).

Figura 12: Porcentagem de histopatologias encontradas nas brânquias de peixes em diferentes pontos de coleta classificados como áreas de referência (AR) em verde e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI) em cinza. (A) Hiperplasias (B) fusões lamelar (C) destacamento de epitélios (D) epitélios lamelares secundários destruídos (E) aneurismas (F) deformações lamelares (G) dilatações do seio venoso central. Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLM (dano histopatológico)  $\sim$ (Area). com Teste F significativo em  $p < 0,05$ . Letras diferentes representam grupos estatísticos diferentes.



### 3.4.2. Espécies

A análise de comparação entre espécies foi realizada apenas para as espécies encontradas nas duas localidades (AR e ADA/AI). Apenas a espécie *Astyanax bimaculatus*, apresentou maior porcentagem das seguintes histopatologias; destruição do epitélio lamelar secundário (variando entre cerca de 0,5% (AR) e 4%

(ADA/AI)), fusão lamelar (variando entre cerca de 1% (AR) e 6% (ADA/AI)) e hiperplasia (variando entre cerca de 4% (AR) e 8% (ADA/AI)) (Fig. 13).

Figura 13: Porcentagem de histopatologias encontradas nas brânquias de peixes da espécie *Astyanax bimaculatus* em áreas de referência (AR) e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI). (A) aneurismas; (B) deformações lamelares; (C) destacamento de epitélios; (D) epitélios lamelares secundários destruídos; (E) seios venosos centrais dilatados; (F) fusões lamelares; (G) hiperplasias. Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLMM (dano histopatológico)  $\sim(\text{Area})+(1|\text{Ponto})$ . Efeito significativo ( $p < 0,05$ ) representado por \*, efeito significativo ( $p < 0,01$ ) representado por \*\* e efeito significativo ( $p < 0,001$ ) representado por \*\*\*.

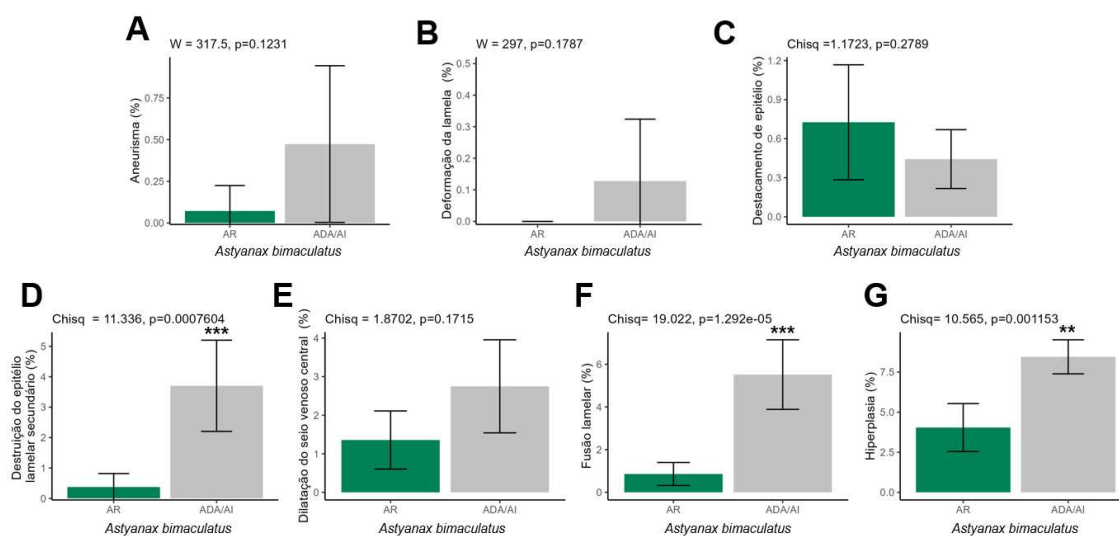
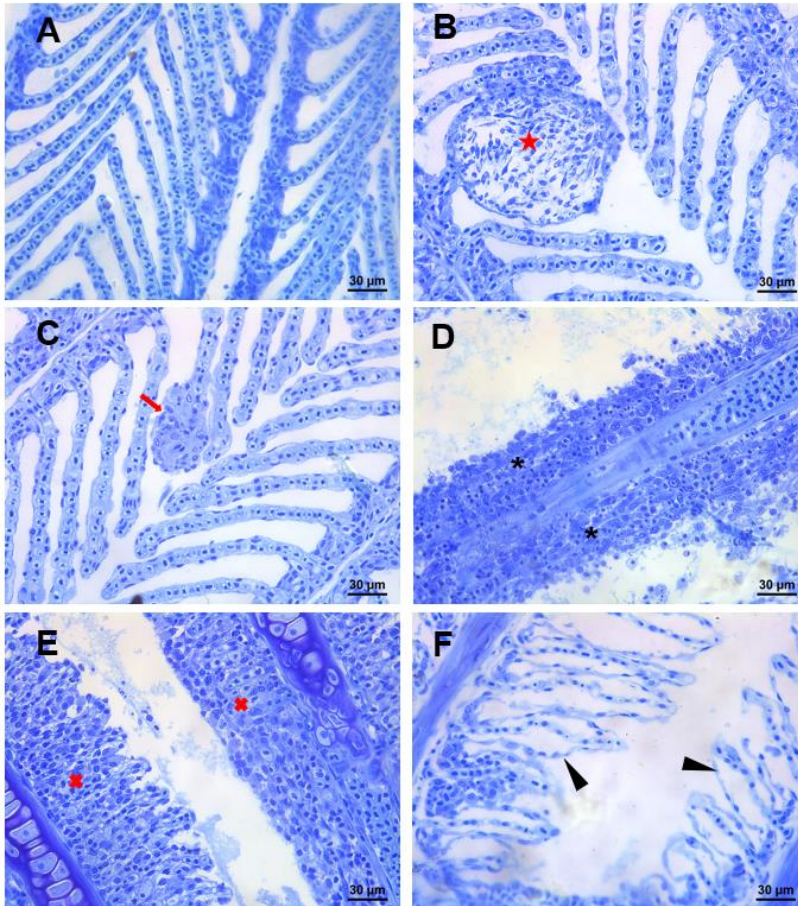


Figura 14: Imagens tiradas pela objetiva de 40x representando as histopatologias encontradas nas brânquias. Em (A) observa-se brânquias normais de áreas de referência (AR); (B) Aneurisma branquial indicado pela estrela vermelha; (C) Hiperplasia indicada pela seta vermelha; (D) deleção do epitélio lamelar secundário, indicado por asterisco; (E) fusão das lamelas secundárias, indicado pelo "X" vermelho; (F) destacamento epitelial das lamelas indicado pelas pontas das setas em áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI).

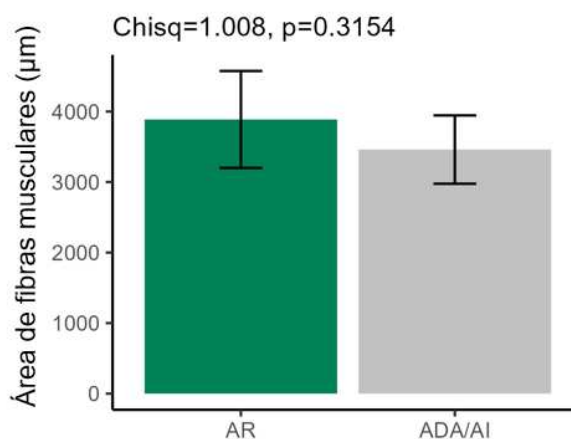


### 3.5. Área das fibras musculares

Nos músculos, de forma geral, considerando todas as amostras obtidas nas duas áreas de somadas, nenhuma patologia referente a hemorragias, isquemias, degenerações ou morte celular (necroses) foi encontrada nos indivíduos analisados.

Sendo assim, para avaliar se houve diferenças no metabolismo e consequentemente no crescimento das células musculares nas duas áreas, foi calculada a área das fibras musculares entre os animais da ADA/AI e AR. Se o tecido muscular tivesse sofrido algum estresse oxidativo devido as condições ambientais diferentes entre as áreas haveria uma grande chance de os animais sofrerem um processo de hipoplasia (diminuição no número de fibras musculares associado a um processo de hipotrofia (diminuição no diâmetro da fibra muscular). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas na área de fibras musculares em peixes em AR quando comparados com peixes das áreas ADA/AI (Fig. 15 e 18).

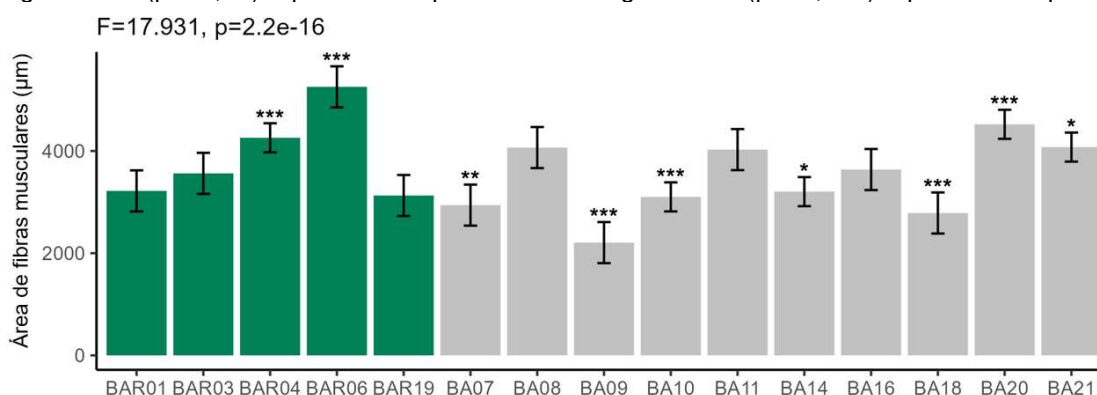
Figura 15. Área das fibras musculares de peixes em áreas de referência (AR) e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI). Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLMM (log (dano histopatológico)  $\sim$ (Area)+(1|Ponto)).



### 3.5.1. Área das fibras musculares em pontos de coleta

Em relação aos pontos de coleta, os peixes do ponto BAR06 indicaram maiores áreas de fibras musculares em relação aos outros pontos. O ponto BAR04 indicou maiores áreas de fibras musculares em comparação com os pontos de ADA/AI, com exceção do ponto BA20. Os pontos BA07, BA09, BA10, BA14, BA18 e BA21 tiveram menores áreas de fibras musculares quando comparados com o restante dos pontos, sendo o menor deles, o ponto BA09 (Fig. 16).

Figura 16. Área das fibras musculares de peixes em áreas de referência (AR) em verde e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI) em cinza. Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLM (dano histopatológico)  $\sim$ (Area). Efeito significativo ( $p < 0,05$ ) representado por \*, efeito significativo ( $p < 0,01$ ) representado por \*\* e efeito significativo ( $p < 0,001$ ) representado por \*\*\*.



### 3.5.2. Área das fibras nas espécies

Não houve diferenças em relação às espécies avaliadas no estudo e suas áreas de fibras musculares (Fig. 17).

Figura 17. Área das fibras musculares de peixes em áreas de referência (AR) em verde e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI) em cinza. (A) *Astyanax bimaculatus*; (B) *Tetragopterus chalceus*; (C) *Psalidodon fasciatus*. Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLMM ((dano histopatológico) ~ (Area)+(1|Ponto)).

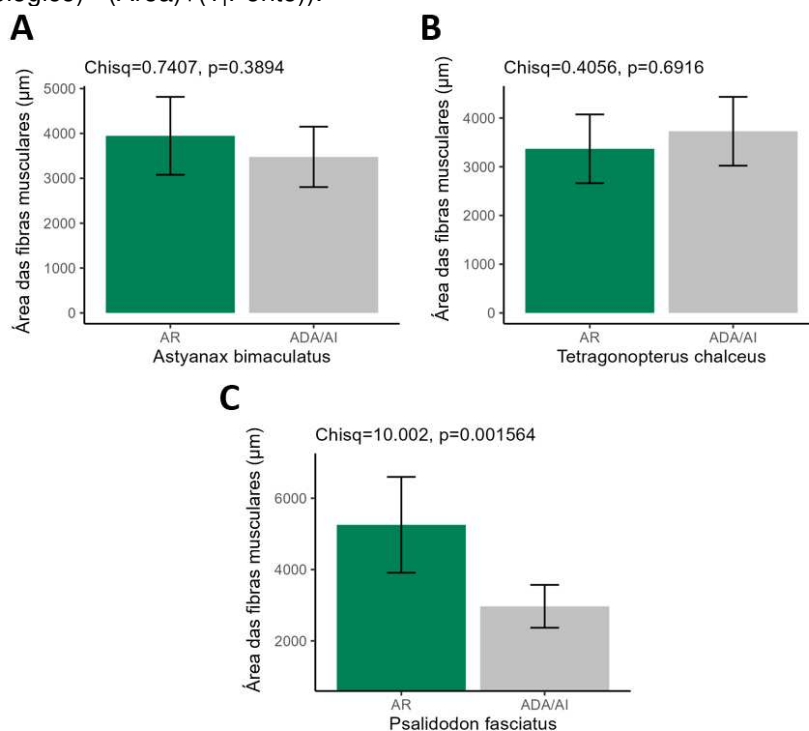
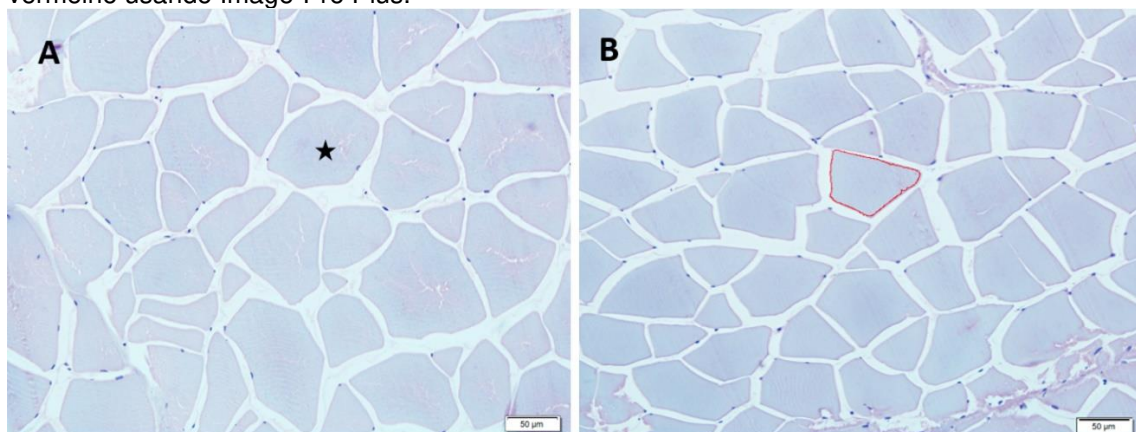


Figura 18: Imagens tiradas usando a objetiva de 20x representando as fibras musculares analisadas dos peixes das localidades AR (A) e ADA/AI (B). Na figura A pode-se observar a fibra muscular indicado pela estrela; (B) Indicação de como foi feita a avaliação da área de cada fibra circulado em vermelho usando Image-Pro Plus.



### 3.6. Histopatologias de gônadas

Tomados em conjunto, das 6 espécies analisadas em todas as áreas coletadas, os dados referentes às alterações histopatológicas de gônadas revelam uma baixa incidência de ovócitos em atresia (cerca de 2%), sugerindo o não comprometimento da saúde reprodutiva dos peixes na área de estudo.

Não foram encontradas nenhuma vacuolização e necrose nas gônadas dos peixes de AR e ADA/AI. Foram observados folículos em atresia, porém não tiveram nenhuma diferença estatística entre os grupos (Fig. 19 e 20). Entre todos os animais em que foi possível coletar as gônadas, não foram encontrados machos, apenas fêmeas, e em função disto as análises das gônadas masculinas não foram realizadas. Além disso, devido à dificuldade em se obter as gônadas, não foi feita, em especial para esse tecido, análises comparando as localidades e as espécies encontradas em ambas as regiões (AR e ADA/AI).

Figura 19. Porcentagem de ovócitos atrésicos encontrados em peixes de áreas de referência (AR) em verde e áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI) em cinza. Gráficos gerados pelos valores preditos dentro do modelo GLMM ( $\log(\text{dano histopatológico}) \sim (\text{Area}) + (1|\text{Ponto})$ ).

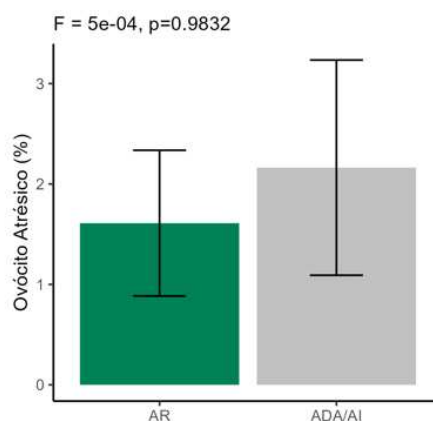
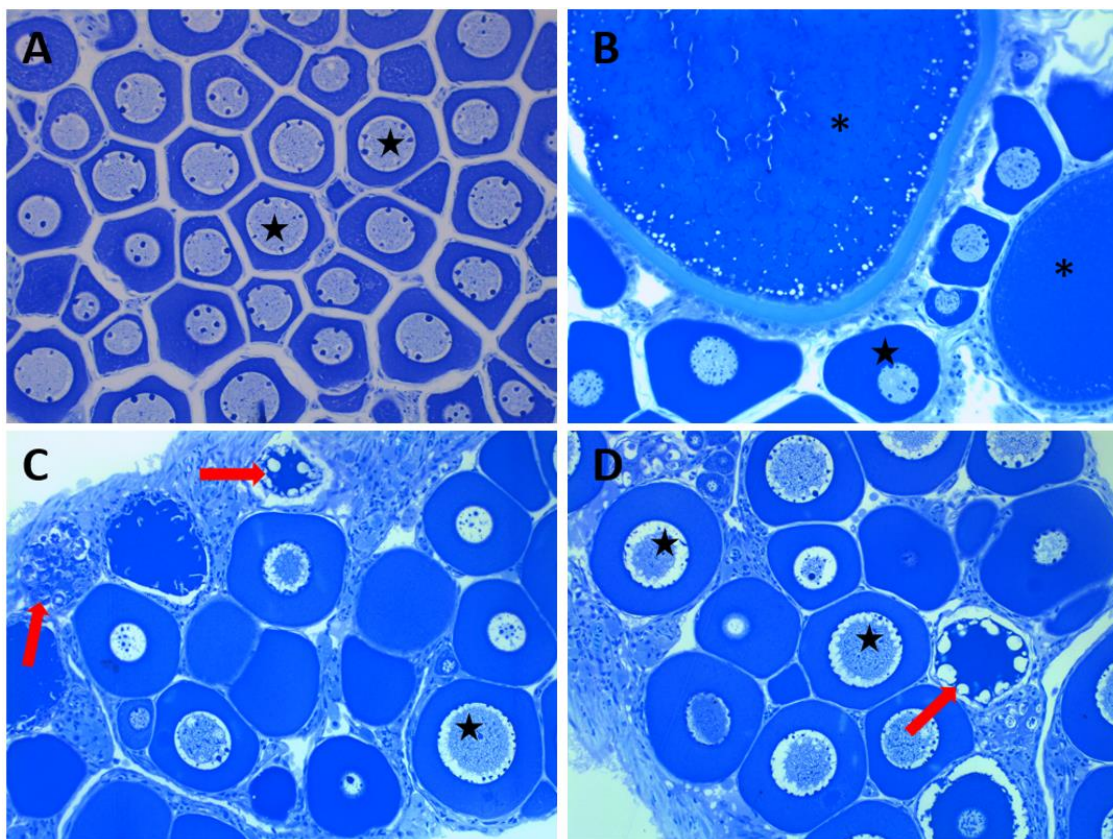


Figura 20: Imagens tiradas usando a objetiva de 20x representando as gônadas (ovários) dos peixes de áreas de referência (AR) e de áreas diretamente afetadas e de influência (ADA/AI). (A) Ovócito secundário indicado pela estrela; (B) Ovócito maduro representado pelo asterisco; (C) e (D) Ovócitos atrésicos indicados pela seta vermelha



#### 4. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo é resultado de um desbalanço entre as enzimas antioxidantes, que são as defesas naturais do organismo, e as espécies reativas de oxigênio, que são as moléculas geradas durante o processo de fosforilação oxidativa (Chowdhury & Saikia 2019). As espécies reativas de oxigênio podem ser aumentadas devido a estresses e distúrbios externos ou internos favorecendo o desbalanço desse sistema de defesa e, conseqüentemente, levando a danos nos organismos (Chowdhury & Saikia 2019). Em peixes, o estresse oxidativo pode levar a diversos danos, como descontrole da homeostase, danos em lipídeos que compõe as membranas celulares, mau funcionamento das sinapses e neurotransmissores, e em casos mais severos, a morte do animal (Lee et al., 2019).

Apesar de observarmos maiores valores encontrados para NO nos músculos de peixes coletados em ADA/AI em relação a AR, as concentrações de PC e MDA foram iguais ou até menores, respectivamente, o que sugere que o excesso de radicais livres produzido não foi capaz de induzir danos oxidativos aos tecidos, e que proteínas e lipídios estão preservados. Outros fatores, como exposição a pesticidas e outros poluentes ambientais, também são capazes de provocar aumentos na

concentração de NO. As menores quantidades do malondialdeído e da catalase nos músculos dos peixes das áreas ADA/AI são um indicativo de que o balanço oxidativo dos organismos está em equilíbrio, uma vez que o malondialdeído é produto de ataque dos radicais livres (Mas-Bargues et al., 2021). A enzima oxidante catalase, por sua vez, é responsável por proteger o organismo, agindo diretamente na molécula de peróxido de hidrogênio, transformando-o em duas moléculas de água, e diminuindo os danos causados por esses radicais (Nandi et al., 2019). Apesar dos nossos resultados indicarem equilíbrio oxidativo, nós também observamos um aumento de óxido nítrico nos músculos de peixes das áreas ADA/AI, o que poderia levar à formação de peróxido nítrico ONOO<sup>-</sup>, um agente altamente oxidante, capaz de causar danos nas moléculas da célula (Guerby et al., 2021). Porém, este achado também pode estar relacionado com outras funções metabólicas do óxido nítrico, uma vez que ele participa de processos fisiológicos referentes ao sistema muscular, vasodilatação e sinalização celular (Gantner et al., 2020). Portanto, como o alto teor de óxido nítrico não esteve associado a marcadores de danos teciduais, como peroxidação lipídica e proteínas carboniladas, não é possível concluir que haja um desbalanço no sistema oxidante – antioxidante em animais amostrados nas áreas ADA/AI em relação à AR. O tecido das brânquias não apresentou nenhuma alteração nos marcadores de estresse oxidativo, demonstrando que não foi afetado diretamente quanto ao status oxidativo.

O fígado é o principal órgão responsável pela detoxificação dinâmica do organismo, e está envolvido na metabolização de metais pesados, uma vez que possui enzimas responsáveis por acelerar a passagem de elétrons, diminuindo a quantidade de moléculas instáveis e altamente reativas (Souza et al., 2018) (Weber et al., 2020). Além disso, a presença de proteínas específicas para ligações com metais, presentes no núcleo dos hepatócitos, faz com que seja possível a aderência a esses metais, diminuindo sua reatividade (Al-Balawi et al., 2013). Por exercer importante função na homeostase do organismo, o fígado frequentemente é alvo da instalação de processos inflamatórios. Associado a isto, a exposição a metais pesados como chumbo (Pb), Níquel (Ni) e cobre (Cu), é capaz de promover estresse oxidativo em tecidos de peixes, e conseqüentemente induzir um processo conhecido como oxinfamação, que ocorre quando a inflamação no tecido hepático se instaura em função do excesso de produção de radicais livres (Mahboob et al., 2019). Nossos resultados

mostraram que houve um aumento de inflamação nos fígados dos peixes das áreas diretamente afetada e de influência (ADA/AI), o que pode ser explicado pela atividade da mieloperoxidase, uma enzima presente em neutrófilos e responsável por defender o organismo de peixes contra o ataque de agentes agressores que podem estar presentes em regiões de mineração (Kumar et al., 2019). Já é conhecido que atividades de mineração podem liberar metais pesados nas águas dos rios e promover a lesão dos tecidos dos animais por promover a geração de radicais livres dentro das células. Em um estudo recente, Tabrez et al., 2020 mostrou que houve um aumento de infiltrados inflamatórios em fígados de peixes do gênero *Mystus*, retirados do rio Yamuna. Este local apresentava altas concentrações de metais pesados como Cu e Ni e possivelmente esta exposição promoveu geração de radicais livres das células (Tabrez et al., 2020). Além disso, o dano causado pelos radicais livres pode afetar também a síntese de proteínas e a reserva de glicogênio no fígado, atraindo ainda mais células do sistema imune (Chakrabarti et al., 2014).

Nossos resultados mostraram que os peixes do gênero *Astyanax* e *Psalidodon* apresentaram maior quantidade de áreas de inflamação no fígado quando comparados à espécie *Tetragonopterus chalceus*, que por sua vez apresentou maior quantidade de degenerações hepáticas (esteatose), quando comparado as demais espécies avaliadas. A predisposição das espécies a impactos biológicos a partir de substâncias presentes no ambiente pode variar consideravelmente. Tore et al. (2021), por exemplo, mostraram que algumas espécies possuem maior predisposição a serem afetadas por certos metais. Semelhantemente, outro estudo observou que níveis diferentes de níquel, zinco e chumbo foram encontrados em três espécies distintas, resultando em diferentes níveis de danos causados em cada espécie (Ayanda et al., 2019). Além disso, a presença de microplásticos e outras micromoléculas na água, que podem ser provenientes de outros tipos de poluição, podem alterar fisiologia de diversos organismos (Liu et al., 2021), contribuindo com as diferenças encontradas por espécie nos indivíduos do estudo. Dessa forma, esses mecanismos espécie-específicos de predisposição a impactos poderiam justificar a maior degeneração citoplasmática em *Tetragonopterus chalceus* e maiores quantidades de infiltrados inflamatórios nos peixes dos gêneros *Astyanax* e *Psalidodon*.

Em relação às diferenças no grau de alterações histopatológicas em fígados e nas brânquias dos peixes dos diferentes sítios amostrais, além das características de predisposição supracitadas, é importante considerar que cada ponto de coleta do estudo possui uma característica de tamanho, vazão, declividade, vegetação, influência de atividades antrópicas (industriais, urbanas, agropecuárias, etc.), que em conjunto alteram a disponibilidade de poluentes, principalmente metais, nos corpos d'água (Kumar et al., 2018). Além disso, alguns metais pesados tendem a se acumular de acordo com as propriedades químicas de um dado corpo d'água. O chumbo, por exemplo, possui maior acúmulo em águas com baixa salinidade; o cádmio se torna mais disponível em águas com menor pH e o mercúrio se acumula de acordo com as mudanças físicas de corpo d'água, como a temperatura (Moiseenko & Gashkina, 2020). Essas alterações também podem explicar as diferenças encontradas nos pontos de coleta. É importante também avaliar os tipos de atividades urbanas que são praticadas próximas às regiões dos rios e lagos das áreas AR e ADA/AI e a distância entre os sítios amostrais e as barragens, pois todos esses fatores podem contribuir com a grande variação na porcentagem de incidência das histopatologias observadas nos diferentes pontos de coleta (Wang et al., 2021).

Em peixes, o glicogênio é uma importante fonte de armazenamento energético e está fortemente presente no fígado e nos músculos, e seu acúmulo moderado é sinal de saúde nesses organismos (Khanh et al., 2021). A quantidade de glicogênio armazenado é controlada por vias endócrinas que regulam os níveis de açúcar presentes no sangue, que quando altos, acionam uma cascata hormonal que ativam as enzimas que sintetizam os polímeros de glicogênio (Tariang et al., 2019). Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de glicogênio presente nos peixes das áreas AR e ADA/AI. Foi observado por Kumari & Kumar (2020) que altas concentrações de cádmio são capazes de estimular a atividade de enzimas que atuam nas rotas metabólicas de conversão e utilização do glicogênio, como a lactato desidrogenase, piruvato desidrogenase e succinato desidrogenase, impedindo que o glicogênio seja armazenado. Além disso, metais pesados no geral, são responsáveis pela redução dos níveis de glicogênio no fígado, uma vez que o estresse físico e oxidativo que ocorre durante a contaminação exige altos níveis de energia para acionar os mecanismos de defesa do organismo (Tewari et al., 2019).

Portanto, nossos resultados referentes ao glicogênio indicam que não há contaminação severa por metais dos peixes das áreas AR e ADA/AI.

Nossos resultados também não demonstraram a presença de fibrose hepática nos peixes, uma vez que não foram observadas grandes quantidades de colágeno no fígado. Dessa forma, esse resultado também sugere que não há contaminação severa por poluentes nas áreas amostradas, já que, quando em grandes quantidades, contaminantes ambientais são capazes de desregular o metabolismo da síntese de colágeno e causar seu acúmulo em órgãos como fígado, músculos e baço, (Nofal et al., 2020). O cobre, por exemplo, em longos períodos de exposição, participa da interação entre colágeno e elastina no tecido conjuntivo, e seu excesso pode inibir o gene responsável pelo controle da síntese de colágeno, o que por sua vez interfere na ação de metaloproteinases, impedindo a ligação em seus respectivos substratos. As metaloproteinases regulam, por meio da ação enzimática, a quantidade de proteínas presentes na matriz extracelular e têm atuação direta em processos de reparação tecidual e remodelação em resposta à injúria. A inibição das metaloproteinases pode ser um dos motivos do acometimento do fígado por fibrose (Zhang et al., 2023).

As brânquias são os primeiros órgãos a entrarem em contato com poluentes e são muito sensíveis a essa exposição, devido ao seu constante contato com o meio externo. Os epitélios das brânquias são facilmente modificados quando expostos à contaminantes, o que as tornam ótimas indicadoras de avaliação de impactos no meio ambiente (Bose et al., 2015). Essa membrana respiratória está relacionada com as trocas gasosas e iônicas promovidas pelas células das lamelas secundárias durante a osmorregulação em peixes (Alesci et al., 2022). O aumento da hiperplasia em brânquias de peixes da ADA/AI sugere que essa área está, de alguma forma, mais afetada por poluentes, uma vez que o aumento do epitélio lamelar secundário é uma estratégia fisiológica para impedir que contaminantes tenham fácil acesso à corrente sanguínea, e constitui uma das primeiras formas de defesa desse tecido (Mustafa, 2020). Consequentemente, a hiperplasia aumenta as fusões geradas pelas lamelas, uma vez que, ao aumentarem de tamanho, acabam tendo suas células colabadas e fundidas, dificultando ainda mais a passagem de contaminantes para o restante dos órgãos (Onita et al., 2021). Peixes da espécie *Astyanax bimaculatus*, coletados em rios contaminados com mercúrio e cádmio na Colômbia, também tiveram hiperplasia

de suas lamelas secundárias, e consequente fusão lamelar, além de aneurismas que levaram à destruição do epitélio lamelar (Corredor-Santamaría et al., 2019). Outros peixes do gênero *Astyanax*, que foram coletados no Rio Doce em Mariana, MG, região contaminada por metais como chumbo, cádmio, níquel e cobre, também apresentaram essas alterações histopatológicas de brânquias (Macêdo et al., 2020). No presente estudo, para alguns animais, a deformação morfológica do epitélio lamelar apresentou-se mais severa, como observado para *Astyanax bimaculatus* em relação às demais espécies. Isso indica que mesmo em áreas onde o impacto é potencial, ou seja, onde não ocorreu rompimento de barragem de mineração, há diferenças observáveis quanto as alterações histopatológicas de brânquias, sugerindo que outras fontes de poluição podem apresentar um importante viés e precisam ser consideradas para a caracterização de linha de base em relação aos marcadores de impacto ambiental nos sítios amostrais.

No tecido muscular, nossos resultados não mostraram diferenças entre as áreas das fibras musculares dos peixes da AR e ADA/AI. Além disso, considerando todos os pontos amostrados, nenhum peixe apresentou incidência de hemorragia, isquemia, necrose ou degenerações nesse tecido. Esses achados indicam que não houve exposição a metais pesados severa o suficiente para afetar ou gerar danos ao músculo dos peixes. Em animais expostos a contaminantes, é comum a presença de necroses, edemas, diminuição do tamanho das miofibrilas (atrofias musculares), maior espaçamento entre sarcômeros e degeneração das fibras musculares, dificultando a contração contínua e uniforme entre as fibras (Jaber et al., 2021). Essas patologias são normalmente avaliadas em peixes severamente contaminados por metais pesados como Zn, Pb, Cd, Ni, Cu, entre outros (El-Agri et al., 2021).

Em relação às diferenças de tamanho de fibras musculares encontradas nas diferentes localidades, este achado pode ser explicado devido a diferenças na disponibilidade de alimentos presentes em cada sítio amostral. Essa disponibilidade influencia diretamente na ingestão de micronutrientes e macronutrientes essenciais e proteínas, que são fundamentais para o desenvolvimento dos peixes em tamanho e, conseqüentemente, maiores fibras musculares (Bertucci et al., 2019). Além disso, a regulação hormonal para o crescimento está diretamente relacionada com a quantidade de alimento disponível, uma vez que a energia utilizada para manter a homeostase e regulamento das vias endócrinas é garantida pela quantidade de

alimento ingerida pelo animal (Zhou et al., 2019). Por exemplo, foi observado para trutas-arco-íris, peixe mandarim, isca de peixe e guppy que níveis ótimos de ingestão de proteína aumentam consideravelmente no crescimento desses peixes. (Ahmed & Ahmad, 2020) (Alam et al., 2020) (Fadel et al., 2021).

Em relação às gônadas, nossos resultados não mostraram grandes alterações em células germinativas nas amostras coletadas nas áreas AR e ADA/AI. Dessa forma, parece não haver contaminação severa nesses locais, uma vez que peixes expostos a concentrações elevadas de contaminantes frequentemente apresentam mudanças histológicas em seus ovários, como grande quantidade de ovócitos em atresia, necrose, vacuolização e desorganização da zona pelúcida (Bhat et al., 2023). É importante ressaltar que a atresia é um processo que pode ocorrer naturalmente em ovários de peixes, com ovócitos que não foram desovados. Entretanto, quando há um grande número de ovócitos atrésicos nos ovários, é possível que haja algum evento estressor impactando no processo reprodutivo dos peixes naquele local (Corriero et al., 2021).

Todas essas alterações histopatológicas podem causar impactos na reprodução e, conseqüentemente, no tamanho das populações de uma determinada espécie (Bhat et al., 2023). Estudos demonstraram que peixes expostos a metais como cobre, chumbo, níquel e cádmio apresentaram maior incidência de todas essas alterações (Azab et al., 2019; Elgaml et al., 2019).

## **5. CONCLUSÃO**

Tomados em conjunto, os resultados apresentados, que visaram traçar uma linha de base, ou seja, apresentar valores de referência para marcadores de prejuízo ou dano tecidual em peixes, apontam que não há desbalanço oxidativo nos tecidos testados em animais de áreas AR e ADA/AI. Entretanto, os dados obtidos foram capazes de identificar eventuais sinais de processos fisiológicos resultantes de exposição à presença de contaminantes ambientais, porém na maior parte dos tecidos e espécies estudados as alterações não foram significativas, e os danos histológicos observados não foram considerados severos, uma vez que não foram encontradas regiões de necrose, hemorragia e isquemia nesses tecidos. Isso sugere que há pouca diferença, em termos de contaminação, entre as amostras provenientes da ADA/AI e

da AR. Além disso, não foi observado nenhum dano histopatológico nos músculos e nas gônadas de peixes provenientes de ambas as áreas. A espécie e o ponto de coleta que apresentaram maior número de marcadores oxidativos e histopatológicos alterados foram a espécie *Astyanax bimaculatus* e o ponto BA18. Apesar disso, os valores de marcadores obtidos se encontraram dentro da faixa esperada para a espécie (Salaro et al., 2023). As diferenças encontradas entre as espécies e entre os pontos de coleta podem representar diferenças relacionadas com a forma de amostragem obtida para este estudo, quanto também características físicas e químicas dos rios e a sensibilidade de cada espécie frente a estas características. Concluímos, portanto, que as espécies de peixes coletadas nas localidades a jusante das barragens de Eustáquio e Santo Antônio, no município de Paracatu, MG, não apresentaram contaminação severa que represente danos oxidativos e teciduais e que ameacem a saúde dos animais amostrados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalaka, S. E., Enem, S. I., Idoko, I. S., Sani, N. A., Tenuche, O. Z., Ejeh, S. A., Sambo, W. K. Heavy metals bioaccumulation and health risks with associated histopathological changes in *Clarias gariepinus* from the Kado fish market, Abuja, Nigeria. *Journal of Health and Pollution* 10(26): 200602, 2020. <https://doi.org/10.5696/2156-9614-10.26.200602>
- Aebi, H. [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*. Academic press 105: 121-126, 1984.
- Agbugui, M. O., Abe, G. O. Heavy metals in fish: bioaccumulation and health. *British Journal of Earth Sciences Research* 10(1): 47-66, 2022. <https://doi.org/10.37745/bjesr.2013>
- Ahmed, I., Ahmad, I. Effect of dietary protein levels on growth performance, hematological profile and biochemical composition of fingerlings rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* reared in Indian himalayan region. *Aquaculture Reports* 16: 100268, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100268>

- Alam, M. S., Liang, X. F., Liu, L. Indirect effect of different dietary protein to energy ratio of bait fish mori diets on growth performance, body composition, nitrogen metabolism and relative AMPK & mTOR pathway gene expression of Chinese perch. *Aquaculture Reports*, 16: 100276, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100276>
- Alesci, A., Cicero, N., Fumia, A., Petrarca, C., Mangifesta, R., Nava, V., Lauriano, E. R. Histological and chemical analysis of heavy metals in kidney and gills of boops boops: melanomacrophages centers and rodlet cells as environmental biomarkers. *Toxics* 10(5): 218, 2022. <https://doi.org/10.3390/toxics10050218>
- Al-Balawi, H. F. A., Al-Akel, A. S., Al-Misned, F., Suliman, E. A. M., Al-Ghanim, K. A., Mahboob, S., Ahmad, Z. Effects of sub-lethal exposure of lead acetate on histopathology of gills, liver, kidney and muscle and its accumulation in these organs of *Clarias gariepinus*. *Brazilian archives of biology and technology* 56(2): 293-302, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000200015>
- Ayanda, I. O., Ekhaton, U. I. Bello, O. A. Determination of selected heavy metal and analysis of proximate composition in some fish species from Ogun River, Southwestern Nigeria. *Heliyon* 5(10): e02512, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02512>
- Azab, A M., A Aly-Eldeen, M., MM Khalaf-Allah, H., MA El-Battal, M. Effect of heavy metals on the ovary of *Tilapia zillii* in some canals of Nile Delta area, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 23(3): 329-345, 2019.
- Baldisserotto, B. Espécies nativas para piscicultura no Brasil (pp. 303-325). L. de Carvalho Gomes (Ed.). Santa Maria: UFSM 303-325, 2005.
- Bertucci, J. I., Blanco, A. M., Sundarajan, L., Rajeswari, J. J., Velasco, C., Unniappan, S. Nutrient regulation of endocrine factors influencing feeding and growth in fish. *Frontiers in Endocrinology* 10: 83, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00083>

Bhat, R. A., Bakhshalizadeh, S., Guerrera, M. C., Kesbiç, O. S., Fazio, F. Toxic effect of heavy metals on ovarian deformities, apoptotic changes, oxidative stress, and steroid hormones in rainbow trout. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 75: 127106, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.127106>

Bose, M. J., Ilavazhahan, M., Tamilselvi, R., & Viswanathan, M. (2015). Effect of heavy metals on the histopathology of gills and brain of freshwater fish *Catla catla*. *Biomedical and Pharmacology Journal* 6(1): 99-105, 2015. <http://biomedpharmajournal.org/?p=2632>

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254, 1976.

Briffa, J., Sinagra, E., Blundell, R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* 6(9): e04691, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>

Buege, J. A., & Aust, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology*. Academic press (52): 302-310, 1978.

Chakrabarti, R., Srivastava, P.K., Verma, N., Sharma, J. Effect of seeds of *Achyranthes aspera* on the immune responses and expression of some immune-related genes in carp *Catla catla*. *Fish & Shellfish Immunology* 41(1): 64–69, 2014 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.007>.

Chowdhury, S., Saikia, S. K. Oxidative Stress in Fish: A Review. *Journal of Scientific Research* 12(1): 145-160, 2020. DOI:10.3329/jsr.v12i1.41716

Corredor-Santamaría, W., Torres-Tabares, A., Velasco-Santamaría, Y. M. Biochemical and histological alterations in *Aequidens metae* (*Pisces, Cichlidae*)

and *Astyanax gr. bimaculatus* (Pisces, Characidae) as indicators of river pollution. Science of The Total Environment 692: 1234-1241, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.187>

Corriero, A., Zupa, R., Mylonas, C. C., & Passantino, L. Atresia of ovarian follicles in fishes, and implications and uses in aquaculture and fisheries. Journal of Fish Diseases 44(9): 1271-1291, 2021.

Crawley, M. J. The R book. John Wiley & Sons, 2012.

El-Agri, M. Heavy Metal Bioaccumulation and Related Histopathological Changes in Gills, Liver and Muscle of *Solea aegyptiaca* Fish Inhabiting the Lake Qarun, Egypt. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries 25(4): 159-183, 2021. 10.21608/EJABF.2021.187056

Elgamal, S. A., Saad, T. T., Hamed, M., Zaki, V. H. Effects of heavy metal pollutants on the reproduction of Nile tilapia. Internacional Journal of Fisheries and Aquatic Studies 7(5): 542-547, 2019.

Fadel, A. H., Lamin, A. J., Ali, R. R., Momen, K. A. Effect of Different Dietary Protein Levels on Survival Rate and Growth Performance of Guppy (*Poecilia reticulata*). Al-Mukhtar Journal of Sciences 36(2): 175-181, 2021. Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v36i2.42>

Garai, P., Banerjee, P., Mondal, P., & Saha, N. C. Effect of heavy metals on fishes: toxicity and bioaccumulation. Journal of Clinical Toxicology 18(11): 001, 2021.

Gantner, B. N., LaFond, K. M., Bonini, M. G. Nitric oxide in cellular adaptation and disease. Redox Biology 34: 101550, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101550>

Guerby, P., Tasta, O., Swiader, A., Pont, F., Bujold, E., Parant, O., Negre-Salvayre, A. Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide

synthase in preeclampsia. *Redox biology* 40: 101861, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101861>

Hothorn, T., Hornik, K., Van De Wiel, M. A., & Zeileis, A. Implementing a class of permutation tests: the coin package. *Journal of statistical software* 28(8): 1-23, 2008.

H. Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.

Jaber, M. M. T., Al-Jumaa, Z. M., Al-Tae, S. K., Nahi, H. H., Al-Hamdany, M. O., Al-Salh, M. A., Al-Mayahi, B. Bioaccumulation of heavy metals and histopathological changes in muscles of common carp (*Cyprinus carpio L.*) in the Iraqi rivers. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 35(2), 245-249, 2021. DOI: 10.33899/ijvs.2020.126748.1368

Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 48(284), 124-127.

Fox, J., & Weisberg, S. *An R companion to applied regression*. Sage publications. 2019.

Khanh, D. N. N., Vy, N. T. T., Phuong, T. H., Nhi, P. T., Thang, N. Q., Sy, D. T., Phuong, N. T. K. Effects of cadmium and lead on muscle and liver glycogen levels of climbing perch (*Anabas testudineus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 108: 854-860, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03384-4>

Kumar, N., Sharma, J., Singh, S. P., Singh, A., Krishna, V. H., Chakrabarti, R. Validation of growth enhancing, immunostimulatory and disease resistance properties of *Achyranthes aspera* in *Labeo rohita* fry in pond conditions. *Heliyon* 5(2): e01246, 2019. doi: 10.1016/j.heliyon.2019. e01246

- Kumar, V., Sharma, A., Kumar, R., Bhardwaj, R., Kumar Thukral, A., Rodrigo-Comino, J. Assessment of heavy-metal pollution in three different Indian water bodies by combination of multivariate analysis and water pollution indices. *Human and Ecological Risk Assessment: an International Journal* 26(1): 1-16, 2020. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1497946>
- Kumari, A., Kumar, A. Cadmium exposure on serum glucose level and glycogen reserve in the liver and muscle tissue of Indian Cat fish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Animal Science* 15(2): 35-38, 2020.
- Lee, J. W., Choi, H., Hwang, U. K., Kang, J. C., Kang, Y. J., Kim, K. I., Kim, J. H. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 68: 101-108, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.010>
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology*. Academic press (233): 346-457, 1994.
- Liu, G., Dave, P. H., Kwong, R. W., Wu, M., Zhong, H. Influence of microplastics on the mobility, bioavailability, and toxicity of heavy metals: a review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 107: 710-721, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03339-9>
- Macêdo, A. K. S., Dos Santos, K. P. E., Brighenti, L. S., Windmüller, C. C., Barbosa, F. A. R., de Azambuja Ribeiro, R. I. M., Thomé, R. G. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Science of the Total Environment* 735: 139505, 2020
- Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Al-Balawi, H. F., Al-Misned, F., Ahmed, Z. Toxicological effects of heavy metals on histological alterations in various organs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from freshwater reservoir. *Journal of King*

Saud University-Science 32(1): 970-973, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.07.004>

Mas-Bargues, C., Escriva, C., Dromant, M., Borrás, C., Vina, J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 709: 108941, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108941>

Moiseenko, T. I., Gashkina, N. A. Distribution and bioaccumulation of heavy metals (Hg, Cd and Pb) in fish: Influence of the aquatic environment and climate. *Environmental Research Letters* 15(11): 115013, 2020. DOI 10.1088/1748-9326/abbf7c

Mollie E. Brooks, Kasper Kristensen, Koen J. van Benthem, Arni Magnusson, Casper W. Berg, Anders Nielsen, Hans J. Skaug, Martin Maechler and Benjamin M. Bolker. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal* 9(2): 378-400, 2017.

Moussa, Z., Judeh, Z. M., & Ahmed, S. A. Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. *Free radical medicine and biology* 1: 11-22, 2019.

Mustafa, S. A. Histopathology and heavy metal bioaccumulation in some tissues of *Luciobarbus xanthopterus* collected from Tigris River of Baghdad, Iraq. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 46(2): 123-129, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.01.004>

Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019: 9613090, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>

Nofal, A., A El-Messady, F., A Ahmed, R. Histological and Histochemical Studies on the Liver of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) at Different localities of Delta Barrage, Egypt. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 50(The 8th International

Conference of Veterinary Research Division (NRC) Cairo, Egypt, 3rd-5th December 2019): 47-56, 2019. 10.21608/EJVS.2020.20099.1136

Onita, B., Albu, P., Herman, H., Balta, C., Lazar, V., Fulop, A., Dinischiotu, A. Correlation between heavy metal-induced histopathological changes and trophic interactions between different fish species. *Applied Sciences* 11(9): 3760, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11093760>

Pinheiro, J., Bornkamp, B., Glimm, E., & Bretz, F. Model-based dose finding under model uncertainty using general parametric models. *Statistics in medicine* 33(10): 1646-1661, 2014.

Rahman, A. N. A., ElHady, M., Hassanin, M. E., Mohamed, A. A. R. Alleviative effects of dietary Indian lotus leaves on heavy metals-induced hepato-renal toxicity, oxidative stress, and histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 509: 198-208, 2019.

Salaro, A. L., Silva, S. B., Ferraz, R. B., Jiménez, L. G. S., Carneiro, C. L., Quadros, A. S., Oliveira, E. E. Acute sublethal exposure to ethiprole impairs physiological and oxidative status in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae*. *Environmental Pollution* 334: 122152, 2023.

Sanjeev, S., Bidanchi, R. M., Murthy, M. K., Gurusubramanian, G., & Roy, V. K. Influence of ferulic acid consumption in ameliorating the cadmium-induced liver and renal oxidative damage in rats. *Environmental Science and Pollution Research* 26(20): 20631-20653, 2019.

Shah, N., Khan, A., Ali, R., Marimuthu, K., Uddin, M. N., Rizwan, M., Khisroon, M. Monitoring bioaccumulation (in gills and muscle tissues), hematology, and genotoxic alteration in *Ctenopharyngodon idella* exposed to selected heavy metals. *BioMed Research International* 2020: 6185231, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6185231>

- Sheikhzadeh, H., Hamidian, A. H. Bioaccumulation of heavy metals in fish species of Iran: a review. *Environmental Geochemistry and Health* 43(10): 3749-3869, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00883-5>
- Souza, A. C. F., Bastos, D. S. S., Santos, F. C., Sertorio, M. N., Ervilha, L. O. G., Gonçalves, R. V., Machado-Neves, M. Arsenic aggravates oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. *Life sciences* 209: 472-480, 2018.
- Tabrez, S., Zughalbi, T. A., Javed, M. Bioaccumulation of heavy metals and their toxicity assessment in *Mystus* species. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(2): 1459-1464, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.085>
- Tariang, K. U., Ramanujam, S. N., Das, B. Effect of arsenic (As) and lead (Pb) on glycogen content and on the activities of selected enzymes involved in carbohydrate metabolism in freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *International Aquatic Research* 11: 253-266, 2019. <https://doi.org/10.1007/s40071-019-00234-2>
- Tewari, S., Bajpai, S., Tripathi, M. Effect of cadmium on glycogen content in muscle, liver, gill and kidney tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Journal of Applied and Natural Science* 11(2): 575-580, 2019. DOI <https://doi.org/10.31018/jans.v11i2.2115>
- Töre, Y., Ustaoglu, F., Tepe, Y. Kalipci, E. Levels of toxic metals in edible fish species of the Tigris River (Turkey); threat to public health. *Ecological Indicators* 123: 107361, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107361>
- Wang, F., Dong, W., Zhao, Z., Wang, H., Li, W., Chen, G., Zhou, T. Heavy metal pollution in urban river sediment of different urban functional areas and its influence on microbial community structure. *Science of the Total Environment* 778: 146383, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146383>

- Weber, A. A., Sales, C. F., de Souza Faria, F., Melo, R. M. C., Bazzoli, N., Rizzo, E. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: a case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190: 110165, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>
- Yacoub, A. M., Mahmoud, S. A., & Abdel-Satar, A. M. Accumulation of heavy metals in tilapia fish species and related histopathological changes in muscles, gills and liver of *Oreochromis niloticus* occurring in the area of Qahr El-Bahr, Lake Al-Manzalah, Egypt. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 50(1): 1-15, 2021. <https://doi.org/10.2478/oandhs-2021-0001>
- Zaynab, M., Al-Yahyai, R., Ameen, A., Sharif, Y., Ali, L., Fatima, M., Li, S. Health and environmental effects of heavy metals. *Journal of King Saud University-Science* 34(1): 101653, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101653>
- Zhang, Y., Yuan, F., Yan, K., Zhang, M., Li, Y., Wang, G., Yan, X. Long-term waterborne Cu<sup>2+</sup> exposure affects collagen metabolism in fish. *Aquatic Toxicology* 257: 106452, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106452>
- Zhou, Z., Yao, W., Ye, B., Wu, X., Li, X., Dong, Y. Effects of replacing fishmeal protein with poultry by-product meal protein and soybean meal protein on growth, feed intake, feed utilization, gut and liver histology of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂) juveniles. *Aquaculture*, 516: 734503, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734503>
- Zoroddu, M. A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., Nurchi, V. M. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry* 195: 120-129, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>
- Zulkipli, S. Z., Liew, H. J., Ando, M., Lim, L. S., Wang, M., Sung, Y. Y., & Mok, W. J. A review of mercury pathological effects on organs specific of fishes. *Environmental Pollutants and Bioavailability* 33(1): 76-87, 2021.

<https://doi.org/10.1080/26395940.2021.1920468>

Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. (2009). *Mixed effects models and extensions in ecology with R* (Vol. 574, p. 574). New York: Springer.