

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados

Gabriel Eric Rodrigues Arêdes

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E MOLECULARES NO FÍGADO DE *Hoplias intermedius* (GÜNTHER, 1864) (PISCES: ERYTHRINIDAE) CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS NO RIO PARAPEBA, BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO, MG

Belo Horizonte

2024

Gabriel Eric Rodrigues Arêdes

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E MOLECULARES NO FÍGADO DE *Hoplias intermedius* (GÜNTHER, 1864) (PISCES: ERYTHRINIDAE) CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS NO RIO PARAPEBA, BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO, MG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados da PUC Minas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Vertebrados.

Orientador: Prof. Dr. Nilo Bazzoli

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Loureiro Paschoalini

Área de concentração: Biologia de vertebrados de ambientes impactados

Belo Horizonte

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

A678a Arêdes, Gabriel Eric Rodrigues
Alterações histopatológicas e moleculares no fígado de *Hoplias intermedius* (Günther, 1864) (Pisces: Erythrinidae) contaminados por metais pesados no Rio Paraopeba, Bacia do Rio São Francisco, MG / Gabriel Eric Rodrigues
Arêdes. Belo Horizonte, 2023.
26, [12] f. : il.

Orientador: Nilo Bazzoli

Coorientador: Alessandro Loureiro Paschoalini

Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados

1. Peixe - Paraopeba, Rio (MG). 2. Peixe - Efeito dos metais pesados. 3. Peixe - Aspectos ambientais - São Francisco, Rio, Bacia. 4. Metais pesados. 5. Poluição ambiental. 6. Histopatologia veterinária. 7. Água – Poluição. I. Bazzoli, Nilo. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados. III. Título.

SIB PUC MINAS

CDU: 597

Gabriel Eric Rodrigues Arêdes

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E MOLECULARES NO FÍGADO DE *Hoplias intermedius* (GÜNTHER, 1864) (PISCES: ERYTHRINIDAE) CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS NO RIO PARAPEBA, BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO, MG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados da PUC Minas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Vertebrados.

Prof. Dr. Nilo Bazzoli - PUC Minas (Orientador)

Prof. Dr. Alessandro Loureiro Paschoalini - PUC Minas (Coorientador)

Rafael Magno Costa Melo – UFMG (Banca Examinadora)

Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda – UFMG (Banca Examinadora)

Belo Horizonte, 15 de março de 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, me proporcionando saúde e coragem para vencer os obstáculos. Aos meus pais que sempre me impulsionaram a buscar conhecimento e seguir meu sonho, dando todo auxílio necessário para sua realização. Aos meus orientadores Dr. Nilo Bazzoli e Dr. Alessandro Loureiro Paschoalini que me acolheram como seu aluno de mestrado, desempenhando tal função com dedicação, amizade e paciência com a qual guiaram o meu aprendizado. A minha namorada Ana Luíza, por estar sempre ao meu lado e ser o meu porto seguro durante essa jornada acadêmica. Eu te amo e sou eternamente grato por tudo que você fez por mim. Aos meus amigos, Braz e Diego que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho. Aos meus também amigos, Dr. Daniel Teixeira e Dra. Izabela Mendes, meus exemplos de cientistas e biólogos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e PUC Minas pelo fomento e bolsas para o desenvolvimento do meu projeto. Também, a todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

RESUMO

Os metais pesados, oriundos de atividades humanas quanto de processos naturais, representam uma ameaça para os organismos aquáticos e o meio ambiente. Para analisar os efeitos de metais pesados sobre o fígado do trairão *Hoplias intermedius* do rio Paraopeba, Minas Gerais, Brasil, foram coletados fragmentos do órgão para análises histopatológicas e imunohistoquímicas. Foram analisados na água e no fígado a concentração dos metais: Al, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Zn. Os resultados mostraram concentrações de metais pesados na água acima dos níveis permitidos: Al, Cd e Mn e, no fígado: Cd, Pb, Cr e Fe. No fígado observaram-se a dilatação e congestão de capilares sinusoides e veia lobular; vacuolização dos hepatócitos; formação de centros melanomacrofágicos e sinais de necrose tecidual. Na análise imunohistoquímica para metalotioneína e proteínas de choque térmico (HSP70), foi observado um aumento das marcações no fígado de *H. intermedius* do rio Paraopeba, quando comparado com os peixes do ambiente controle. Esses achados indicam possíveis impactos na saúde ambiental e humana pelo consumo de peixes contaminados.

ABSTRACT

Heavy metals, from human activities or natural processes, pose a threat to aquatic organisms and the environment. To analyze the effects of heavy metals on the liver of *Hoplias intermedius* from the Paraopeba River, Minas Gerais, Brazil, fragments of the organ were collected for histopathological and immunohistochemical analysis. The concentration of the following metals was analyzed in the water and liver: Al, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Zn. The results showed concentrations of heavy metals in the water above the permitted levels: Al, Cd and Mn, and in the liver: Cd, Pb, Cr and Fe. The liver showed dilation and congestion of sinusoid capillaries and lobular veins; vacuolization of hepatocytes; formation of melanomacrophage centers and signs of tissue necrosis. In the immunohistochemical analysis for metallothionein and heat shock proteins (HSP70), an increase in markings was observed in the liver of *H. intermedius* from the Paraopeba River, when compared to fish from the control environment. These findings indicate possible impacts on environmental and human health from the consumption of contaminated fish.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
<i>Metais pesados</i>	10
<i>Biologia da espécie</i>	12
<i>Rio Paraopeba</i>	13
<i>Fígado</i>	14
<i>Metalotioneína</i>	15
<i>Proteína de choque térmico (HSP70)</i>	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	17
JUSTIFICATIVA	20
OBJETIVOS	20
<i>Objetivo geral</i>	20
<i>Objetivos específicos</i>	20
ARTIGO A SER SUBMETIDO	21
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	22
METODOLOGIA	24
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	31
AGRADECIMENTOS	35

REFERÊNCIAS

36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema adaptado de Paschoalini, a. l. et al 2019 Fontes e destinos finais de metais pesados no meio ambiente.....	11
Figura 2: Bacias Hidrográficas do Brasil.....	13
Figura 3: Bacia do rio Paraopeba, MG, Brasil.....	14
Figura 4: Gráfico representando a comparação entre os índices hepatossomático dos peixes provenientes dos rios Abaeté e Paraopeba.....	28
Figura 5: Histopatologias de fígado em <i>H. intermedius</i> expostos a metais pesados....	29
Figura 6: Imunohistoquímica para metalotioneína (MT) em fígado, de <i>H. intermedius</i> provenientes do rio Paraopeba MG.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos da água nos rios Abaeté e Paraopeba.....	26
Tabela 2 - Análise de metais na água, órgãos e tecidos.....	27

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Metais pesados

Os metais pesados são tóxicos e mesmo em pequenas doses interrompem funções biológicas do ciclo de vida dos organismos como também trazem efeitos adversos sobre o ambiente. Tais metais possuem uma massa específica entre 3,5 e 7,0 g/cm³, elevada massa atômica e número atômico igual ou superior a 20u (Lima, 2011; Ali & Khan, 2018). A ocorrência de metais em ambientes aquáticos ocorre naturalmente por meio de processos químicos e físicos naturais, tais como intemperismo, sedimentação e lixiviação, entretanto atividades antrópicas como atividades industriais e descarga de águas residuais domésticas são as principais fontes de metais em corpos d'água (Demirak et al., 2006; Paschoalini et al., 2019).

Classificados como metais pesados essenciais ferro (Fe), cobalto (Co), manganês (Mn), níquel (Ni), cobre (Cu), molibdênio (Mo) cromo (Cr), e zinco (Zn) desempenham funções importantes no organismo sendo necessários para várias funções biológicas, como metabolismo, formação de tecidos, atividade enzimática e transmissão de sinais nervosos. O ferro, por exemplo, é essencial para a formação dos glóbulos vermelhos do sangue e o transporte de oxigênio. O zinco desempenha papel importante no sistema imunológico, no crescimento e desenvolvimento, além de estar envolvido em processos enzimáticos. (Sathawara et. al., 2004). Entretanto, metais como chumbo (Pb), o mercúrio (Hg), o cádmio (Cd), o arsênio (As) e o alumínio (Al) não desempenham funções biológicas importantes e mesmo em pequenas concentrações mostraram alto poder acumulativo e toxicidade na biota (Yu et al., 2011; Sfakianakis et al., 2015).

Devido à dificuldade de serem metabolizados, o acúmulo de metais pesados, compostos tóxicos, no organismo a partir da água e ingestão de alimentos, (Baki et al., 2018), provoca patologias em órgãos alvos, como o fígado, baço, rins, podendo causar necroses e câncer (Bernet et al., 1999, Vieira et al., 2011; Thévenod & Lee, 2015; Paschoalini et al., 2019). Em concentrações elevadas, estes metais também podem interromper a homeostase de íons, induzir a danos no DNA e distúrbios em vários órgãos (Vieira et al., 2011; Nai et al., 2015; Li et al., 2015), afetando organelas celulares

e enzimas envolvidas no metabolismo, desintoxicação e reparo de danos no organismo. Dentre os mecanismos de ação, a exposição a íons metálicos aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo gerar stress oxidativo, peroxidação lipídica de membranas e finalmente a morte celular (Atli & Canli, 2010). Além disso, alguns metais como alumínio, cádmio, cobre, chumbo e mercúrio têm influência na produção e regulação hormonal, sendo chamados de metaloestrógenos e incluídos na classe de poluentes conhecida como desreguladores endócrinos (EDCs) (Safe, 2003; Paschoalini et al., 2019).

Sendo assim, a participação dos metais pesados nas reações químicas do metabolismo dos peixes tornou esses elementos um dos principais focos nos estudos de contaminação, sendo relacionados aos processos de bioacumulação e biomagnificação e utilizados como indicadores da saúde do ecossistema (De Jesus et. al., 2014).

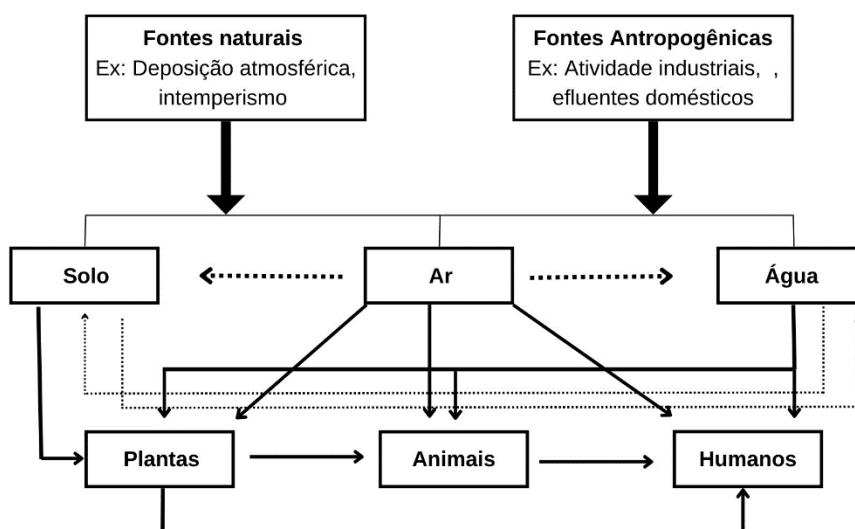


Figura 1. Esquema adaptado de Paschoalini e Bazzoli 2021 Fontes e destinos finais de metais pesados no meio ambiente. Linhas contínuas = rotas diretas; linhas tracejadas = rotas indiretas.

1.2 Biologia da espécie

A ordem Characiformes agrupa 24 famílias entre as quais se encontram as popularmente conhecidas como “traíras” ou “trairões”, membros da família Erythrinidae, que habitam rios, lagos e florestas inundadas (Fricke et al., 2019).

Representantes da família Erythrinidae são endêmicos da região Neotropical com maior diversidade ocorrendo na região amazônica (Reis et al., 2003). Possuem como caracteres morfológicos externos: corpo cilíndrico, nadadeira caudal arredondada, ausência de nadadeira adiposa e linha lateral com 37 a 47 escamas com indivíduos variando entre 60 e 100 centímetros. (Reis et al., 2003). Com 14 espécies descritas o gênero *Hoplias* possui a maior diversidade entre os três gêneros que compõem a família (Mattox et al., 2006; Oyakawa e Mattox, 2009; Mattox et al., 2014), sendo algumas delas muito apreciadas gastronomicamente e de relevante importância econômica para os mercados locais (Mattox et al., 2006).

As espécies de *Hoplias* são divididas em três grupos centrais: grupo 1: *H. lacerdae*, grupo 2: *H. macrophthalmus* e grupo 3; *H. malabaricus*. *Hoplias intermedius* integra o grupo *H. lacerdae* (paralelamente com *H. australis*, *H. brasiliensis*, *H. curupira*, *H. lacerdae*) e se diferencia das demais espécies principalmente pelo número de poros do canal laterosensorial da região ventral do dentário entre 4-6 (vs. 5 em *H. australis*, e 6-8 em *H. lacerdae*) como também pelo perfil anterior da cabeça em forma angular (vs. perfil arredondado em *H. australis*) (Oyakawa et al, 2009).

Essencialmente piscívoro *H. intermedius* pode ser considerado um predador de topo de cadeia (Costa et al, 2015). Sua distribuição geográfica ocorre desde a bacia do rio Paraná, abrangendo os rios Grande, Paranaíba Piquiri, na bacia do rio São Francisco, também ocorrendo em afluentes do rio Doce, Minas Gerais tendo preferência por ambientes lenticos (Oyakawa et al, 2009).



Figura 2. Bacias Hidrográficas do Brasil. Disponível em Google imagens.

1.3 Rio Paraopeba

A bacia do rio Paraopeba, localizada no alto São Francisco, possui extensão 13.600 km² compreendendo 48 municípios, representando 2,27% da área do Estado de Minas Gerais. Em seu trajeto de 510 quilômetros até sua foz na represa de Três Marias, passa por uma transição dos biomas Cerrado e mata Atlântica, além de grande diversidade de atividades antrópicas, englobando centros industriais e minerários, regiões urbanas mais densamente ocupadas e regiões pouco ocupadas, caracterizadas pelas atividades agropecuárias. A bacia do rio Paraopeba possui grande relevância no âmbito do abastecimento público de água, sendo responsável pelo fornecimento para aproximadamente 53% da população da região metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) (COBRAPE, 2023; Schwartzman et al., 2002)

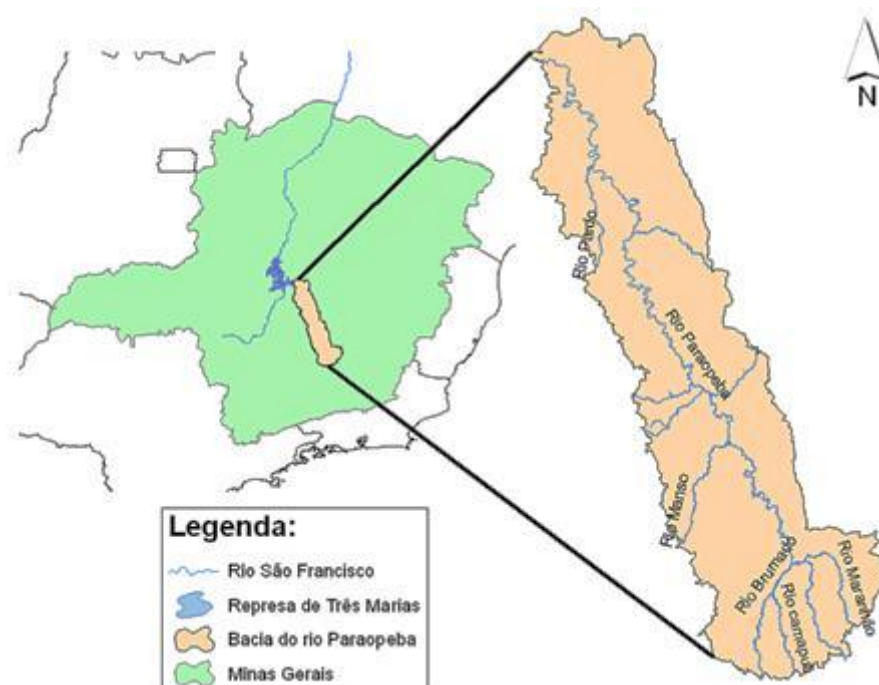


Figura 3. Bacia do rio Paraopeba, MG, Brasil

No âmbito ambiental, o rio Paraopeba possui expressiva riqueza e diversidade em sua ictiofauna, sendo considerado prioritário para conservação dos peixes no estado de Minas Gerais, entretanto o uso e a ocupação desordenada da bacia do rio Paraopeba contribuíram historicamente, com um processo contínuo de degradação, comprometendo o ecossistema local (Polignano & Lemos, 2020), especialmente após o rompimento de uma barragem de rejeitos minerários em 2019, ocasionando uma mudança em toda configuração geográfica do local e despejando um grande volume de sedimentos contendo metais pesados (Pereira et al, 2019).

1.4 Fígado

O fígado é um órgão vital para a sobrevivência de muitos animais, incluindo peixes, desempenhando diversas funções importantes, como a produção de bile, a regulação do metabolismo lipídico e a desintoxicação do organismo. Além disso, também é responsável pelo armazenamento de vitaminas e minerais, bem como pela síntese de proteínas plasmáticas (Bruslé & Anadon, 2017).

De modo geral, o fígado de peixes apresenta uma estrutura lobulada, com células hepáticas dispostas em placas ou cordões radiais, separados por sinusoides que permitem a troca de nutrientes e produtos metabólicos com o sangue circulante. Além

disso, o fígado pode apresentar diversas variações, como a presença de glomérulos ou células especiais, podendo variar de acordo com a espécie e as adaptações ao ambiente em que vivem (Bruslé & Anadon, 2017). Importante para a desintoxicação e metabolismo, o fígado é altamente sensível à exposição a metais pesados podendo levar, a danos celulares irreversíveis, incluindo prejuízos aos tecidos e comprometimento de suas funções além uma série de doenças hepáticas como esteatose hepática e cirrose hepática. (Flores-Lopes & Malabarba, 2007).

1.5 Metalotioneína

A metalotioneína é uma proteína de baixo peso molecular encontrada em diversos organismos, incluindo peixes. Ela desempenha um papel fundamental no metabolismo e na regulação dos metais, atuando como um agente de ligação e regulação do equilíbrio de íons metálicos essenciais, como zinco e cobre, e de metais potencialmente tóxicos (Hamer, 1986).

Nos peixes, a metalotioneína tem sido objeto de estudo devido à sua capacidade de se ligar a metais, ajudando a regular suas concentrações nos tecidos e a proteger contra os efeitos tóxicos da exposição a metais pesados no ambiente aquático. A presença e a expressão da metalotioneína nos peixes podem variar em resposta a diferentes condições ambientais, como poluição por metais, mudanças nos níveis de metais essenciais na água e outros fatores estressantes (Kito, et al., 1982; Klaverkamp, et al., 2020). A compreensão da função da metalotioneína nos peixes é fundamental não apenas para a biologia desses animais, mas também para avaliar os impactos ambientais da poluição por metais e para o desenvolvimento de estratégias de monitoramento e conservação dos ecossistemas aquáticos (Hamilton & Mehrle, 1986; Cosson & Amiard, 2021)

1.6 Proteína de choque térmico (HSP70)

As HSP70 são proteínas chaperonas induzíveis que desempenham um papel importante na resposta ao estresse celular, auxiliando na proteção e na recuperação das células expostas a condições adversas (Asea, 2008; Clark & Peck, 2009). Os peixes, como organismos aquáticos, estão constantemente expostos a mudanças ambientais e a fatores de estresse, incluindo variações na temperatura, poluentes químicos como os metais pesados (Svobodová, 1993).

Quando os peixes são expostos a condições estressantes, como a presença de metais pesados na água, há uma resposta celular desencadeada para proteger e reparar as células danificadas. A expressão das proteínas HSP70 é induzida nesses momentos, permitindo que essas proteínas exerçam suas funções de chaperonagem, ajudando na correta dobragem de proteínas, na degradação de proteínas malformadas e na prevenção do estresse oxidativo (Yamashita et al., 2010). Além disso, a expressão de HSP70 em peixes pode servir como um biomarcador útil para avaliar a exposição e a resposta ao estresse causado por agentes ambientais, incluindo metais pesados, poluentes orgânicos e variações extremas de temperatura na água (Mohanty et al., 2010).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

Ali, H., & Khan, E., 2018. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term 'heavy metals'—proposal of a comprehensive definition. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(1), 6-19.

Asea, A., 2008. HSP70: a chaperokine. In A. Asea (Ed.), *The Biology of Extracellular Molecular Chaperones: Novartis Foundation Symposium* 291, 173-183. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Atli, G., & Canli, M., 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8), 1884-1889.

Baki, M. A., et al., 2018. Concentration of heavy metals in seafood (fishes, shrimp, lobster and crabs) and human health assessment in Saint Martin Island, Bangladesh. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 159, 153-163.

Bernet, D., et al., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22(1), 25-34.

Bruslé, J., & Anadón, G. G., 2017. The structure and function of fish liver. In J. Bruslé & G. G. Anadón (Eds.), *Fish Morphology*, 77-93. Routledge.

Clark, M. S., & Peck, L. S., 2009. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: a mini-review. *Marine Genomics*, 1(2), 11-18.

Cobrape. n.d. Plano Diretor de Recursos Hídricos da Bacia do Rio Paraopeba. Recuperado de <https://www.pdrhparaopeba.com>

Cosson, R. P., & Amiard, J. C., 2021. Use of metallothioneins as biomarkers of exposure to metals. In *Use of biomarkers for environmental quality assessment* (pp. 79-111). CRC Press.

Costa, D. P., Monteiro, C. M., & Brasil-Sato, M. C., 2015. Digenea of *Hoplais intermedius* and *Hoplais malabaricus* (Actinopterygii, Erythrinidae) from upper São Francisco River, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24

De Jesus, I. S., et al., 2014. Analysis of metal contamination and bioindicator potential of predatory fish species along Contas River basin in northeastern Brazil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 92, 551-556.

Demirak, A., et al., 2006. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere*, 63(9), 1451-1458.

Flores-Lopes, F., & Malabarba, L. R., 2007. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (COPE, 1894) (Teleostei, Characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. *Biociências*, 15(2), 166-172.

- Fricke, R., Eschmeyer, W. N., & Van der Laan, R., 2018. Catalog of fishes: genera, species, references. California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
- Hamer, D. H., 1986. Metallothionein. Annual review of biochemistry, 55(1), 913-951.
- Hamilton, S. J., & Mehrle, P. M., 1986. Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contaminants. Transactions of the American Fisheries Society, 115(4), 596-609.
- Kito, H., et al., 1982. Formation of metallothionein in fish. Comparative biochemistry and physiology. C: Comparative pharmacology, 73(1), 129-134.
- Klaverkamp, J. F., et al., 2020. Evaluating the effectiveness of metal pollution controls in a smelter by using metallothionein and other biochemical responses in fish. In: Metal Ecotoxicology Concepts and Applications. CRC Press, 33-64.
- Li, J., & Xie, X., 2016. Heavy metal concentrations in fish species from Three Gorges Reservoir, China, after impoundment. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 96(5), 616-621.
- Lima, V. F., & Merçon, F., 2011. Metais pesados no ensino de química. Química nova na escola, 33(4), 199-205.
- Mattox, G. M., Bifi, A. G., & Oyakawa, O. T., 2014. Taxonomic study of *Hoplias microlepis* (Günther, 1864), a trans-Andean species of trahiras (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae). Neotropical Ichthyology, 12, 343-352.
- Mattox, G. M., Toledo-Piza, M., & Oyakawa, O. T., 2006. Taxonomic study of *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1846) and *Hoplias macrophthalmus* (Pellegrin, 1907) (Ostariophysi, Characiformes, Erythrinidae). Copeia, 2006(3), 516-528.
- Mohanty, B. P., et al., 2010. HSP70 expression profiles in white muscles of riverine catfish *Rita rita* show promise as biomarker for pollution monitoring in tropical rivers. National Academy Science Letters (India), 33(5), 177.
- Nai, G. A., et al., 2015. The influence of water pH on the genesis of cadmium-induced cancer in a rat model.
- Oyakawa, O. T., & Mattox, G. M., 2009. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. Neotropical Ichthyology, 7, 117-140.
- Paschoalini, A. L., et al., 2019. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. Ecotoxicology and environmental safety, 169, 539-550.
- Pereira, L. F., De Barros Cruz, G., & Guimarães, R. M. F., 2019. Impactos do rompimento da barragem de rejeitos de Brumadinho, Brasil: uma análise baseada nas mudanças de cobertura da terra. Journal of Environmental Analysis and Progress, 122-129.

- Polignano, M. V., & Lemos, R. S., 2020. Rompimento da barragem da Vale em Brumadinho: impactos socioambientais na Bacia do Rio Paraopeba. *Ciência e Cultura*, 72(2), 37-43.
- Reis, R. E., et al., 2016. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology*, 89(1), 12-47.
- Safe, S., 2003. Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nature medicine*, 9(8), 1000-1001.
- Sathawara, N. G., Parikh, D. J., & Agarwal, Y. K., 2004. Essential heavy metals in environmental samples from Western India. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 73(4).
- Schvartzman, A. S., Nascimento, N. O., & Von Sperling, M., 2002. Outorga e cobrança pelo uso de recursos hídricos: Aplicação à bacia do rio Paraopeba, MG. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 7(1), 103-122.
- Sfakianakis, D. G., et al., 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental research*, 137, 246-255.
- Svobodová, Z., 1993. Water quality and fish health. Food & Agriculture Org.
- Thévenod, F., & Lee, W.-K., 2015. Live and let die: roles of autophagy in cadmium nephrotoxicity. *Toxics*, 3(2), 130-151.
- Vieira, C., et al., 2011. Mercury, cadmium, lead and arsenic levels in three pelagic fish species from the Atlantic Ocean: intra-and inter-specific variability and human health risks for consumption. *Food and chemical Toxicology*, 49(4), 923-932.
- Yamashita, M., Yabu, T., & Ojima, N., 2010. Stress protein HSP70 in fish. *Aqua-BioScience Monographs*, 3(4), 111-141.
- Yu, M.-H., Tsunoda, H., & Tsunoda, M., 2011. *Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants*. CRC Press.

3. JUSTIFICATIVA

O fígado é um órgão fundamental para o metabolismo de substâncias tóxicas e, portanto, é frequentemente afetado pela exposição a poluentes ambientais, incluindo metais pesados. A avaliação dos efeitos desses poluentes no fígado de peixes é importante para entender como esses organismos estão respondendo à exposição a esses metais e quais os impactos na saúde desses animais.

Além disso, *H. intermedius* é uma espécie nativa de água doce encontrada em várias bacias hidrográficas da América do Sul, incluindo a Bacia Amazônica, e é amplamente utilizado como alimento. O estudo dos efeitos dos metais pesados no fígado dessa espécie é importante para avaliar o risco de contaminação desses peixes e sua segurança alimentar.

Portanto, o estudo do impacto de metais pesados no fígado de *H. intermedius* é fundamental para a compreensão dos efeitos desses poluentes na saúde dos peixes, na cadeia alimentar e na saúde humana.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos crônicos da exposição a metais pesados sobre o fígado de *H. intermedius* do rio Paraopeba, bacia do rio São Francisco, Minas Gerais

4.2 Objetivo Específicos

- Identificar em lâminas histológicas patologias no fígado
- Comparar alterações histopatológicas com fígados controles correlacionar as histopatologias com concentrações de metais
- Avaliar as alterações na expressão de metalotioneína (MT) e proteínas de Choque Térmico-70 (HSP70) no fígado, via imunohistoquímica

5. ARTIGO A SER SUBMETIDO

Alterações histopatológicas e moleculares no fígado de *Hoplias intermedius* (Günther, 1864) (Pisces: Erythrinidae) contaminados por metais pesados em um rio Neotropical.

Gabriel Eric Rodrigues Arêdes¹, Nilo Bazzoli², Alessandro Loureiro Paschoalini³

ABSTRACT

Os metais pesados, oriundos de atividades humanas quanto de processos naturais, representam uma ameaça para os organismos aquáticos e o meio ambiente. Para analisar os efeitos de metais pesados sobre o fígado do trairão *Hoplias intermedius* do rio Paraopeba, Minas Gerais, Brasil, foram coletados fragmentos do órgão para análises histopatológicas e imunohistoquímicas. Foram analisados na água e no fígado a concentração dos metais: Al, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Zn. Os resultados mostraram concentrações de metais pesados na água acima dos níveis permitidos: Al, Cd e Mn e, no fígado: Cd, Pb, Cr e Fe. No fígado observaram-se a dilatação e congestão de capilares sinusoides e veia lobular; vacuolização dos hepatócitos; formação de centros melanomacrofágicos e sinais de necrose tecidual. Na análise imunohistoquímica para metalotioneína e proteínas de choque térmico (HSP70), foi observado um aumento das marcações no fígado de *H. intermedius* do rio Paraopeba, quando comparado com os peixes do ambiente controle. Esses achados indicam possíveis impactos na saúde ambiental e humana pelo consumo de peixes contaminados.

Palavras chaves: Biodiversidade, Contaminação, Metalotioneína, HSP70.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes desempenham papel fundamental nos ecossistemas aquáticos, contribuindo para a manutenção da biodiversidade e para a estabilidade dos habitats aquáticos, além da segurança alimentar global, como importante fonte de proteínas e nutrientes para população (Worm, et al., 2006; Golden, et al., 2016). A crescente industrialização e urbanização ao longo dos últimos séculos têm gerado impactos ambientais preocupantes (Shahjahan, 2022). Entre os diversos problemas ambientais enfrentados, a contaminação de ambientes aquáticos por metais pesados emerge como uma questão importante, gerando sérios desafios para a sustentabilidade e a preservação dos ecossistemas aquáticos. Por isso, determinar os níveis de contaminantes, como metais pesados, e os efeitos potenciais desses poluentes em peixes e organismos que os consomem, incluindo humanos, é de importância mundial (Burger & Gochfeld, 2005).

Os metais pesados, assim denominados devido à alta densidade e massa atômica elevada (3,5 a 7,0 g/cm³ e 23 g/mol, respectivamente), são elementos químicos que podem ocorrer naturalmente no meio ambiente e a sua introdução no meio aquático pode ser oriunda do processo de intemperismo geológico (Hawkes, 1997; Bradl, 2005). Entretanto, a principal fonte nesses ecossistemas advém de atividades antrópicas como efluentes domésticos, atividades industriais e agrícolas (Bradl, 2005). Sendo classificados como essenciais e não essenciais, os metais pesados essenciais, como: ferro (Fe), cobalto (Co), manganês (Mn), níquel (Ni), cobre (Cu), molibdênio (Mo) cromo (Cr), e zinco (Zn), desempenham funções importantes no organismo sendo necessários para várias funções biológicas, como o metabolismo, a formação de tecidos, a atividade enzimática e a transmissão de sinais nervosos. O ferro, por exemplo, é essencial para a formação dos glóbulos vermelhos do sangue e o transporte de oxigênio (Sathawara, Parikh & Agarwal, 2004). Entretanto, metais não essenciais como chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), arsênio (As) e alumínio (Al) não desempenham funções biológicas importantes e mesmo em pequenas concentrações mostram alto poder acumulativo e toxicidade em organismos (Yu, Tsunoda & Tsunoda, 2011; Sfakianakis, 2015), podendo causar disfunções moleculares e fisiológicas (Junior et al., 2002). Além disso, exposições crônicas a esses poluentes, podem levar a alterações na estrutura das comunidades, diminuição da diversidade biológica e consequentemente impactos negativos na funcionalidade dos ecossistemas (Baby, 2010). Uma característica preocupante desses poluentes é que eles são dificilmente degradados ou

metabolizados, acumulando-se no meio ambiente e nos organismos ao longo do tempo (Paschoalini & Bazzoli, 2021).

Os peixes, como organismos aquáticos, estão diretamente expostos a esses poluentes e a bioacumulação desses metais no organismo eleva a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo gerar stress oxidativo (Atli & Canli, 2010), interromper a homeostase de íons, induzir a danos no DNA (Vieira et al., 2011; Nai et al., 2015; Li et al., 2015), e gerar diversas histopatologias em diferentes órgãos e tecidos, podendo levar a necroses e câncer (Shahjahan, 2022). Adicionalmente, alguns metais como alumínio, cádmio, cobre, chumbo e mercúrio, possuem influência na produção e regulação hormonal, sendo chamados de metaloestrógenos e incluídos na classe de poluentes conhecida como desreguladores endócrinos (EDCs) (Safe, 2003; Paschoalini, Arantes & Bazzoli, 2019).

Sendo o principal órgão responsável pela desintoxicação, o fígado desempenha um papel fundamental na regulação de substâncias químicas potencialmente nocivas ao organismo como os metais pesados, assim seu estado de saúde pode ser um indicador importante da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos. Através de biomarcadores, como enzimas hepáticas e acúmulo de substâncias tóxicas, é possível avaliar o impacto da poluição e de outros estresses ambientais nos peixes e, por extensão, nos ecossistemas em que vivem (Farombi et al, 2007; Abdel-moneim, Al-kahtani, e Elmenshawy, 2012).

Hoplias intermedius é uma espécie de peixe encontrada em diversas regiões da América do Sul, incluindo a bacia Amazônica, a bacia do rio Paraná e a bacia do rio São Francisco. Esta espécie desempenha um papel importante no ecossistema aquático, regulando populações de pequenos peixes e contribuindo para o equilíbrio das comunidades aquáticas, além de sua importância econômica e gastronômica para a população local (Oyakawa & Mattox, 2009). *H. intermedius* também é considerada ecologicamente resistente às mudanças ambientais capazes de viver em rios altamente impactados (Vieira et al., 2015), como a bacia do rio Paraopeba, uma região de grande importância econômica e ambiental localizada no sudeste do Brasil. No entanto, essa bacia enfrenta grande pressão antrópica decorrente do desmatamento, poluição hídrica, expansão agrícola e urbanização desordenada, que impactam negativamente a saúde do ecossistema e a qualidade de vida das comunidades que dependem diretamente dos recursos da região (Thompson et al., 2020)

O presente estudo tem como objetivo analisar os principais impactos no fígado de *H. intermedius* causados pela exposição a metais pesados no rio Paraopeba, abordando as vias de contaminação, como atividades minerárias, despejo de resíduos domésticos e industriais e seus efeitos sobre a biodiversidade e a saúde humana.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostragem, dados biométricos e índices biológicos

Exemplares de *H. intermedius* (n= 5) foram coletados na região mais poluída do rio Paraopeba (20°08.'54"S: 44°10'25"O) e no rio Abaeté (18°06'.29"S; 45°27'.06"O), ambiente controle (n= 5), visto que é um rio com boa qualidade de água e baixos níveis de metais no período de dezembro de 2021. Os peixes foram capturados utilizando redes de emalhar e tarrafas, e eutanasiados com imersão em eugenol (250 mg. L⁻¹). De cada exemplar foram obtidos comprimento total (CT), peso corporal (PC) e peso do fígado (PF) e foi calculado índice hepatossomático (IHS = 100 x PF/PC). Os procedimentos de coleta seguiram os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética no uso animal da PUC Minas, CEUA (protocolo 021/2015).

2.2 Análises histológicas

Fragmentos da região média do fígado de todos os exemplares coletados foram fixados em líquido de Bouin por 8 a 12 h e mantidas em etanol a 70%. As amostras foram gradualmente desidratadas em etanol, embebidas em parafina, seccionadas à 5 um de espessura e coradas com hematoxilina-eosina (HE).

Morfológicamente os cortes foram analisados em toda sua extensão e fotografados (ocular de 10X e objetiva de 40X) em 10 campos aleatórios em busca de alterações morfológicas.

2.3 Imunohistoquímica

Para reações imunohistoquímicas HSP70 e Metalotioneína (MT), cortes de fígado (n=5) passaram por lavagem em água por 60 min e recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) por 30 min em banho-maria a 60° C. Em seguida, foram incubados em H₂O₂ a 3% para inativar a peroxidase endógena. Para bloqueio demarcações inespecíficas, foi utilizado tampão de bloqueio (2% de albumina de soro

bovino + 0,05% de Triton X-100 + 0,01% de Tweed 20). Anticorpos primários (HSP70 e MT) foram aplicados aos cortes durante a noite em câmara úmida a 4°C. Para visualização das marcações, os cortes foram marcados com 3'3-diaminobenzidina (DAB) e contra corados com hematoxilina. Para o controle negativo, os tratamentos com anticorpos primários foram omitidos.

2.3 Análise de metais pesados na água e fígado

Para análise de metais pesados, foram coletadas amostras de água do rio Paraopeba e no rio Abaeté, as quais foram armazenadas em vidros âmbar e imediatamente congeladas para posterior quantificação. Da mesma forma, fragmentos de fígado foram extraídos e armazenados a -20°C para quantificação de metais pesados.

Para os metais alumínio (Al), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr), cobre (Cu) e ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn) a digestão ácida das amostras foi realizada utilizando micro-ondas modelo StartD (Milestone) com aquecimento controlado de temperatura para a determinação dos referidos metais por métodos espectroscópicos (Milestone, 2010). Foram pesadas aproximadamente 1,5 g em triplicata para cada amostra úmida e colocada em bombas de PTFE-TFM com 20 ml de HNO₃ (65%), e digeridas durante 25 min a uma temperatura de 220°C. No processo de digestão também foram preparadas soluções-branco de modo similar às amostras. Para assegurar a qualidade analítica dos resultados e validação do método, amostras foram comparadas com o padrão certificado de proteína de peixe DORM 2 (fish protein certified reference material for trace metals Canadá).

2.4 Parâmetros físico-químicos da água

Temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água nos pontos de amostragem foram registrados utilizando sonda multiparamétrica Horiba U51.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, SanDiego CaliforniaUSA, www.graphpad.com). Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP), e os resultados foram considerados significativos com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Como os dados biológicos e as concentrações de metais não apresentaram

distribuição normal, foram analisados através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

3. RESULTADOS

Os parâmetros físico-químicos da água registrados nos dois ambientes não mostraram diferenças significativas e estão detalhados na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos da água nos rios Abaeté e Paraopeba

	Abaeté	Paraopeba
Dissolved oxygen (mg/L)	6.8±0.22 ^a	6.5±0.79 ^a
pH	6.4±0.21 ^a	6.5±0.35 ^a
Temperature (°C)	27.6±0.92 ^a	25.6±1.35 ^a
Electrical conductivity (µS/cm)	57.1±7.54 ^a	81.0±9.79 ^a

Letras diferentes significam diferença estatística entre os pontos (P<0.05)

A análise dos metais pesados (Al, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Zn) nas amostras de águas evidenciou a presença de Al, Mn e Cd acima dos níveis preestabelecidos pelos parâmetros oficiais segundo as referências CONAMA (2005), CCME (2011) e USEPA (2017) (Tabela 2). Os níveis de Pb, Cu, Cr, Fe e Zn não foram detectados ou apresentaram dentro dos parâmetros seguros nos pontos. No fígado, os níveis de Al, Cu, Mn e Zn estavam dentro dos limites seguros, ou não havia limites estabelecidos pelas resoluções consultadas: Em contrapartida, Cd, Pb, Cr e Fe apresentaram níveis acima das referências estabelecidas (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise de metais na água e no fígado dos peixes provenientes dos rios Abaeté e Paraopeba

Amostras	Metais								Referencias
	Al	Cd	Pb	Cu	Cr	Fe	Mn	Zn	
Rio Abaeté (controle)									
Água	0.01±0.005	ND	ND	ND	ND	0.1±0.05	ND	0.005±0.001	
Fígado	6.36±1.22	0.04±0.02	0.29±0.17	8.74±2.8	0.08±0.05	135.34±126.99	1.13±1.03	10.98±4.69	
Rio Paraopeba									
Água	0.145	0.013	ND	ND	ND	0.259	0.163	0.027	
Fígado	29.7±18.5	0.11±0.08	0.91±0.70	8.12±7.16	0.77±0.40	143.15±80.47	2.63±1.56	13.29±12.83	
Limites na água (mg/ml)	0.1	0.001	0.01	0.009	0.05	0.3	0.1	0.18	CONAMA (2005)
		0.00009	0.001	0.002	0.001	0.3	0.35	0.03	CCME (2011)
	0.087	0.00072	0.002		0.011	1.0		0.12	USEPA (2023)
Limites nos tecidos (mg/Kg)		0.05	0.3						ANVISA (2013)
		0.05	0.2	30		109			FAO/WHO (2002)
		1.00		30	0.1			50	Decreto 55871 (1965)

O índice hepatossomático calculado para os peixes provenientes dos dois locais de coleta mostrou uma variação significativa, sendo os maiores valores registrados nos indivíduos do rio Paraopeba e indicando um maior peso hepático em relação ao peso corporal (Figura 1).

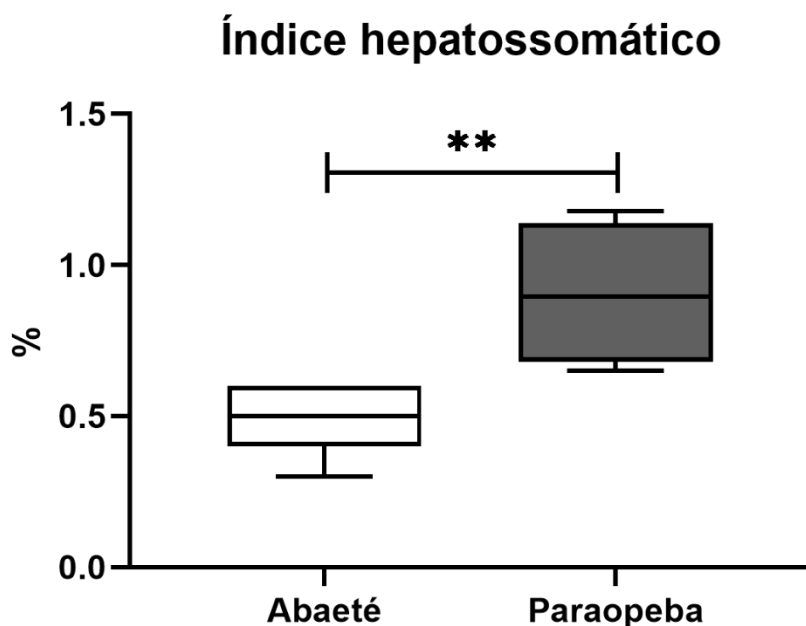


Figura 4 – Gráfico representando a comparação entre os índices hepatossomático dos peixes provenientes dos rios Abaeté e Paraopeba. **= variação significativa entre os rios

Histologicamente, o fígado dos peixes controle apresentou organização cordonal do arranjo dos hepatócitos, formando placa de células em contato direto com os capilares sinusoides. Os hepatócitos apresentaram forma hexagonal, com núcleo central, basófilo e vesiculoso. Os sinusoides apresentaram-se revestidos por endotélio com células pavimentosas (Figura 2-A).

Nos peixes contaminados, foram observadas várias histopatologias, como: dilatação e congestão de capilares sinusoides e veia lobular; vacuolização dos hepatócitos (Figura 2-B e 2-C); formação de centros melanomacrofágicos (Figura 2-D e 2-E) e sinais de necrose tecidual, como retração e adensamento do núcleo (picnose) e fragmentação do núcleo picnótico (cariorrexe) (Figura 2-F e 2-G)

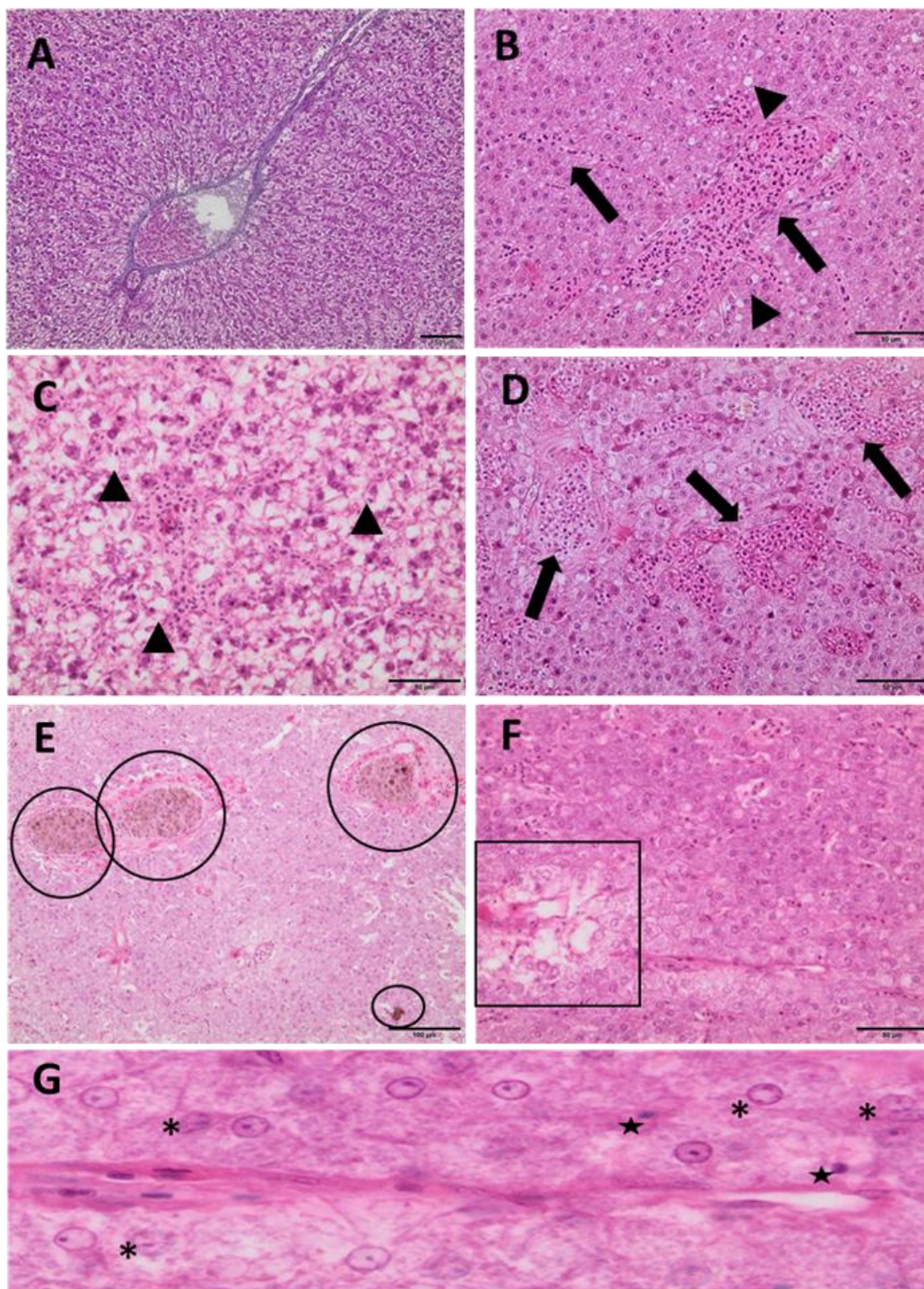


Figura 5– Histopatologias de fígado em *H. intermedius* expostos a metais pesados. A= Representação de fígado saudável; B= Dilatação e congestão de capilares sinusóides e veia lobular (seta), e pontos de vacuolização dos hepatócitos (cabeça de seta); C= vacuolização sistêmica de células hepáticas (cabeça de seta); D e= pequeno centro melanomacrofágico (círculo), dilatação e congestão dos capilares sinusóides (setas). Formação de centro melanomacrofágico (círculo); F= necrose tecidual (quadrado); G= detalhe da figura anterior mostrando área de necrose do tecido hepático ao redor de capilar sinusóide, picnose (estrela) e cariorrexe (asterisco). Coloração HE.

Na análise imunohistoquímica para metalotioneína (MT), foi observado um aumento das marcações no fígado de *H. intermedius* do rio Paraopeba, quando comparado com os peixes do ambiente controle (Fig 3A) No fígado dos peixes contaminados foram observadas marcações fortemente positivas em células endoteliais da veia lobular e endotélio de capilares sinusoides e células de Kupfer, além disso também foi observada uma marcação mais fraca e difusa no citoplasma dos hepatócitos (Figura 3B).

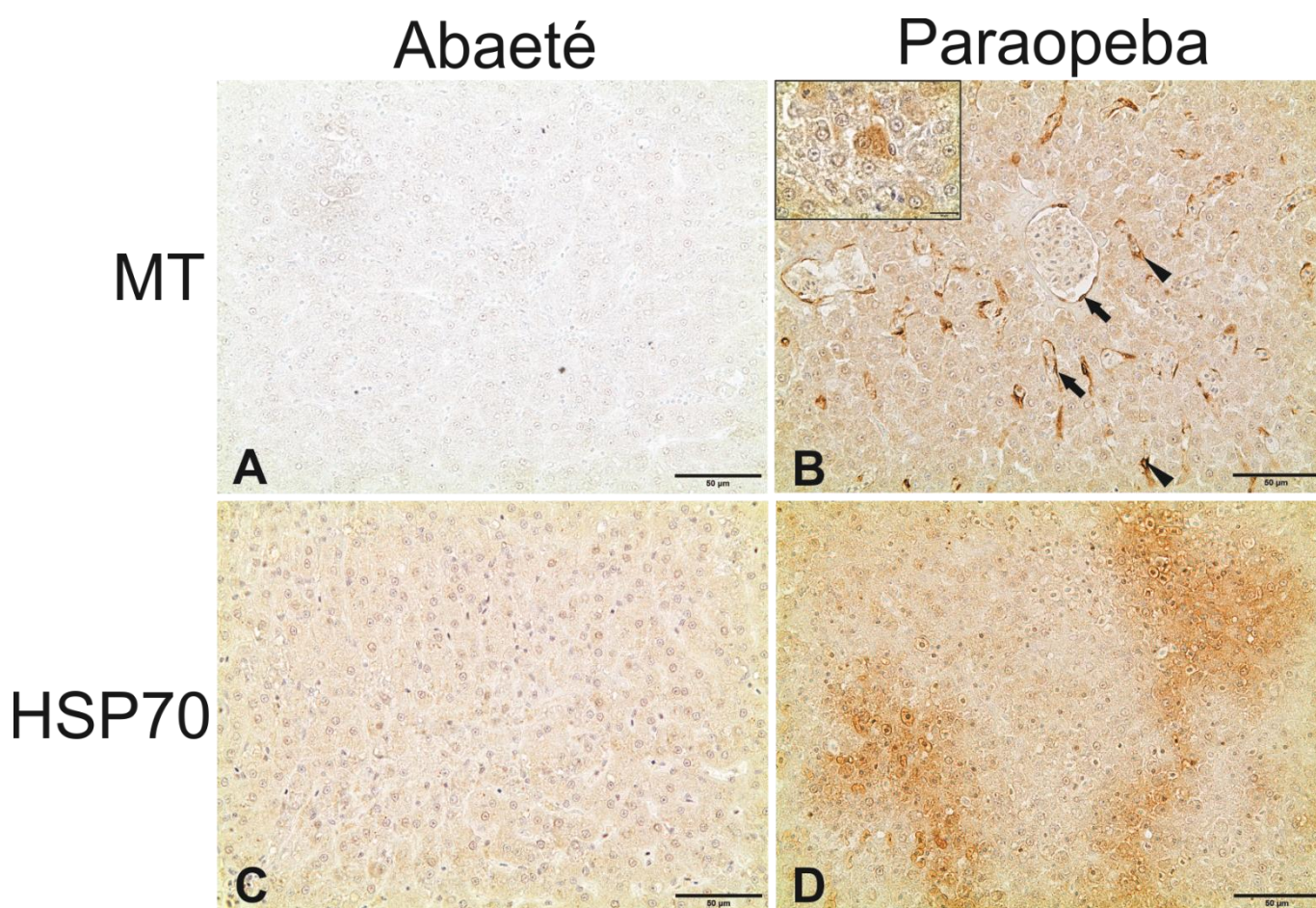


Figura 6 – Imunohistoquímica para metalotioneína (MT) e Proteína de choque térmico (HSP70) em fígado, de *H. intermedius* provenientes do rio Paraopeba MG. A = Fígado de exemplar do rio Abaeté - controle. B= fígado com marcações positivas no endotélio (seta), células de Kupfer (cabeça de seta) e hepatócitos (encarte); C= Marcações difusas de HSP70; D= Marcações fortemente positivas de HSP70 em peixe proveniente do rio Paraopeba.

4. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas a presença de metais pesados em ambientes aquáticos é uma preocupação ambiental devido aos efeitos negativos sobre os ecossistemas aquáticos, a vida marinha e, saúde humana. Os peixes por sua vez, desempenham um papel fundamental como bioindicadores da saúde do meio ambiente devido à sua sensibilidade aos impactos ambientais e à sua posição na cadeia alimentar, sendo altamente suscetíveis a mudanças nas condições ambientais, tornando-os indicadores das condições dos ecossistemas aquáticos (Chovanec , Hofer e Schiemer, 2003; Authman,2015).

Medir os parâmetros físicos e químicos em um rio é fundamental, muitos organismos aquáticos são sensíveis a mudanças nos parâmetros físicos e químicos da água. O monitoramento constante ajuda a identificar condições adversas que podem afetar peixes, anfíbios e outros seres vivos aquáticos, permitindo a tomada de medidas para protegê-los (Suharto et al.,2019). No presente estudo não se constatou diferença significativa ($p < 0,05$) para os parâmetros físicos e químicos da água nos rios Abaeté e Paraopeba ressaltando a não interferência destes nos resultados apresentados. O rio possui qualidade para abastecimento público, após tratamento adequado, como também capacidade para abrigar a fauna e flora ali existente. No entanto, O Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM), em seu boletim informativo nº 46 de março de 2023 ainda recomendava a não utilização da água bruta do rio Paraopeba para qualquer fim, como medida preventiva, no trecho de aproximadamente 250km após o local de rompimento da barragem B1.

A concentração de metais acima dos parâmetros na água evidência a contaminação do meio hídrico desta bacia. As consequências destas altas concentrações são notórias e demonstradas em vários estudos. De carvalho, et al., (2017) também evidenciou altas concentrações de Al, Ni e Cu nas águas do rio Doce no distrito de Bento Rodrigues, em Mariana, Minas Gerais, segundo o autor a presença de Ni nos corpos d'água não é comum, assim como o Cu, Al geralmente aparecem em concentrações baixas. Não diferente o próprio IGAM também em seu boletim informativo nº 46 de março de 2023, seguindo como parâmetro a Deliberação Normativa Conjunta Copam/CERH-MG nº 08/2022 também evidenciou violações nos níveis de Al, Mn e Fe sobre os limites legais estabelecidos para Classe 2, no Rio paraopeba (IGAM,2023). Tomando o Al como exemplo, o aumento de suas

concentrações pode ser tóxico para diversos organismos aquáticos, incluindo peixes, invertebrados e algas (Chapman, 2002). Simultaneamente, com o objetivo de analisar a situação

da poluição no ambiente aquático da Malásia, Shazili et al., (2006) evidenciaram a contaminação por Pb e Zn nos sedimentos de ambientes costeiros que recebem resíduos de áreas de altas atividades humanas, além da água de alguns rios próximos às grandes cidades onde os bivalves e algas também possuíam altas concentrações dos poluentes. Outro estudo, realizado no Reino Unido, indicou o aumento de 50% na incidência de pessoas com o mal de Alzheimer ao consumo de águas com concentrações superiores a 0,01 mg L⁻¹ de Al. (Di Bernardo Paz, 2008). Nosso estudo também corrobora com tais resultados evidenciando a concentração elevada de Al, Cd e Mn na água e Cd, Pb, Cr e Fe nos tecidos de *H. Intermedius* mostrando mais uma vez os problemas ambientais no meio aquático, saúde animal e humana, na bacia do rio Paraopeba também a nível mundial.

A presença de metais pesados na água afeta diretamente os peixes, a maioria dos metais não podem ser simplesmente metabolizados em compostos que o tornarão menos tóxicos. Uma vez inseridos no corpo d'água, sua agregação aos sedimentos e na dieta dos animais leva a uma bioacumulação irreversível (Baby, 2010; Frémion, 2016). Paschoalini et al. (2019) ao analisar o acúmulo de metais pesados e desregulação endócrina em *Prochilodus argenteus*, espécie presente na bacia do rio Paraopeba evidenciaram modificações morfofisiológicas como dilatação e congestão dos sinusóides e presença de centros melanomacrófagicos.

O índice hepatossomático (IHS) é uma medida utilizada em estudos e pesquisas para avaliar a relação entre o fígado e o peso corporal de um organismo, comumente utilizada em estudos sobre toxicologia e fisiologia (Agostinho, et al. 2018). Mudanças no índice hepatossomático podem indicar condições de saúde, como problemas hepáticos, inflamações ou lesões fornecendo uma abordagem mais abrangente do estado de saúde dos peixes expostos à água contaminada (Furley, 2015). Neste estudo, diferenças significativas podem ser explicadas pela exposição aos metais pesados na água. Authman, (2011) relatou que IHS em peixes exposto a altas doses de Al foi maior que o grupo controle e esta situação estava relacionada ao acúmulo de lipídios no fígado do peixe. Monsefrad et al. (2012) também correlacionaram o aumento do IHS a presença de metais pesados detectados no fígado

Por sua vez, o fígado, órgão alvo do estudo, é o principal órgão relacionado a metabolização de poluentes e desintoxicação dos peixes e de outros seres vivos (Bruslè e Anadón, 2017), A contaminação por metais pesados pode ser um importante agente indutor nas alterações morfológicas e na estrutura dos fígados desses animais. Rabitto et al (2005) evidenciou os efeitos histopatológicos e bioquímicos como perda da forma nuclear, picnose nuclear e aumento da atividade fagocitária da exposição de Pb e tributilestanho (TBT) na dieta induzida de *Hoplias malabaricus*. Teh et al. (1997) e Pacheco & Santos (2002) também relataram lesões hepáticas em peixes como evidência da exposição a múltiplos estressores ambientais, colaborando com a hipótese de uma relação prática entre biomarcadores histopatológicos e bioquímicos para avaliação da saúde do organismo e ecossistema.

Em concordância, evidenciamos de alterações histopatológicas no fígado de *H. intermedius*. A priori houve a dilatação e congestão de capilares sinusóides e veia lobular. A congestão dos capilares sinusóides e veia lobular refere-se a um acúmulo excessivo de sangue nos capilares (Henares, 2007; Pinheiro, 2017). Junto a isto, segundo Deore & Wagh (2012) a presença de vacuolização nos hepatócitos pode ser um sinal de ingestão ou exposição de substâncias tóxicas. A ocorrência dos centros melanomacrofágicos (CMMs) também pode ser um bom biomarcador de exposição a agentes de estresse diversos (Rabitto et al, 2005). Centros melanomacrofágicos no fígado de peixes podem indicar um processo inflamatório crônico ou uma reação a danos no tecido hepático sendo um bom biomarcador de exposição a agentes de estresse diversos (Rabitto et al, 2005). Alguns autores demonstraram que CMMs em órgãos como fígado, rins, baço e intestino aumentam de tamanho e/ou frequência quando expostos a metais pesados e alcalóides (Glencross et al, 2006; Fishelson, 2006). Já a necrose tecidual possui diferentes origens, entretanto, o estresse oxidativo gerado pelos metais nas células, podem acarretar danos nas membranas celulares, nas organelas e no material genético (Lackner,1998). Como resultado, ocorrem alterações nas funções celulares normais, levando à eventos de necrose como a cariorexe e picnose à degradação dos tecidos comprometendo a função desses órgãos, interferindo em processos metabólicos e na homeostase do indivíduo (Teh et al, 1997).

A imunohistoquímica é uma técnica laboratorial amplamente utilizada na área da patologia e pesquisa para identificar, localizar e quantificar proteínas específicas em amostras de tecido. Essa técnica emprega anticorpos que se ligam a proteínas-alvo em tecidos (Ramos-Vara, 2005; Schacht & Kern, 2015) o que também a torna um excelente

biomarcador devido a sua especificidade e capacidade de se ligar a íons metálicos, a podendo ser utilizada no monitoramento de ambientes aquáticos contaminados por metais pesados onde sua função biológica envolve detoxificação e a homeostase de metais (Chan, 1995; Rajeshkumar et al., 2013). A alta expressão de metalotioneína nos fígados amostrados corroboram para a evidência de metais pesados no fígado de *H. intermedius*. Quando os peixes são expostos a altas concentrações de metais pesados em seu ambiente, as células do fígado podem responder produzindo maiores quantidades de MT (Hamer, 1986), isso ocorre porque a MT tem a capacidade de se ligar a íons metálicos tóxicos, prevenindo assim danos celulares e protegendo o organismo. (Hamilton, 1986; Olsson, et al., 1993; Jabeen,2022). Entretanto, mesmo que se recomende o uso da MT em estudos de contaminação por metais pesados, por sua utilização, em estudos toxicológicos, principalmente brasileiros, ainda é pouco estabelecida e necessita ser melhor investigada na ictiofauna.

Por sua vez, a expressão da HSP70 nos fígados amostrados também é um indício de contaminação por metais pesados. A reação ao estresse é uma característica fundamental da HSP70. Em situações de estresse, como toxinas, a expressão da HSP70 é aumentada. Isso ocorre como uma resposta adaptativa da célula para proteger e preservar suas proteínas e estruturas celulares (Pelham, 1982; Yamashita,Yabu e Ojima, 2010). Um estudo realizado por Bianchini et al. (2005) investigou a expressão de HPS70 em peixes marinhos expostos a diferentes concentrações de cobre. Os resultados indicaram um aumento significativo na expressão do gene HPS70 nos peixes expostos ao metal em comparação com o grupo controle. Isso sugere uma resposta adaptativa dos peixes para lidar com o estresse induzido pelo cobre. Além disso, uma pesquisa conduzida por Martinez et al. (2010) analisou os efeitos da exposição ao cádmio na expressão de HPS70 em peixes de água doce. Os resultados revelaram um aumento na expressão de HPS70 no fígado e nas brânquias dos peixes expostos a concentrações de cádmio, demonstrando a ativação desse gene como parte da resposta ao estresse causado por esse metal pesado, como também observado por Savassi et al. (2020).

5. CONCLUSÃO

O presente estudo indica que há contaminação por metais pesados tanto na água da bacia do rio Paraopeba, quanto nos fígados amostrados de *H. intermedius*. Também pode-se relacionar à maior ocorrência de alterações histopatológicas no fígado com a bioacumulação de metais pesados. Estas alterações, associadas ao aumento da expressão de MT, HSP70 no fígado de *H. intermedius*, sugerem que estes podem ser utilizados como biomarcadores na avaliação de qualidade ambiental em ecossistemas aquáticos contaminados por metais pesados. Em resumo, os dados obtidos no presente estudo mostram que os metais pesados podem influenciar negativamente a biologia de *H. intermedius* e indiretamente na saúde humana através consumo desse peixe contaminado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro, e à PUC Minas pela bolsa institucional concedida.

REFERÊNCIAS

- Agostinho, Angelo Antonio, et al., 2018. Variação do fator de condição e do índice hepatossômico e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829)(Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR.
- Abdel-Moneim, A. M., Al-Kahtani, M. A., & Elmenshawy, O. M., 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, 88(8), 1028-1035.
- Atli, G., & Canli, M., 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8), 1884-1889.
- Authman, Mohammad MN, et al., 2011. Environmental and experimental studies of aluminium toxicity on the liver of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fish. *Life Science Journal*, 8(4), 764-776.
- Authman, Mohammad MN, et al., 2015. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6(4), 1-13.
- Baby, Joseph, et al., 2010. Toxic effect of heavy metals on aquatic environment. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4(4).
- Bianchini, A., et al., 2005. Copper accumulation and heat shock protein induction in the tropical fish (*Paracheirodon axelrodi*) following waterborne copper exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(11), 2945-2951.
- Bradl, HB., 2005. Fontes e origens dos metais pesados. Em *Interface ciência e tecnologia* (Vol. 6, pp. 1-27). Elsevier.
- Bruslé, Jacques, & Anadon, Gemma González I., 2017. The structure and function of fish liver. In: *Fish morphology*. Routledge, 77-93.
- Burger, Joanna, & Gochfeld, Michael, 2005. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. *Environmental research*, 99(3), 403-412.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). (2011). Canadian water quality guidelines for the protection of environmental and human health. In *Canadian environmental quality guidelines*. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment.
- Chan, King Ming, 1995. Metallothionein: potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4-12), 411-415.
- Chapman, Peter M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Marine pollution bulletin*, 44(1), 7-15.
- Chovanec et al., 2003. Fish as bioindicators. In: *Trace metals and other contaminants in the environment*. Elsevier, 639-676.

Conama., 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 357 de Março de 2005. Disponível em: www.mma.gov.br/conama acesso em: 20/05/2023.

De Carvalho, Marllon Santos, et al., 2017. Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. *Acta Brasiliensis*, 1(3), 37-41.

Deore, S. V., & Wagh, S. B., 2012. Heavy metal induced histopathological alterations in liver of *Channa gachua* (Ham). *Journal of Experimental Sciences*, 3(3), 35-38.

Di Bernardo, Luiz, & Paz, Lyda Patricia Sabogal, 2008. Seleção de tecnologias de tratamento de água. São Carlos: LDIBE, 1.

Farombi, EO, Adelowo, OA, & Ajimoko, YR, 2007. Biomarcadores de estresse oxidativo e níveis de metais pesados como indicadores de poluição ambiental em peixe-gato africano (*Clarias gariepinus*) do Rio Ogun da Nigéria. *Revista internacional de pesquisa ambiental e saúde pública*, 4(2), 158-165.

Fishelson, Lev, 2006. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head- kidney, and liver in cardinal fish (*Apogonidae*, *Teleostei*) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology*, 267(1), 57-69.

Frémion, Franck, et al., 2016. Influence of dams on sediment continuity: A study case of a natural metallic contamination. *Science of the Total Environment*, 547, 282-294.

Furley, T., & Perônico, Clayton, 2015. Guia técnico de monitoramento dos efeitos ambientais em corpos hídricos. Instituto Aplysia. Vitória.

Glencross, Brett, et al., 2006. The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilisation and gastrointestinal histology. *Aquaculture*, 253(1-4), 512-522.

Golden, Christopher D., et al., 2016. Nutrition: Fall in fish catch threatens human health. *Nature*, 534(7607), 317-320.

Hamilton, Steven J., & Mehrle, Paul M., 1986. Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115(4), 596-609.

Hamer, Dean H., 1986. Metallothionein. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 913-951.

Hawkes, S. J., 1997. What is a "heavy metal"? *Journal of chemical education*, 74(11), 1374.

Henares, Matheus Nicolino Peixoto, et al., 2007. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do Diquate na brânquia e no fígado do piaçu (*Leporinus macrocephalus*). *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 17.

IGAM, 2023. Instituto Mineiro de Gestão das Águas. boletim informativo nº 46 de março de 2023

Jabeen, Ghazala, et al., 2022. Investigation on immune-related protein (heat shock proteins and metallothionein) gene expression changes and liver histopathology in cadmium-stressed fish. *BioMed Research International*, 2022.

- Junior, Roberto Guião de Souza Lima, et al., 2002. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Research*, 89(2), 171-179.
- Lackner, Reinhard, 1998. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. *Fish ecotoxicology*, 203-224.
- Martinez, R., et al., 2010. Cadmium-induced oxidative stress and histological damage in the liver of freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(3), 224-228.
- Nai, G. A., et al., 2015. The influence of water pH on the genesis of cadmium-induced cancer in a rat model.
- Oyakawa, Osvaldo T., & Mattox, George MT, 2009. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotropical Ichthyology*, 7, 117-140.
- Olsson, P. E., et al., 1993. Metallothionein gene expression and regulation in fish. *Metallothionein gene expression and regulation in fish*, 259-278.
- Pacheco, Mario, & Santos, Maria Ana, 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 53(3), 331-347.
- Paschoalini, A. L., Savassi, L. A., Arantes, F. P., Rizzo, E., & Bazzoli, N., 2019. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. *Ecotoxicology and environmental safety*, 169, 539-550.
- Paschoalini, A. L., & Bazzoli, N., 2021. Heavy metals affecting Neotropical freshwater fish: A review of the last 10 years of research. *Aquatic Toxicology*, 237, 105906.
- Pelham, Hugh RB., 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell*, 30(2), 517-528.
- Pinheiro, Krystianne Beatrix Souza, et al., 2017. Histopatologia do fígado de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 proveniente de área sobre influência de mineração na Amazônia Oriental, Brasil. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 7(3), 74-78.
- Rabitto, I. S., et al., 2005. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(2), 147-156.
- Rajeshkumar, Sivakumar, Mini, Jayaprakash, & Munuswamy, Natesan, 2013. Effects of heavy metals on antioxidants and expression of HSP70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, Chennai, India. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 8-18.
- Ramos-Vara, Jose A., 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology*, 42(4), 405-426.

- Safe, Stephen, 2003. Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nature medicine*, 9(8), 1000-1001.
- Sathawara, N. G., Parikh, D. J., & Agarwal, Y. K., 2004. Essential heavy metals in environmental samples from Western India. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 73(4).
- Savassi, L. A., Paschoalini, A. L., Arantes, F. P., Rizzo, E., & Bazzoli, N., 2020. Heavy metal contamination in a highly consumed Brazilian fish: immunohistochemical and histopathological assessments. *Environmental monitoring and assessment*, 192, 1-14.
- Schacht, Vivien, & Kern, Johannes S., 2015. Basics of immunohistochemistry. *Journal of investigative dermatology*, 135(3), 1-4.
- Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M., & Tsatsakis, A. M., 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental research*, 137, 246-255.
- Shahjahan, Md, et al., 2022. Effects of heavy metals on fish physiology—a review. *Chemosphere*, 300, 134519.
- Shazili, Noor Azhar M., et al., 2006. Heavy metal pollution status in the Malaysian aquatic environment. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 9(2), 137-145.
- Suharto, Bambang, et al., 2019. The study of water quality status in the ngebrong river with physical and chemical parameters in the Tawang Sari Barat region, Pujon district, Malang regency. *Indonesian Journal of Urban and Environmental Technology*, 2(2), 164-180.
- Teh, Swee J., Adams, S. M., & Hinton, David E., 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic toxicology*, 37(1), 51-70.
- Thompson, Fabiano, et al., 2020. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. *Science of the Total Environment*, 705, 135914.
- USEPA, 2023. National Primary Drinking Water Regulations.
- Vieira, F., et al., 2015. Peixes do Quadrilátero Ferrífero: guia de identificação. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- Worm, Boris, et al., 2006. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *science*, 314(5800), 787-790.
- Yamashita, M., Yabu, T., & Ojima, N., 2010 . Stress protein HSP70 in fish. *Aqua-BioScience Monographs*, 3(4), 111-141.
- Yu, M.-H., Tsunoda, H., & Tsunoda, M., 2011. Environmental Fluoride. In M.-H. Yu, H. Tsunoda, & M. Tsunoda, *Environmental Toxicology* (3rd ed., pp. 159-180). Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC.