

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS METAIS CHUMBO E FERRO, EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*), COM ÊNFASE EM ACHADOS CLÍNICO-
PATOLÓGICOS**

SÓSTENES APOLO CORREIA MARCELINO

Belo Horizonte

EV-UFMG

2021

Sóstenes Apolo Correia Marcelino

**Avaliação da toxicidade dos metais chumbo e ferro, em *zebrafish* (*Danio rerio*),
com ênfase em achados clínico-patológicos**

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Felipe Pierezan

Coorientadora: Profa. Dra. Gilcinéa Santana

Belo Horizonte

EV-UFMG

2021

M314a Marcelino, Sóstenes Apolo Correia, 1994-
Avaliação da toxicidade dos metais chumbo e ferro, em zebrafish (Danio rerio), com ênfase em achados clínico-patológicos/ Sóstenes Apolo Correia Marcelino. -2021.

105 f.:il.

Orientador: Felipe Pierezan

Coorientadora: Gilcinéa Santana

Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Animal.

Bibliografias: f. 99 – 105.

1. Peixe - Teses – 2. Metais pesados - Teses - 3. Toxicologia - Teses - 4. Patologia animal - Teses – I. Pierezan, Felipe – II. Santana, Gilcinéa - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 639

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

SÓSTENES APOLO CORREIA MARCELINO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Patologia Animal.

Aprovado(a) em 29 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Felipe Pierezan - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Benito Soto Blanco

Dr.(a). Guilherme de Campos Tavares

Dr.(a). Carlos Eduardo Real Pereira

Dr.(a). Luciano da Anuniação Pimentel



Documento assinado eletronicamente por Felipe Pierezan, Professor do Magistério Superior, em 29/03/2021, às 12:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Carlos Eduardo Real Pereira, Usuário Externo, em 29/03/2021, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Guilherme Campos Tavares, Servidor(a), em 29/03/2021, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Benito Soto Blanco, Membro, em 30/03/2021, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Luciano da Anuniação Pimentel, Usuário Externo, em 31/03/2021, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0601206 e o código CRC A275B2BF.

Dedicatória

Aos que não pude me despedir, Vô Tomás (in memoriam) e Tio Manel (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Ao Deus único de misericórdia, que aperfeiçoa seu poder nas minhas fraquezas.

Aos meus pais, Joel e Valdilena e a minha irmã Marla por todo apoio, orações, conselhos e sustento nessa trajetória. Não seria nada sem eles, sempre presentes, mesmo a distância.

À minha namorada, Maira Lacerda por todo companheirismo, persistência, fé e amor nesses anos juntos.

A minhas avós, Rosa e Nena, por toda inspiração, orações e carinho.

Ao Boris, Hanna, Eliel e Baruque, meus irmãos animais que me inspiraram a ser veterinário.

À minha família em Cruz das Almas, Vó Dita, Marcinha, Marco e Bidu por todo carinho e por me ensinarem a viver fora de casa.

À Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG) por toda infraestrutura, oportunidades e vivências fornecidas nesses 4 anos de escola.

Ao meu Professor e Orientador, Felipe Pierezan pela orientação e ensinamentos nesses 4 anos de UFMG. Um exemplo como profissional e como ser humano, tenho a felicidade de tê-lo como orientador e amigo.

À Professora Gilcinéa, minha coorientadora, por me ensinar sobre toxicidade em *zebrafish* e acolher o projeto no Laboratório de Terapêutica Veterinária.

À Professora Clésia Nascentes pelos ensinamentos de química analítica e pela análise toxicológica dos materiais.

À Professora Cynthia Pereira por todo auxílio nos cálculos de concentrações e na estruturação da metodologia do trabalho.

À Professora Daniela Chemin e Doutoranda Rogéria por cuidarem dos *zebrafish* e me ensinarem o manejo com a espécie.

Aos colegas Agna e Fabrício por me auxiliarem na execução do experimento. Vocês foram essenciais.

Aos Professores Roselene Ecco, Roberto Guedes, Renato Santos e Paula Giaretta pela amizade e ensinamentos em patologia veterinária.

Aos Professores Guilherme Tavares e Mateus Ramirez pelo entusiasmo e por apoiar a nossa equipe a trabalhar com ictiopatologia.

Aos técnicos Valéria, Leimar e Luís Assis por todo ensinamento e suporte.

Aos meus muitos amigos da pós-graduação e graduação que me acolheram tão bem em Minas Gerais. Faço menção honrosa ao Leozinho, Galego, Cadu, Zé dos zoi, Teteu, Mestre Harlan, Pai Douglas, Marcelo, Mari, Pâmela, Mirtha, Ricardo Laub, Tamara e Paula pela amizade e proximidade, mesmo em tempos de pandemia.

Aos Professores Pedro Pedroso, Juliana Targino, Luciano Pimentel, José Carlos e Joselito Nunes por me inspirarem na patologia e por constituírem a base dos meus aprendizados.

A todos animais que vivos ou após a morte contribuíram para meu aprendizado.

Epígrafe

*“O ouro afunda no mar,
madeira fica por cima.
Ostra nasce do lodo,
gerando pérolas finas”*

O ouro e a madeira- Ederaldo Gentil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. TOXICIDADE DO CHUMBO PARA PEIXES	20
2.2. TOXICIDADE DO FERRO PARA PEIXES.....	21
2.3. IMPORTÂNCIA E COMPLEXIDADE DA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA NA TOXICIDADE DOS METAIS CHUMBO E FERRO.....	24
2.4. ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS SOBRE TOXICIDADE DE METAIS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. LOCAIS DAS EXPERIMENTAÇÕES:	26
3.2. AUTORIZAÇÃO ÉTICA PARA EXPERIMENTO.....	26
3.3. ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
3.4. ACLIMATAÇÃO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS	26
3.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA ÁGUA.....	27
3.5.1. Durante período de aclimação	27
3.5.2. Durante o teste de toxicidade aguda	27
3.6. ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	28
3.6.1. Testes pilotos de toxicidade aguda	28
3.6.2. Ensaio semiestático de intoxicação aguda com diferentes diluições de chumbo .	28
3.6.3. Ensaio semiestático de intoxicação aguda com diferentes diluições de ferro	29
3.7. PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE COMPORTAMENTO E MORTALIDADE.....	31
3.8. PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	33

4. RESULTADOS	34
4.1. RESULTADOS DOS TESTES PILOTO.....	34
4.2. ENSAIO SEMIESTÁTICO DE TOXICIDADE AGUDA COM CHUMBO.....	35
4.2.1. Avaliação de sinais clínicos por grupo experimental	35
4.2.2. Comparativo dos sinais clínicos entre grupos	39
4.2.3. Alterações patológicas.....	47
4.2.4. Descrição das alterações anatomopatológicas por grupo	56
4.2.5. Parâmetros da água por grupo	59
4.2.6. Comparativo de parâmetros de água ente grupos:.....	61
4.3. ENSAIO SEMIESTÁTICO DE TOXICIDADE AGUDA COM FERRO	63
4.3.1. Avaliação de sinais clínicos por grupo experimental	63
4.3.2. Comparativo dos sinais clínicos entre grupos	67
4.3.3. Alterações patológicas.....	73
4.3.4. Descrição das alterações anatomopatológicas por grupo	81
4.3.5. Parâmetros da água por grupo	84
4.3.6. Comparativo de parâmetros de água entre grupos:	86
5. DISCUSSÃO	88
5.1. ENSAIO SEMIESTÁTICO DE TOXICIDADE AGUDA COM CHUMBO.....	88
5.2. ENSAIO SEMIESTÁTICO DE TOXICIDADE AGUDA COM FERRO	91
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
7. REFERÊNCIAS	99

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g/L}$ - Microgramas por litro
ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas
AChE- Acetilcolinesterase
ANM- Agência Nacional de Mineração
ATP- Adenosina trifosfato
ATPase- Adenosinatrifosfatases
Ca- Cálcio
CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais
CF1- Grupo Fe 2,66 mg/L
CF2- Grupo Fe 5,86 mg/L
CF3- Grupo Fe 12,88 mg/L
CF4- Grupo Fe 28,34 mg/L
CFC- Grupo controle Fe
CL- Concentração letal
cm- Centímetro
COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EV/UFMG- Escola de Veterinária da UFMG
Fe- Ferro
 Fe^{2+} - Ferro ferroso
 Fe^{3+} - Ferro férrico
g/L- Gramas por litro
GC1- Grupo Pb 0,46 mg/L
GC2- Grupo Pb 1,02 mg/L
GC3- Grupo Pb 2,24 mg/L
GC4- Grupo Pb 4,92 mg/L
GCC- Grupo controle Pb
h- Horas
H.E- Hematoxilina e eosina
ICP-MS- Espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado
K- Potássio
L- Litro
LAQUA- Laboratório de Aquacultura
mg/L- miligramas por litro
ml- mililitro
Na- Sódio
NBR- Normas brasileiras
OCDE- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OD- Oxigênio dissolvido

Pb- Chumbo

pH- potencial hidrogeniônico

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos, definições e critérios de sinais clínicos, adaptado do Test Guideline” N° 203 (OCDE, 2019).....	31
Tabela 2. Concentrações letais do ensaio de toxicidade aguda com chumbo	41
Tabela 3. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no Grupo Pb 0,46mg/L	56
Tabela 4. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no Grupo Pb 1,02mg/L	57
Tabela 5. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no Grupo Pb 2,24mg/L	57
Tabela 6. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no Grupo Pb 4,92mg/L	58
Tabela 7. Tabela com os parâmetros de água do ensaio de toxicidade aguda de chumbo	60
Tabela 8. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no grupo Fe 2,66mg/L	81
Tabela 9. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no grupo Fe 5,86mg/L	82
Tabela 10. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no grupo Fe 12,88mg/L	82
Tabela 11. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no grupo Fe 28,34mg/L	83
Tabela 12. Tabela com os parâmetros de água do ensaio de toxicidade aguda de ferro	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Local e aquários do ensaio de toxicidade aguda de chumbo. Aquários com as soluções teste em aeração antes da experimentação..... 30
- Figura 2. Local e aquários do ensaio de toxicidade aguda de ferro. Soluções de ferro após aeradas e dispostas no local de experimentação, antes do ensaio experimental..... 30
- Figura 3. Peixe do grupo Pb 1,02 mg/L. Demonstração da abertura lateral da cavidade celomática e retirada dos opérculos, após morte. 34
- Figura 4. Sinais clínicos do ensaio de toxicidade aguda com chumbo. Conjunto de gráficos que mostram a distribuição de sinais clínicos ao longo do ensaio de toxicidade aguda de chumbo. Eixo X – quantidade de peixes; Eixo Y – Intervalos de tempo de observação. 38
- Figura 5. Comparativo de sinais clínicos entre grupos do ensaio de toxicidade aguda de chumbo 42
- Figura 6. Comparativo dos sinais clínicos e mortalidade entre grupos do ensaio de toxicidade aguda chumbo..... 43
- Figura 7- Mortalidade do ensaio de toxicidade aguda com Pb..... 44
- Figura 8. Representação de sinais clínicos de comportamento anormais de natação. A) Peixes do grupo Pb 0,46 mg/L com distribuição anormal no fundo e comportamento de rebaixamento. B) Peixe do grupo Pb 1,02 mg/L com distribuição anormal no fundo, e comportamento de rebaixamento. C) Peixes do grupo Pb 4,92 mg/L com distribuição anormal na superfície. D) Peixes do grupo Pb 4,92 mg/L com distribuição anormal na superfície. 45
- Figura 9. Demonstração do sinal clínico de hemorragia e de mortalidades. A e B) Peixe do grupo Pb 1,02 mg/L com hemorragia e liberação de sangue na água, evidenciado pela cor vermelha (seta). C) Aquário do grupo Pb 2,24 mg/L com peixe morto na superfície do aquário. D) Aquário do grupo Pb 4,92 mg/L com peixe morto na superfície do aquário. 46
- Figura 10. Histopatologia do peixe 9.1. Grupo Pb 4,92 mg/L. Brânquias. Necrose difusa e acentuada das lamelas, com desprendimento multifocal do epitélio lamelar e acúmulo multifocal de restos celulares entre os espaços interlamelares (setas) (H.E, 200x) 48
- Figura 11. Histopatologia do peixe 9.1. Grupo Pb 4,92 mg/L. Brânquias. Necrose difusa e acentuada com perda acentuada de lamelas e acúmulo multifocal acentuado de restos celulares nos espaços interlamelares (setas) (H.E, 400x). 48
- Figura 12. Histopatologia do peixe 9.3. Grupo Pb 4,92 mg/L. Brânquias. Necrose multifocal a coalescente das lamelas secundárias com desprendimento do epitélio (cabeça de seta) e acúmulo multifocal de restos celulares nos espaços interlamelares (setas). (H.E, 400x)..... 49

Figura 13. Histopatologia do peixe 7.5. Grupo 2,24 mg/L. Brânquias. Espessamento difuso moderado de lamelas secundárias por hiperplasia epitelial (setas), com áreas multifocais de achatamento e fusão de lamelas secundárias (cabeça de seta) e áreas de acúmulo de material granular fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares) em espaços bem delimitados entre as células epiteliais de revestimento lamelar (asterisco) (H.E, 200x).....	51
Figura 14. Histopatologia do peixe 7.5. Grupo Pb 2,24 mg/L. Brânquias. Hiperplasia epitelial com fusão de lamelas moderada (cabeça de seta) e acúmulo de material granular fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares) entre as células epiteliais das lamelas secundárias (asterisco) (H.E, 400x).....	51
Figura 15. Histopatologia do peixe 10.5. Grupo 4,92 mg/L. Brânquias. Espessamento difuso e acentuado das lamelas com fusão difusa acentuada de lamelas secundárias, hiperplasia epitelial difusa acentuada e áreas multifocais acentuadas de acúmulo de restos celulares (asterisco) (H.E, 400x).....	52
Figura 16. Histopatologia do peixe 9.3. Grupo Pb 4,92 mg/L. Brânquias. Espessamento e fusão difusa acentuada de lamelas primárias e secundárias e áreas multifocais de hemorragia acentuada (seta) (H.E, 200x).	52
Figura 17. Histopatologia do peixe 7.5. Grupo Pb 2,24 mg/L. Pele. Áreas multifocais de acúmulo de material granular fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares) entre as células epiteliais da epiderme (setas) (H.E, 200x).	53
Figura 18. Histopatologia do peixe 7.5. Grupo Pb 2,24 mg/L. Pele. Áreas multifocais de acúmulo de material granular fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares) entre células epiteliais da epiderme (setas) (H.E, 400x).....	53
Figura 19. Peixe 2.1. Grupo Controle. Cavidade opercular com brânquias sem alterações histológicas. (H.E, 50x).	54
Figura 20. Peixe 2.1. Grupo Controle. Brânquias. Lamelas primárias e secundárias sem alterações histológicas (H.E, 200x).	54
Figura 21. Peixe 2.1. Grupo Controle. Pele. Sem alteração histológicas (H.E, 200x).	55
Figura 22. Comparativo dos parâmetros de água entre grupos do ensaio de toxicidade aguda chumbo	62
Figura 23. Conjunto de gráficos com a distribuição de sinais clínicos ao longo do ensaio de toxicidade aguda de ferro	66
Figura 24. Comparativo dos sinais clínicos entre grupos do ensaio de toxicidade aguda de ferro	69

Figura 25. Comparativo entre sinais clínicos e mortalidade do ensaio de toxicidade aguda de ferro	70
Figura 26. Mortalidade do ensaio de toxicidade com ferro	71
Figura 27. Demonstração de sinais clínicos e mortalidade no ensaio de toxicidade aguda com ferro. A) Peixes do grupo Fe 2,66 mg/L com distribuição anormal na superfície. Há um peixe morto boiando no centro do aquário. B) Aumento da figura A demonstrando o peixe morto espontaneamente com precipitados de ferro aderidos ao corpo (seta). C) Peixes do grupo Fe 12,88 mg/L com distribuição anormal na superfície. D) Peixe do grupo Fe 5,86 mg/L com distribuição anormal no fundo.....	72
Figura 28. Macroscopia do peixe do grupo Fe 28,34 mg/L. Precipitados de ferro na superfície do corpo que conferem ao muco cor alaranjada.	74
Figura 29. Macroscopia do peixe do grupo Fe 2,66 mg/L. Precipitados de ferro grumosos de cor alaranjada na superfície da pele, ao redor do opérculo e no muco das brânquias (setas). .	74
Figura 30. Histologia do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Brânquias. Desorganização lamelar com desprendimento das lamelas e acúmulo acentuado de restos celulares e precipitados nos espaços interlamelares (setas) (H.E, 200x).....	75
Figura 31. Histoquímica especial do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Brânquias. Coloração especial da figura 28, com evidenciação de quantidade acentuada de precipitados de ferro corados de azul (setas), em meio aos restos celulares (Azul da Prússia, 200x)	75
Figura 32. Histopatologia do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Cavidade oral e brânquias- Cavidade oral com acentuada quantidade de restos celulares e precipitados de ferro (H.E, 50x)	76
Figura 33. Histoquímica especial do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Cavidade oral e brânquias. Cavidade oral e espaços interlamelares com quantidade acentuada de precipitados de ferro corados em azul (setas) (Azul da prússia, 100x).....	76
Figura 34. Histopatologia do peixe 3.1. Grupo Fe 2,66 mg/L. Brânquias. Desorganização lamelar moderada e área focal discreta de acúmulo de restos celulares no espaço interlamelar (H.E, 200x).	77
Figura 35. Histopatologia do peixe 3.1. Grupo Fe 2,66 mg/L. Brânquias. Desorganização lamelar moderada e área focal discreta de acúmulo de restos celulares no espaço interlamelar (H.E, 400x).	77
Figura 36. Histoquímica especial do peixe 10.1. Grupo Fe 28,34 mg/L. Brânquias. Coloração especial evidenciando precipitados de ferro intimamente depositados na superfície das lamelas secundárias (cor azul) (Azul da Prússia, 200x).	78

Figura 37. Histoquímica especial do peixe 10.1. Grupo Fe 28,34 mg/L. Brânquias. Coloração especial evidenciando precipitados ferro de intimamente depositados na superfície das lamelas secundárias (cor azul) (Azul da Prússia, 400x).....	78
Figura 38. Histoquímica especial do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Intestino. Precipitados de ferro corados no lúmen intestinal corados em azul (Azul da Prússia, 100x).....	79
Figura 39. Histoquímica especial do peixe 8.6. Grupo Fe 12,88 mg/L. Estômago. Precipitados de ferro corados em azul no lúmen do estômago (Azul da Prússia, 100x).....	79
Figura 40. Histologia do peixe 2.1. Grupo Controle. Brânquias e cavidade oral. Sem alterações histológicas (H.E, 100x).	80
Figura 41. Histologia do peixe 2.1. Grupo Controle. Brânquias. Sem alterações histológicas (H.E, 400x).	80
Figura 42. Comparativo entre os parâmetros de água do ensaio de toxicidade aguda de ferro.	87

RESUMO

As atividades antropogênicas, como a mineração, estão associadas ao aumento dos níveis de metais nos corpos d'água. Estudos científicos apontam que os níveis dos metais ferro (Fe) e chumbo (Pb), na água dos rios, são alterados após a ruptura de barragens de rejeitos de mineração. Há necessidade de estudos sobre os efeitos desses metais em peixes a curto e a longo prazo. No presente estudo, a toxicidade aguda dos metais Pb e Fe foi avaliada em *zebrafish* (*Danio rerio*), com ênfase nos achados clínico-patológicos. Foram utilizadas concentrações de 0 (GCC); 0,46 (GC1); 1,02 (GC2); 2,24 (GC3) e 4,92 (GC4) mg/L de Pb e 0 (GFC); 2,66 (GF1); 5,86 (GF2); 12,88 (GF3) e 28,34 (GF4) mg/L de Fe, diluídos na água. Os experimentos foram delineados como ensaios de toxicidade aguda semiestáticos. Foram realizadas avaliações de sinais clínicos, mortalidade, lesões anatomopatológicas e exames complementares toxicológicos na água e nos tecidos dos peixes. Os sinais clínicos presentes, em ambos os ensaios, foram hipoatividade, distribuição anormal na superfície, sub-reatividade, distribuição anormal no fundo, comportamento de rebaixamento e alterações de funções ventilatórias. No experimento de chumbo, as mortalidades em 96h, foram de 33,3% no grupo 0,46 mg/L, 41,7% no grupo 1,02 mg/L, 75% no grupo 2,24 mg/L e 91,7% no grupo 4,92 mg/L. Não houve mortes no grupo controle. A CL_{50} 96h nesse experimento foi de 1,1 mg/L de Pb. Não foram observadas lesões macroscópicas, mas lesões histológicas estavam presentes nas brânquias de todos os peixes expostos ao chumbo e dois padrões predominantes de lesões foram descritos. O primeiro padrão (padrão 1) consistiu em necrose acentuada das lamelas secundárias, com perda da organização lamelar, perda de lamelas secundárias e acúmulo acentuado de restos celulares nos espaços interlamelares. Os peixes com essas lesões morreram espontaneamente durante o experimento. O outro padrão (padrão 2) consistiu em fragmentação de células das lamelas secundárias, com desorganização lamelar, hiperplasia epitelial, fusão de lamelas secundárias e acúmulo de restos celulares entre as células epiteliais de revestimento. Os peixes com essas lesões sobreviveram as 96h de experimentação, com exceção de alguns peixes do grupo 4,92 mg/L que morreram espontaneamente e apresentavam os dois padrões de lesão. No experimento com Fe, a mortalidade atingiu 100% em todos os grupos experimentais, exceto no grupo controle. Macroscopicamente, havia material granular alaranjado na superfície do corpo e das brânquias dos peixes. Histologicamente, observou-se, desorganização das lamelas branquiais secundárias, associada à desprendimento, perda do epitélio de revestimento e acúmulo de restos celulares com precipitados de ferro nos espaços interlamelares. Esses precipitados foram observados também na cavidade oral, estômago e intestinos. Na reação de Azul da Prússia (Perls) houve confirmação do precipitado de ferro na superfície das brânquias, cavidade oral, estômago e intestinos. Esses achados ocorreram em todos os grupos experimentais, exceto o controle. O presente estudo contribuiu para a caracterização anatomopatológica da toxicidade do chumbo e ferro em peixes.

PALAVRAS-CHAVES: Ictiopatologia, metais pesados, toxicologia aquática, intoxicação por metais.

ABSTRACT

Anthropogenic activities, such as mining, are associated with increased levels of metals in rivers. Studies have shown that the levels of the metals iron (Fe) and lead (Pb) in the water are elevated after the rupture of mining tailings dams. There is a need for studies on short and long term effects of these metals on fish. In the present study, the acute toxicity of the metals Pb and Fe was assessed in zebrafish (*Danio rerio*), with an emphasis on clinical and pathological findings. Concentrations of 0 (GCC); 0.46 (GC1); 1.02 (GC2); 2.24 (GC3) and 4.92 (GC4) mg / L of Pb and 0 (GFC); 2.66 (GF1); 5.86 (GF2); 12.88 (GF3) and 28.34 (GF4) mg/L of Fe, diluted in water were used. The experiments were designed as semi-static acute toxicity tests. Evaluations of clinical signs, mortality, anatomopathological lesions and complementary toxicological tests in the water and tissues of the fish were carried out. The clinical signs present in both trials were hypoactivity, abnormal distribution on the surface, sub-reactivity, abnormal distribution on the bottom, demotion behavior and changes in ventilatory functions. In the lead experiment, the 96h mortality was 33.3% in the 0,46 mg/L group, 41.7% in the 1,02 mg/L group, 75% in the 2,24 mg/L group and 91.7% in the 4,92 mg/L group. There were no deaths in the control group. The 96h LC50 in this experiment was 1.1 mg/L of Pb. No macroscopic lesions were observed, but histological lesions were present in the gills of all fish exposed to lead and two predominant patterns of lesions were described. The first pattern (pattern 1) consisted of marked necrosis of the secondary lamellae, with loss of lamellar organization, loss of secondary lamellae and marked accumulation of cellular debris in the interlamellar spaces. Fish with these lesions died spontaneously during the experiment. The other pattern (pattern 2) consisted of fragmentation of cells in the secondary lamella, with lamellar disorganization, epithelial hyperplasia, secondary lamella fusion and accumulation of cell debris between the lining epithelial cells. The fish with these lesions survived the 96h of experimentation, except for some fish from the 4,92 mg/L group that died spontaneously and had both lesion patterns. In the Fe experiment, mortality reached 100% in all experimental groups, except in the control group. Macroscopically, there was orange granular material on the surface of the fish's body and gills. Histologically, there was disorganization of the secondary branchial lamellae, associated with shedding, loss of the lining epithelium and accumulation of cell debris with iron precipitates in the interlamellar spaces. These precipitates were also observed in the oral cavity, stomach, and intestines. In the Prussian Blue reaction (Perls) there was confirmation of the precipitate of iron on the surface of the gills, oral cavity, stomach, and intestines. These findings occurred in all experimental groups, except the control. The present study contributed to the anatomopathological characterization of lead and iron toxicity in fish.

KEYWORDS: Ichthyopathology, heavy metals, aquatic toxicology, metal poisoning

1. INTRODUÇÃO

A mineração é uma das principais atividades antropogênicas associadas ao aumento dos níveis de metais nos corpos d'água (Dai et al., 2009; Kim e Kang, 2015; Lee et al., 2019). Minas Gerais é um estado brasileiro com intensa atividade mineradora, sendo o maior produtor e o maior detentor das reservas de minério ferro no país (ANM, 2018). Todavia, juntamente com a mineração, o armazenamento de rejeitos dessa atividade se torna um risco, principalmente pela possibilidade de rompimento de barragens, que causam perdas humanas, materiais, econômicas e ambientais, como observados nos desastres de Mariana, em 2015, e Brumadinho, em 2019 (Freitas et al., 2019).

Os desastres decorrentes dos rompimentos de barragens modificaram o modo como vemos a mineração e a sua relação com o meio ambiente. A lama de rejeitos promove prejuízos notórios, pois carrega consigo metais que se distribuem e comprometem o solo, as águas, a fauna e a flora. Estudos científicos apontam que os níveis dos metais ferro (Fe) e chumbo (Pb), na água dos rios afetados, foram muito alterados após a ruptura das barragens em Mariana (Cordeiro et al., 2019) e em Brumadinho (Thompson et al., 2020; Vergilio et al., 2020). Dessa forma, a avaliação dos efeitos desses metais em modelos animais, em condições experimentais, é fundamental para o entendimento dos impactos a curto e longo prazo desses desastres sobre a ictiofauna de uma região.

O Pb é um metal não essencial, distribuído naturalmente pela crosta terrestre e encontrado em pequenas quantidades na água e nas plantas (Dai et al., 2009; Cheng e Hu, 2010; Lee et al., 2019). Esse metal, geralmente se apresenta na natureza em baixas concentrações. Porém, quando em concentrações aumentadas, resultado de atividades antropogênicas, pode causar intoxicações e mortalidade em peixes e outros organismos aquáticos (Dai et al., 2009; Łuszczek-Trojnar et al., 2013; Kim e Kang, 2015; Lee et al., 2019). O Fe é um microelemento essencial para o funcionamento dos tecidos de muitos organismos, incluindo os peixes. O Fe faz parte da formação dos grupos heme, presentes na hemoglobina e mioglobina, e atua a nível mitocondrial no transporte de elétrons da respiração celular (Aisen et al., 2001; Papanikolaou e Pantopoulo, 2005; Singh et al., 2019). Todavia, esse metal, em concentrações elevadas, pode promover intoxicações e comprometer a saúde dos peixes (Papanikolaou e Pantopoulo, 2005; Li et al., 2009; Dolci et al., 2013; Do et al., 2019; Singh et al., 2019).

A histopatologia é reconhecida como importante ferramenta na avaliação de toxicidade em peixes. Esse recurso é utilizado, muitas vezes, para a avaliação do nível de poluição e contaminação de efluentes e, por vezes, é relacionado ao estudo dos níveis de metais. Porém, há necessidade de estudos histopatológicos mais aprofundados, direcionados à avaliação da toxicidade de metais em peixes, principalmente devido à variabilidade e dubiedade dos resultados descritos na literatura (Fonseca et al., 2016; Fonseca et al., 2017; Jabeen et al., 2018; Macirella et al., 2019; Santos et al., 2019; Sayadi et al., 2020).

O presente estudo avaliou a toxicidade dos metais chumbo e ferro, em *zebrafish* (*Danio rerio*), com ênfase aos achados clínico-patológicos. Essa espécie foi escolhida para estudos de toxicidade de metais pois é um modelo animal e biomarcador mundialmente conhecido, que permite excelente avaliação histopatológica e toxicológica. Além da análise histopatológica, foram avaliadas, nas diferentes concentrações de metais, as conseqüentes alterações comportamentais, sinais clínicos e índices de mortalidade. A definição dos achados nesses animais objetiva a criação de parâmetros para a interpretação de lesões e sinais clínicos e condução de diagnósticos em casos naturais de intoxicação de peixes expostos a esses metais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TOXICIDADE DO CHUMBO PARA PEIXES

O Pb é um metal não essencial, distribuído naturalmente pela crosta terrestre e encontrado em pequenas quantidades na água e nas plantas (Dai et al., 2009; Cheng e Hu, 2010; Lee et al., 2019). As concentrações desse metal na natureza são diretamente impactadas por atividades antropogênicas, em especial, relacionadas a fabricação de baterias, tintas, cimento, atividades agrícolas, mineração e seus respectivos resíduos (Dai et al., 2009; Kim e Kang, 2015).

Estudos indicam que, as concentrações ideais de Pb encontradas na água são baixas: 0,02 µg/L na água do mar e 2µg/L em afluentes de água doce (Labrot et al., 1999; Hwang et al., 2016). O Pb pode ser tóxico aos peixes e é considerado um dos mais alarmantes sinais de contaminação de afluentes. O consumo dos produtos advindos desses animais pode representar, também, risco à saúde humana (Łuszczek-Trojnar et al., 2013; Kim e Kang, 2015; Liu et al., 2019; Lee et al., 20019).

Os mecanismos de toxicidade do Pb aos peixes são diversos e complexos. Entre os possíveis mecanismos citados estão: a afinidade do chumbo pelos sistemas Ca^{2+} ATPase trocador Na^+/Ca^{2+} e Na^+/K^+ ATPase e conseqüente interrupção do gradiente eletroquímico e regulação de íons celulares (Rogers et al., 2005); a capacidade do chumbo em formar ligações estáveis com os átomos de oxigênio e enxofre nas proteínas, que constitui complexos estáveis e o potencial de causar lesões a membrana celular e estresse oxidativo (Verstraeten et al., 2008; Lee et al., 2019).

O Pb pode ser absorvido nos peixes pelas brânquias ou pela via gastrointestinal. O metal é absorvido e carregado pela corrente sanguínea, metabolizado pelo fígado, depositado em diferentes órgãos e excretado pelos rins e brânquias. As particularidades dessas vias podem incidir em diferentes órgãos-alvo e aspectos de bioacumulação (Kim e Kang, 2014; Lee et al., 2019). As brânquias têm papel primordial nos casos em que há altos teores de Pb dissolvidos na água. Essa via é especialmente importante nos peixes de água doce, pois a constante troca iônica, para manter a homeostase entre o corpo (hipertônico) e a água doce (hipotônica), tornam as brânquias o principal órgão bioacumulador (Kim e Kang, 2014; Lee et al., 2019).

Por outro lado, a via gastrointestinal está relacionada a sedimentos ou dietas com altos níveis de Pb ingeridos. Essa via é singularmente importante em peixes marinhos, pois esses animais necessitam ingerir maiores quantidades de água para manterem a homeostase do corpo (hipotônico) com a água salgada (hipertônica), tornando os intestinos os principais órgãos acumuladores (Kim e Kang, 2014; Lee et al., 2019).

A relação entre a via de entrada e a bioacumulação é corroborada por estudos experimentais. Estudos que utilizaram dietas com concentrações altas de Pb, tiveram a seguinte relação de bioacumulação por órgão (onde “>” significa maior): intestino > estômago > fígado > rins > baço > brânquias > músculo esquelético > cérebro (Dai et al., 2009; Kim e Kang et al., 2015; Hwang et al., 2016). Estudos que utilizaram a dieta com maior cronicidade (um a dois anos), em carpa prussiana (*Carassius gibelii*), descrevem o rim como o principal órgão bioacumulador (Łuszczek-Trojnar et al., 2013). Estudos que avaliaram a toxicidade por meio de diluições na água, em bagre africano (*Clarias gariepinus*), tiveram o seguinte perfil de bioacumulação: brânquias > fígado > rins > músculo (Al-Balawi et al., 2013).

Existem estudos de toxicidade por Pb em diferentes espécies de peixes, nas formas aguda (Rogers et al., 2003; Rabitto et al., 2005; Paul et al., 2014; Roy et al., 2015; Liu et al., 2019; Macirella et al., 2019) e crônica (Dai et al., 2009; Al-Balawi et al., 2013; Łuszczek-Trojnar et al., 2013; Kim e Kang et al., 2015; Hwang et al., 2016). Poucos estudos descrevem a análise anatomopatológica (Rabitto et al., 2005; Dai et al., 2009; Al-Balawi et al., 2013; Macirella et al., 2019).

Nos estudos consultados, as lesões descritas nas brânquias incluem congestão de lamelas secundárias, hipertrofia de células epiteliais, descolamento epitelial, degeneração de lamelas secundárias, aneurismas, hipertrofia e hiperplasia de *cloride cells* (células de cloro) (Al-Balawi et al., 2013; Macirella et al., 2019). No fígado foram descritas degeneração vacuolar e necrose individual de hepatócitos (Rabitto et al., 2005; Dai et al., 2009; Al-Balawi et al., 2013). Nos rins, foram descritas áreas multifocais de necrose tubular e infiltrado de neutrófilos e macrófagos no rim cranial além de expansão glomerular (Rabitto et al., 2005; Al-Balawi et al., 2013).

2.2. TOXICIDADE DO FERRO PARA PEIXES

O Fe é um microelemento essencial para o funcionamento dos tecidos de muitos organismos, incluindo os peixes. O Fe faz parte da formação dos grupos heme, presentes na hemoglobina e mioglobina, relacionados ao transporte de oxigênio, e atua a nível mitocondrial no transporte de elétrons da respiração celular (Aisen et al., 2001; Papanikolaou e Pantopoulo, 2005; Singh et al., 2019).

Quando fornecido em excesso, o Fe promove toxicidade celular. Ele é catalisado por meio da reação de Fenton (Fenton, 1894), que resulta na formação de radicais livres, os quais promovem lesões oxidativas, como a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e

consequentes danos teciduais e funcionais (Papanikolaou e Pantopoulo, 2005; Li et al., 2009; Singh et al., 2019).

Nos sistemas orgânicos, o Fe pode estar na forma férrica insolúvel (Fe^{3+}) e ferrosa solúvel (Fe^{2+}), sendo a última biodisponível. O Fe^{2+} se liga a proteínas transportadoras de oxigênio como hemoglobina, mioglobina e a enzimas como a citocromo oxidase. O Fe^{2+} , não incorporado, se liga a proteínas de transporte e armazenamento de ferro como transferrina, ferritina e hemossiderina (Bury e Grosell, 2003; Valko et al., 2005; Singh et al., 2019).

O Fe^{2+} é considerado tóxico para animais aquáticos, pois se liga a superfície das brânquias, sofre oxidação em Fe^{3+} que conduz a dano celular com consequente disfunção respiratória (Teien et al., 2008; Slaninova et al., 2014; Singh et al., 2019).

A literatura destaca que a absorção e distribuição desse metal em peixes ocorre predominantemente pela alimentação. Entretanto, os peixes têm a capacidade de absorção dos metais na água pela pele e brânquias, em adição à ingestão. A absorção parenteral é influenciada diretamente pelas características geoquímicas do meio. Após a absorção, o Fe é transportado via corrente sanguínea e depositado nos tecidos (Bury e Grosell, 2003).

Em relação ao principal órgão alvo de bioacumulação, os estudos trazem diferenças em relação as espécies analisadas, mas, no geral, o fígado é citado como principal órgão de armazenamento de Fe (Avenant Oldewage e Marx, 2000; Rodrigues e Pereira, 2004; Ploetz et al. 2007; Ahmed et al., 2016; Harangi et al., 2016; Singh et al., 2019). Além do fígado, outros órgãos citados são as brânquias, a pele, os intestinos, os rins e, em menor proporção, a musculatura esquelética (Bury e Grosell, 2003; Oberholster et al., 2012; Ahmed et al., 2016; Harangi et al., 2016; Sayadi et al., 2020).

Para a determinação da quantidade de ferro acumulada em tecidos, há descrição de diferentes métodos de detecção dos metais como: espectrometria no ultravioleta-visível (Polat et al., 2015); espectrometria de absorção atômica (Teien et al., 2008; Avenant-Oldewage e Marx, 2000; Slaninova et al., 2014; Zahedi et al., 2014; Cadmus et al., 2018; Sayadi et al., 2020); espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (Carriquiriborde et al., 2004); e espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (Nasrallah et al., 2018; Li et al., 2009).

Estudos de toxicidade aguda de Fe, em diferentes espécies, também testaram diferentes concentrações, observando-se que níveis de Fe acima de 0,5 mg/L já estão associados a mortalidades de peixes (Noga. 2014). Houve avaliação a toxicidade do Fe e sua interferência na atividade da acetilcolinesterase (AChE) em *zebrafish* (Sant'Anna et al., 2011). No ensaio *in vivo*, foram utilizadas soluções de sulfato ferroso nas concentrações de 1, 15 e 150 mg/L, por 24 horas (h). Nesse estudo, os pesquisadores relatam que houve aumento da atividade de AChE no cérebro e fígado, entretanto, essa alteração não estaria proporcionalmente relacionada a concentração do metal, uma vez que as alterações foram mais expressivas na concentração de 15 mg/L, quando comparada com a concentração de 150 mg/L (Sant'Anna et

al., 2011). Outros autores conduziram um ensaio semiestático, para avaliação da toxicidade do metal em Piau (*Leporinus friderici*), com duração de 96h e utilização de soluções tamponadas de sulfato ferroso e sulfato férrico, obtendo-se, portanto, os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} nas concentrações 1,0; 3,0; 7,5; 15,0 e 30,0 mg/L. Observou-se, que ambos os íons, na concentração de 30 mg/L, promoveram letalidade de 100%. O Fe^{3+} também promoveu letalidade total nas concentrações de 15 mg/L e 7,5 mg/L. Adicionalmente, houve elevação nos níveis de hemoglobina e metemoglobina em ambos os grupos (Gemaque et al., 2019).

Outras pesquisas avaliaram a toxicidade aguda de Fe em Carpa-Rohu (*Labeo rohita*) por ensaio semiestático, com soluções de sulfato ferroso heptahidratado a partir de diluições da CL_{50} (concentração letal média) encontrada em 96h (130,04 mg/L). As doses foram de 8,25; 16,51 e 33,01 mg/L. Foram avaliados parâmetros hematológicos, de estresse oxidativo e histopatológicos após 24, 48, 72 e 96 horas. Os autores descreveram aumento dos valores de eritrócitos, leucócitos totais e hemoglobina, bioacumulação hepática, aumento da peroxidação lipídica, redução de enzimas antioxidantes e lesões histopatológicas em brânquias e fígado. Os autores ressaltam que a intensidade dessas alterações é proporcionalmente dependente da dose e tempo de exposição (Singh et al. 2019).

Há estudos que descrevem lesões histológicas, em diferentes órgãos, associadas à intoxicação por Fe em peixes. São descritas diversas lesões nas brânquias, de caráter degenerativo, necrótico e inflamatório como redução do espaço interlamelar, fusão de lamelas secundárias, hiperplasia distal de lamela primária, hemorragias, infiltrado de célula granulares eosinofílicas, espessamento de lamelas secundárias, desorganização de lamelas, telangiectasias, encurvamento de lamelas secundárias, sinequias e necrose de lamelas (Carriquiriborde et al., 2004; Slaninova et al., 2014; Singh et al., 2019; Sayadi et al., 2020). Outras alterações, que são relatadas com menor frequência, são o descolamento do epitélio das lamelas secundárias (Singh et al., 2019); associação com infecção bacteriana secundária (Slaninova et al., 2014); deposição e acúmulo de material preto sobre a superfície das brânquias (Li et al., 2009); diminuição do número de células pilares (Li et al., 2009) e formação de granulomas nas lamelas secundárias (Li et al., 2009). Alguns autores utilizaram a reação de Perls (Azul da Prússia) para demonstrar a deposição e acúmulo de Fe nas lamelas (Slaninova et al., 2014; Singh et al., 2019).

Há descrição de lesões histopatológicas no fígado. Um estudo relata degeneração vacuolar intracitoplasmática em hepatócitos, hemorragias multifocais, além da marcação de grânulos intracitoplasmáticos em hepatócitos pela reação de Perls (Singh et al., 2019). No intestino, foi descrito hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes, hiperemia, e acúmulo de material escuro na superfície das vilosidades (Slaninova et al., 2014; Li et al., 2009). Por fim, alguns estudos citam vacuolização do epitélio de revestimento dos túbulos contorcidos proximais dos rins (Slaninova et al., 2014).

2.3. IMPORTÂNCIA E COMPLEXIDADE DA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA NA TOXICIDADE DOS METAIS CHUMBO E FERRO

A histopatologia, em ensaios com esses metais, analisaram as brânquias e relataram os seguintes achados: hiperplasia epitelial e espessamento de lamelas secundárias, fusão de lamelas, hiperplasia da porção final da lamela primária, congestão, telangiectasias (aneurismas lamelares), descolamento de epitélio lamelar, necrose lamelar, infiltrado de célula granulares eosinofílicas e hemorragias. No entanto, Wolf et al. (2015) definem que muitos desses achados podem ser artefatos de fixação, processamento ou peculiaridades das espécies.

Como exemplo, os pesquisadores comentam que a hiperplasia, espessamento e fusão de lamelas secundárias podem ser artefatos decorrentes do plano de incidência de corte das lamelas; o descolamento epitelial das lamelas primárias pode ser resultado da má fixação do tecido (fixação com formol) ou do fato do peixe ter permanecido muito tempo em um pequeno volume de água antes da morte; a telangiectasia, em muitos casos, é fruto da termonarose no gelo ou de concussões na cabeça antes da morte. O infiltrado de célula granulares eosinofílicas nas brânquias e a degeneração vacuolar nos hepatócitos e nos túbulos contorcidos proximais renais, na maior parte das vezes, são decorrentes de idiosincrasias comum dos teleósteos relacionadas a espécie, ao tipo de manejo e a alimentação. Portanto, há necessidade de maiores estudos aplicando a histopatologia, em especial quando associada a eventos tóxicos.

2.4. ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS SOBRE TOXICIDADE DE METAIS

O *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) é um peixe teleósteo tropical de água doce, originário da Ásia, conhecido popularmente como *zebrafish*, paulistinha ou peixe-zebra. Ele vive cerca de 3 anos e atinge, no máximo, 5 cm de comprimento, são onívoros de comportamento pacífico e muito ativos (Dammski et al., 2011; Souza, 2015; Fukushima et al., 2020).

O *zebrafish* é considerado, por muitos autores, como um modelo experimental ideal para estudos de toxicologia, ecotoxicologia, biologia do comportamento, bioquímica, farmacologia, neurociências, terapêutica, vacinologia, infectologia, oncologia, além do estudo de diversas doenças humanas (Souza, 2015; Fukushima et al., 2020).

Numerosas características que favorecem o uso do *zebrafish* como modelo experimental, como: pouco espaço para a sua manutenção, baixo custo, fácil manipulação, desenvolvimento e ciclo biológico rápidos, fácil análise comportamental em um ambiente controlado, boa sensibilidade para drogas, pequeno tamanho, metabolismo rápido, transparência dos embriões e fertilização externa (Souza, 2015; Fukushima et al., 2020).

O *D. rerio* é utilizado em biotérios desde os anos 50. O grupo de cientistas liderado pelo pesquisador Dr. George Streisinger foi o pioneiro a publicar trabalhos científicos com o peixe,

como resultado de pesquisas com aplicação de técnicas de análise mutacional para avaliação do desenvolvimento embrionário do peixe, na década de 80. No Brasil, a produção científica utilizando o peixe como modelo experimental ocorre a partir de 1996 com progressiva expansão do número de pesquisas, em especial a partir do ano de 2009 (Dammski et al., 2011; Gheno et al., 2015).

A histologia é considerada um excelente método de avaliação para se diagnosticar efeitos diretos e indiretos que afetem tecidos e é empregada nas pesquisas de toxicidade utilizando o *zebrafish* (Meletti, 2003; Menke et al., 2011; Souza, 2015). A literatura aponta, que os principais órgãos alvo para avaliação histopatológica em estudos de toxicidade em peixes são as brânquias, fígado e rins, por estarem em contato direto com os toxicantes e estarem responsáveis pela metabolização e excreção das substâncias (Menke et al., 2011; Souza et al., 2015; Wolf et al., 2015).

O *zebrafish* já foi utilizado em teste com os seguintes metais: cádmium (Al-sawafi et al., 2017; Shankar et al., 2021); chumbo (Dave e Xiu, 1991; Hu et al., 2019; Liu et al., 2019; Shankar et al., 2021); cobalto (Dave e Xiu, 1991); cobre (Dave e Xiu, 1991; Tai et al., 2018); cromo (Tye et al., 2018); ferro (Sant'Anna et al., 2011; Nasrallah et al., 2017; Marins et al., 2019; Shankar et al., 2021); manganês (Marins et al., 2019); mercúrio (Dave e Xiu, 1991); níquel (Dave e Xiu, 1991); prata (Tai et al., 2019); titânio (Hu et al., 2019) e urânio (Shankar et al., 2021).

Portanto, há um considerável número de estudos com *D. rerio* para uma diversidade de metais, muito embora, grande parte desses estudos foram executados com embriões e larvas de *zebrafish*. Dos estudos com o peixe adulto, apenas uma parte utilizou da histopatologia, os quais, em sua maioria, não demonstram critérios rigorosos para definição de lesões e artefatos, com conseqüente acurácia dos resultados histopatológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento desse estudo foi elaborado para a realização de dois experimentos:

1. Avaliação da toxicidade aguda de diferentes concentrações de chumbo para *zebrafish* (*Danio rerio*).
2. Avaliação da toxicidade aguda de diferentes concentrações de ferro para *zebrafish* (*Danio rerio*).

Para tanto, a metodologia foi elaborada de acordo com a “Norma Brasileira de Ecotoxicologia aquática - Toxicidade Aguda - Método de Ensaio com Peixes (*Cyprinidae*)” ABNT NBR 15088 (ABNT, 2016) e com o guia internacional “Test Guideline N° 203 Fish, Acute Toxicity Testing” (OECD, 2019).

3.1. LOCAIS DAS EXPERIMENTAÇÕES:

As experimentações foram conduzidas no Laboratório de Terapêutica Veterinária do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, durante os meses de novembro e dezembro de 2020.

3.2. AUTORIZAÇÃO ÉTICA PARA EXPERIMENTO

Todas as experimentações foram regidas pelas normas de boas práticas experimentais preconizadas pelos CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e com a lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal. O projeto do experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG (Protocolo 61/2020) e pelo Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMG (Reunião do dia 12/08/2020).

3.3. ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os exemplares de *zebrafish* (*Danio rerio*) foram gentilmente doados pelo Laboratório de Peixes Ornamentais do Laboratório de Aquacultura (LAQUA) do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG e foram mantidos no Biotério de Peixes do Laboratório de Terapêutica Veterinária do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da EV-UFMG. Foram utilizados 120 peixes adultos, machos e fêmeas, com um comprimento médio de 2,0 x 1,0 cm, conforme estabelecido na NBR15088 (ABNT, 2016) e pelo “Test Guideline” Nº 203 (OCDE, 2019).

Para aclimação, os peixes foram aleatoriamente distribuídos em aquários de vidro com capacidade de armazenamento de 25 litros (L), com relação de massa do organismo por volume de água de 1 grama (g)/L. Para as experimentações, os peixes (n=120) foram pesados para aferir o peso médio de cada grupo experimental e aleatoriamente subdivididos em aquários de vidro redondos, com capacidade de 2000 mililitros (ml), contendo as diluições de metais, previamente preparadas para cada grupo experimental.

3.4. ACLIMATAÇÃO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os peixes foram submetidos a um período de aclimação no Biotério de Peixes do Laboratório de Terapêutica Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, com duração de nove dias antes das experimentações (sete dias de aclimação + dois dias [48h] de acomodação nos aquários teste). Durante e após o período de aclimação, a saúde dos peixes foi observada e foi contabilizada a mortalidade. Na aclimatização, dez peixes foram coletados, submetidos à eutanásia e a análise patológica. Esses dados permitiram determinar o “status” de saúde, bem como, a possibilidade do lote ser submetido à experimentação de acordo com os seguintes critérios, estabelecidos pela normativas nacionais e internacionais: mortalidade > 10% da população em sete dias, rejeição do lote inteiro; mortalidade entre 5 e 10% da população, a aclimação será continuada por sete dias adicionais e se houver mais de 5% de

mortalidade rejeição do lote; e mortalidade <5% da população: aceitação do lote para experimentação (OECD, 2019).

Os peixes selecionados para as experimentações estavam livres de quaisquer malformações aparentes e não apresentavam sinais de estresse, sangramento ao longo do corpo, mucosidade excessiva ou natação atípica (ABNT NBR 15088 de 13/12/2016). Foi observada mortalidade < 5% da população durante os sete dias imediatamente anteriores à exposição. Não foram observadas lesões que pudessem indicar algum agente infeccioso ou doença degenerativa prévia, nos dez peixes avaliados por necropsia e histologia. Não houve utilização de medicamentos nos peixes selecionados para as experimentações.

Durante a aclimação e até 24h antes do início do experimento, os animais foram alimentados diariamente (duas vezes ao dia) com ração comercial para peixes contendo 36% de proteína bruta (submetida a um processo de trituração fina). O fotoperíodo instituído foi de 12h de luz (período claro):12h sem luz (período escuro).

3.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA ÁGUA

3.5.1. Durante período de aclimação

Cada aquário recebeu água decolorada, derivada da água tratada, encanada e filtrada, utilizada após 5 dias sob descanso, para evaporação e retirada do cloro. Durante o período de aclimação, a qualidade da água foi monitorada diariamente e eram mensurados a temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e o pH. Os parâmetros físico-químicos de partículas sólidas, carbono orgânico total, amônia não ionizada, nitrato, cloro residual, organofosforados, organoclorados, alumínio, arsênico, crômio, cobalto, cobre, ferro, chumbo, níquel, zinco, cádmio, mercúrio, prata, demanda química de oxigênio (DQO) estavam em conformidade ao prescrito pelo “Test Guideline” Nº 203(OCDE, 2019).

A temperatura e oxigênio dissolvido foram monitoradas com medidor multiparâmetro instrutherm MO-900 respectivamente, e o pH com pHmetro de bancada TecnoPON mPA- 210. Como instituído na NBR 15088 para “Manutenção e cultivo de *zebrafish (Danio rerio)*”, a água esteve com a temperatura entre 21 e 25 °C, e recebia aeração complementar. A água foi aerada por meio de compressores de ar com saídas conectadas a tubos de polietileno com pedra porosa para evitar o estresse dos peixes e 25% do volume total da água era substituído a cada cinco dias. O oxigênio dissolvido foi mantido com valores médios $\geq 5,0$ miligramas (mg)/L (não inferior a 60% do valor da saturação do ar) e o pH entre 6,0-8,5 (OCDE, 2019).

3.5.2. Durante o teste de toxicidade aguda

A água utilizada para preparação das soluções experimentais era destilada e, assim como a água de aclimação, estava em conformidade com os critérios do “Test Guideline” Nº 203 (OCDE, 2019). Essa água foi previamente testada para os diferentes metais, por meio da espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e foi comprovada a inexistência de valores significativos de chumbo ou ferro.

As soluções de estoque e teste eram preparadas utilizando os compostos metálicos: acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em grau analítico) e cloreto férrico (FeCl_3 em grau analítico), ambos na forma de pó que foram diluídos manualmente em água destilada. O pH foi ajustado, quando necessário (detalhamento no tópico 3.5. Ensaio de toxicidade aguda). Imediatamente após a diluição, as soluções foram encaminhadas para o Departamento de Química da UFMG para aferição dos níveis dos metais através da espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente. Posteriormente, um sistema de aeração ligado a pipetas tipo Pasteur foi instalado em cada recipiente e permaneceu ativo por 12h, antes do início do experimento, com a função de fornecer oxigênio e promover estabilização do pH. Após 48 h da colocação dos peixes, as soluções eram renovadas utilizando-se a mesma metodologia. Durante o ensaio foram medidos o pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido (OD), duas vezes ao dia.

3.6. ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

Os peixes foram submetidos a 96h de experimentação, sendo que, a solução teste era renovada após as primeiras 48h.

3.6.1. Testes pilotos de toxicidade aguda

Antes da realização dos experimentos definitivos foram realizados testes pilotos, utilizando uma metodologia similar a descrita anteriormente, para escolha das doses que possivelmente causariam lesões histopatológicas e contemplariam os objetivos do estudo. Foram realizados testes pilotos com acetato de chumbo nas concentrações de 1,02 e 4,92 mg/L, enquanto os testes com cloreto férrico foram realizados com as concentrações de 5,86 e 12,88 mg/L. Para esses testes três peixes foram distribuídos em aquários de vidro redondos preenchidos por 1,5 L de solução teste por 96 h. Os resultados de mortalidade, sinais clínicos e lesões histopatológicas decorrentes dos testes pilotos nortearam a escolha das concentrações utilizadas nos experimentos definitivos, em especial, quando comparados aos valores encontrados no Rio Paraopeba, após ruptura da barragem em Brumadinho e nas informações de Noga. (2014).

3.6.2. Ensaio semiestático de intoxicação aguda com diferentes diluições de chumbo

Nessa etapa foram avaliados os efeitos de cinco concentrações de chumbo na água: 0 (GCC); 0,46 (GC1); 1,02 (GC2); 2,24 (GC3) e 4,92 (GC4) mg/L. Foram utilizados 60 peixes, distribuídos aleatoriamente em 10 aquários. Para cada concentração foram utilizados dois aquários com seis peixes (12 peixes para cada concentração e 12 para o grupo controle) (fig. 1). O protocolo utilizado está em conformidade com o “Test Guideline” N° 203 (OCDE, 2019) para testes de concentrações de metais, que prevê o número mínimo de sete peixes por concentração e não exige repetições.

Para o preparo das soluções, o acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em grau analítico) foi diluído em 2000 ml de água destilada nas proporções para a obtenção das seguintes concentrações: 0,46; 1,02; 2,24; 4,92 mg/L de chumbo total (fator de diluição 2,2). O grupo controle (12 peixes) foi dividido em dois aquários contendo 2000 ml de água destilada cada.

Os valores utilizados no experimento foram escolhidos com base nas descrições de ensaios de toxicidade, que reportaram mortalidades associadas a chumbo com concentrações variando entre 1 e 31,5 mg/L (Noga, 2014).

3.6.3. Ensaio semiestático de intoxicação aguda com diferentes diluições de ferro

Nessa etapa foram avaliados os efeitos de cinco concentrações de ferro na água: 0 (GFC); 2,66 (GF1); 5,86 (GF2); 12,88 (GF3) e 28,34 (GF4) mg/L. Foram utilizados 60 peixes, distribuídos aleatoriamente em 10 aquários. Para cada concentração foram utilizados dois aquários com seis peixes (12 peixes para cada concentração e 12 para o grupo controle) (fig. 2).

Para obtenção das doses, o cloreto férrico (FeCl₃ em grau analítico) foi solubilizado em água destilada (2000 ml) e posteriormente diluído até serem obtidas as concentrações de 2,66; 5,86; 12,88; 28,34 mg/L de ferro dissolvido (fator de diluição 2,2).

Sabe-se que a reação do cloreto de ferro com a água desencadeia a precipitação de hidróxido de ferro, somada à liberação de prótons ácidos, como a seguinte demonstração:



Devido às características da reação, a utilização de uma solução de estoque de cloreto de ferro promoveria o acúmulo de prótons ácidos e a consequente redução do pH, comprometendo, portanto, o experimento. Para evitar esse inconveniente, foi adicionado bicarbonato de sódio nas soluções teste, para neutralizar o ácido formado pela precipitação do hidróxido férrico e obter pH na faixa entre 6 - 7, como descrito por Cadmus et al. (2018).

As doses que foram utilizadas basearam-se na recomendação de Noga (2014), que indica níveis de ferro acima de 0,5 mg/L de ferro associados a mortalidades de peixes.



Figura 1. Local e aquários do ensaio de toxicidade aguda de chumbo. Aquários com as soluções teste em aeração antes da experimentação



Figura 2. Local e aquários do ensaio de toxicidade aguda de ferro. Soluções de ferro após aeradas e dispostas no local de experimentação, antes do ensaio experimental.

3.7. PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE COMPORTAMENTO E MORTALIDADE

Em ambos os ensaios, os peixes foram mantidos nos aquários por 96 horas, para determinação da taxa de mortalidade e alterações comportamentais. As mortalidades foram registradas em intervalos de 4h. Foram gravados vídeos dos aquários, duas vezes ao dia, para auxiliar na aferição das alterações comportamentais e contabilização dos sinais clínicos.

Os peixes foram considerados mortos quando não havia movimento opercular visível e quando o toque do pedúnculo caudal não produzia nenhuma reação (OECD N° 203). As alterações comportamentais indicativas de toxicidade foram classificadas em: 1) perda de equilíbrio; 2) comportamento de natação; 3) função respiratória; 4) aparência e 5) outras anormalidades visíveis de aparência e comportamento. Os exemplos, critérios e definições dos sinais clínicos avaliados foram adaptados do Test Guideline” N° 203 (OCDE, 2019) e encontram-se compilados na tabela 1.

Tabela 1. Exemplos, definições e critérios de sinais clínicos, adaptado do Test Guideline” N° 203 (OCDE, 2019).

SINAIS CLINICOS	
PERDA DE EQUILIBRIO	
1. Orientação horizontal anormal	Perda de equilíbrio com orientação horizontal anormal em relação à coluna d'água.
2. Orientação vertical anormal	Postura de cabeça para cima ou para baixo.
3. Perda de controle de flutuabilidade	Flutuando na superfície ou afundando no fundo.
COMPORTAMENTOS ANORMAIS DE NATAÇÃO	
1.Hipoatividade	Diminuição da atividade espontânea, letargia e apatia.
2. Hiperatividade	Aumento da atividade espontânea, agitação e nado errático.
3. Natação saca-rolhas	Rotação em torno do eixo longo, movimentos erráticos, muitas vezes em rajadas, rolando, espiralando, nadando em espiral, caindo ou movimentos circulares.
4. Convulsões	Contração anormal involuntária e descontrolada de músculos (espasmos).
5. Tetania	Musculatura corporal rígida (intermitente ou permanente) paralisia.
6. Comportamentos de irritação da pele	Piscando, raspando, esfregando na lateral do aquário.
7. Distribuição anormal na superfície (comportamento)	Seleção de profundidade anormal, perto da interface água / ar, salto, mantém-se na superfície ou logo abaixo da superfície / topo.
8. Distribuição / comportamento anormal no fundo	Comportamento de profundidade anormal, perto da base do tanque, mergulho deitado; estático no fundo do aquário ou logo acima do fundo.

9. Exageradamente reativo a estímulos	Voo (sobressalto) ou resposta de evitação a: visual (mão passando por cima do tanque, luminoso (feixe de luz), tátil (toque) ou estímulo de vibração (tanque batido levemente).
10. Sub-reativo a estímulos	Diminuição da resposta de evitação visual, tátil ou estímulo de vibração
11. Comportamento de rebaixamento	Os peixes individuais apresentam perda de agregação e interações social.
12. Comportamento de cardume denso	Aumento na associação com aglomeração exagerada de peixes.
FUNÇÃO VENTILATÓRIA ANORMAL (RESPIRATÓRIA)	
1. Hiperventilação	Maior frequência de movimentos ventilatórios operculares, com possível boca aberta e opérculos abertos.
2. Hipoventilação	Frequência diminuída de movimentos operculares, movimentos ventilatórios rasos.
3. Ventilação irregular	Movimentos operculares irregulares.
4. Tossindo	Expansão rápida do reflexo da boca e opérculos não na água ou superfície - presume-se que desobstrua os canais ventilatórios.
5. Engolindo (boqueando)	Movimentos da boca (e operculares) na superfície da água, que resulta na entrada de água e ar.
6. Balançando a cabeça	Movimentos laterais rápidos da cabeça.
PIGMENTAÇÃO ANORMAL DA PELE	
1. Escurecimento	Alterado / aumentado / cor escura (escurecida).
2. Clareamento	Palidez, pigmentação pálida / alterada / fraca.
3. Manchada	Manchas descoloridas.
OUTRAS ANORMALIDADES VISÍVEIS (APARÊNCIA E COMPORTAMENTO)	
1. Exoftalmia	Inchaço dentro da (s) cavidade (s) orbitária (s), que resulta em protuberância de um ou ambos os olhos.
2. Edema	Edema abdominal devido ao acúmulo de líquido. Pode causar escamas salientes e / ou fissura na parede abdominal.
3. Hemorragia	Petéquias (manchas do tamanho de uma cabeça de alfinete) e / ou hematoma (área de coleção sangue) devido a sangramento intradérmico ou submucosa.
4. Secreção de muco exacerbada	Excesso de produção de muco.
5. Gesso fecal (anal)	Fio de fezes pendurado no ânus ou no fundo do tanque.
6. Agressividade	Agressão, ataque direto, dominação de locais de escolha de tanques.
7. Canibalismo	Atacar e ingerir partes de outros peixes ou comer corpos de peixes mortos.

Os peixes mortos, durante o intervalo de observação, eram removidos dos aquários. Critérios de eutanásia para evitar o sofrimento extremo por intoxicação aguda foram adotados durante as experimentações (por exemplo, alterações comportamentais visíveis indicativas de estresse e sofrimento descritos na Resolução Normativa No 34 do CONCEA).

Decorridos o período experimental, os animais que não morreram foram submetidos à eutanásia com overdose de eugenol associado a resfriamento rápido como prescrito no tópico 9.7.4.1- Resfriamento e congelamento- Diretriz CONCEA/2015. Os animais mortos naturalmente e os animais submetidos a eutanásia foram encaminhados em parcelas iguais para avaliação toxicológica e para avaliação histopatológica, ou seja:

- 50% dos peixes tiveram órgãos coletados e foram submetidos à análise toxicológica no Departamento de Química da UFMG. As amostras selecionadas foram as brânquias, vísceras (fígado, rim, coração, baço, pâncreas e intestinos) e musculatura (epaxial e hipaxial) somada aos ossos e a pele. Realizou-se a coleta de amostras compostas (seis peixes por dose experimental), pois a quantidade de material disponível era pequena.
- 50% dos peixes submetidos a análise histopatológica. Esse material, foi encaminhado ao Laboratório de Patologia Veterinária para processamento e avaliação histológica.

O índice de mortalidade e as alterações comportamentais foram registrados em intervalos de 4 h. Ao final do ensaio, calculou-se a porcentagem de mortalidade nas diferentes concentrações em todos os grupos experimentais. Os resultados foram considerados válidos pois, no término do período do ensaio experimental, a porcentagem de peixes mortos no grupo controle foi inferior ou igual a 10%, conforme estabelecido pela NBR 15088 (ABNT, 2016). As concentrações letais (CLs) (10% de mortalidade (CL₁₀); 50% de mortalidade (CL₅₀); mortalidade de 90% (CL₉₀96h) e mortalidade de 99%(CL₉₉) foram estimados por modelos de regressão probit-log (dose) (Nível de confiança de 95%) estabelecido por Lei e Sun (2018).

3.8. PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Foram coletados seis peixes (50 % dos indivíduos mortos ou submetidos à eutanásia) de cada grupo experimental. Imediatamente após a morte/eutanásia, os peixes eram dispostos em decúbito lateral direito, para a retirada dos opérculos e abertura lateral esquerda da cavidade abdominal e imersão dos animais em formalina 10% tamponada. Esse procedimento, buscou a melhor infiltração do fixador nas brânquias, nos órgãos cranianos e celomáticos (fig. 3).

O período de fixação foi de 48h e, posteriormente, os peixes foram submetidos a um período de descalcificação, com ácido fórmico a 24%, por um período de 48 horas à semelhança de Meletti (2003).

Seguido a fixação e descalcificação, os peixes inteiros foram dispostos, em decúbito lateral direito, em cassetes plásticos, e submetidos a uma bateria de banhos em álcoois para desidratação, em xilóis para diafanização e em parafina para inclusão e posterior cortes por microtomia com espessura de três micrômetros (µm) e realização da coloração de

Hematoxilina e Eosina (H.E). Realizou-se uma adaptação das recomendações do “Histopathology Guidance Document for the Medaka Extended One-Generation Reproduction Test” da OCDE (2014), de maneira que foram produzidas lâminas em três profundidades diferentes para cada peixe, com o intuito de aumentar o número e a área dos órgãos avaliados. Para os peixes do ensaio de toxicidade aguda de ferro também foi realizado histoquímica pela reação de Azul da Prússia.



Figura 3. Peixe do grupo Pb 1,02 mg/L. Demonstração da abertura lateral da cavidade celomática e retirada dos opérculos, após morte.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DOS TESTES PILOTO

Os resultados dos pré-testes com chumbo demonstraram que na concentração de 1,02 mg/L não houve mortes espontâneas e lesões histopatológicas. Os sinais clínicos observados foram de hipoatividade e distribuição irregular no fundo. Na concentração de 4,92 mg/L houve mortalidade de todos os peixes e foram encontradas lesões padrão 1 em alguns peixes. Os resultados dos pré-testes com ferro demonstraram que na concentração de 1,02 mg/L em pH médio de 6,8 não houve mortalidades nem lesões histopatológicas. Como sinais clínicos houve hipoatividade, distribuição anormal no fundo, sub-reatividade, comportamento de

rebaixamento e ventilação irregular. Na concentração 12,88 mg/L houve mortalidade a partir das 72h com morte de todos os animais às 78h. Foram observadas áreas multifocais discretas de acúmulo de precipitados de ferro nos espaços interlamelares, lúmen da cavidade oral e estômago. Os principais sinais clínicos observados foram hipoatividade, distribuição anormal no fundo, sub-reatividade, comportamento de rebaixamento, distribuição irregular na superfície, ventilação irregular e animais boqueando.

4.2. ENSAIO SEMIESTÁTICO DE TOXICIDADE AGUDA COM CHUMBO

4.2.1. Avaliação de sinais clínicos por grupo experimental

Grupo GC1 (Pb 0,46 mg/L)

No período de 96h do ensaio experimental, a mortalidade foi de 33,3% (4/12). As mortes desses quatro peixes ocorreram nos seguintes intervalos: um entre 4 e 8h, dois entre 8 e 12h e, por fim, um entre 20 e 24h de experimentação (fig. 7). Os sinais clínicos mais observados foram hipoatividade, distribuição anormal no fundo e comportamento de rebaixamento, seguidos por sub-reatividade, distribuição anormal na superfície e as alterações de funções ventilatórias.

Hipoatividade foi observada entre 32,5 e 100% dos peixes desde as primeiras 4h até às 96h de experimentação (fig. 8). Comportamento anormal no fundo e comportamento de rebaixamento foram registrados entre 36,3 e 100% dos peixes, desde as primeiras 4h até às 96h (fig. 8). A sub-reatividade foi constatada entre 12,5 e 88,8 % dos peixes no intervalo entre as primeiras 4h até às 96h. Distribuição irregular na superfície foi observada entre 36,3 e 50% dos peixes desde as primeiras 4h até às 24h de experimentação. As anormalidades de função respiratória, que incluíam hiperventilação, ventilação irregular e peixes boqueando, foram observadas entre 36,3 e 44,4% dos peixes desde as primeiras 4h até às 20h. A proporção de acometimento de cada sinal clínico variou de acordo com o horário e número de mortalidades. O detalhamento da distribuição dos sinais clínicos observados no grupo GC1 (Pb 0,46 mg/L) encontra-se na figura 4.

Grupo GC2 (Pb 1,02 mg/L)

No período de 96h do ensaio experimental, a mortalidade foi de 41,7% (5/12). Todas as cinco mortes ocorreram no intervalo entre 4 e 8h de experimentação. Não houve mortes após esse período, porém, os peixes continuaram apresentando sinais clínicos (fig. 7). Os sinais clínicos mais observados foram hipoatividade, distribuição anormal na superfície e alterações de funções ventilatórias seguidos por sub-reatividade, distribuição anormal no fundo, comportamento de rebaixamento e hemorragias.

Hipoatividade foi observada entre 28,6 e 100% dos peixes desde as primeiras 4h até às 96 h de experimentação. Comportamento anormal no fundo e comportamento de rebaixamento foram registrados entre 28,6 e 83,3% dos peixes, desde as primeiras 4h até às 96h (fig. 8). A sub-reatividade foi constatada entre 28,6 e 100% dos peixes no intervalo entre as primeiras 4h

até às 96h. Distribuição irregular na superfície foi observada entre 28,6 e 71,4% dos peixes, a partir das primeiras 4h até às 96h de experimentação. As anormalidades de função respiratória, que incluíam hiperventilação, ventilação irregular e peixes boqueando, foram observadas entre 14,3 e 71,4% dos peixes a partir das primeiras 8h até às 96h. Foram observadas hemorragias intensas nas brânquias de 14,3% dos peixes nos intervalos entre 24h e 48h (fig. 9). A proporção de acometimento de cada sinal clínico variou de acordo com o horário e número de mortalidades. O detalhamento da distribuição dos sinais clínicos observados no grupo GC2 (Pb 1,02 mg/L) encontra-se na figura 4.

Grupo GC3 (Pb 2,24 mg/L)

No período de 96h do ensaio experimental, a mortalidade foi de 75% (9/12). As mortes desses nove peixes ocorreram nos seguintes intervalos: um nas primeiras 4h, seis entre 4h e 8h, um entre 8h e 12h e um entre 24h e 28h de experimentação (fig. 7 e 9). Os sinais clínicos mais observados foram a hipoatividade, a distribuição anormal no fundo e o comportamento de rebaixamento, seguidos por sub-reatividade, distribuição anormal na superfície e as alterações de funções ventilatórias.

Hipoatividade foi observada entre 75 e 90,9% dos peixes desde as primeiras 4h até às 96h de experimentação. Comportamento anormal no fundo e comportamento de rebaixamento foram registrados entre 6,4 e 100% dos peixes, desde as primeiras 4h até às 96h. A sub-reatividade foi constatada entre 75 e 100% dos peixes no intervalo das primeiras 4 até às 96h. Distribuição irregular na superfície foi observada entre 20 e 54,5% dos peixes, das primeiras 4h até às 96h de experimentação. As anormalidades de função respiratória, que incluíam hiperventilação, ventilação irregular e peixes boqueando, foram observadas entre 20 e 54,5% dos peixes das primeiras 4h até às 8h. A proporção de acometimento de cada sinal clínico variou de acordo com o horário e número de mortalidades. O detalhamento da distribuição dos sinais clínicos observados no grupo GC3 (Pb 2,24 mg/L) encontra-se na figura 4.

Grupo GC4 (Pb 4,92 mg/L)

No período de 96h do ensaio experimental, a mortalidade foi de 91,7% (11/12). As mortes desses onze peixes ocorreram nos seguintes intervalos: dois nas primeiras 4h, cinco entre 4h e 8h, três entre 8h e 12h e um entre 68h e 72h de experimentação (fig. 7 e 9). Os sinais clínicos mais observados foram a hipoatividade, a distribuição anormal no fundo e o comportamento de rebaixamento, seguidos por sub-reatividade, distribuição anormal na superfície e as alterações de funções ventilatórias.

Hipoatividade foi observada entre 50 e 100% dos peixes desde as primeiras 4h até às 32h de experimentação. Comportamento anormal no fundo e comportamento de rebaixamento foram registrados em 60% dos peixes, desde as primeiras 4h até às 8h. A sub-reatividade foi constatada entre 20 e 100% dos peixes no intervalo das primeiras 4h até às 8h. Distribuição irregular na superfície esteve entre 50 e 60% dos peixes, desde as primeiras 4 até às 32h de experimentação (fig. 8). As anormalidades de função respiratória, que incluíam

hiperventilação, ventilação irregular e peixes boqueando, foram observadas em 60% dos peixes nas primeiras 4h. A proporção de acometimento de cada sinal clínico variou de acordo com o horário e número de mortalidades. O detalhamento da distribuição dos sinais clínicos observados no grupo GC4 (Pb 4,92 mg/L) encontra-se na figura 4.

Grupo GCC (Controle).

Não foram observados sinais clínicos ou mortalidades nos peixes do grupo GCC (Controle).

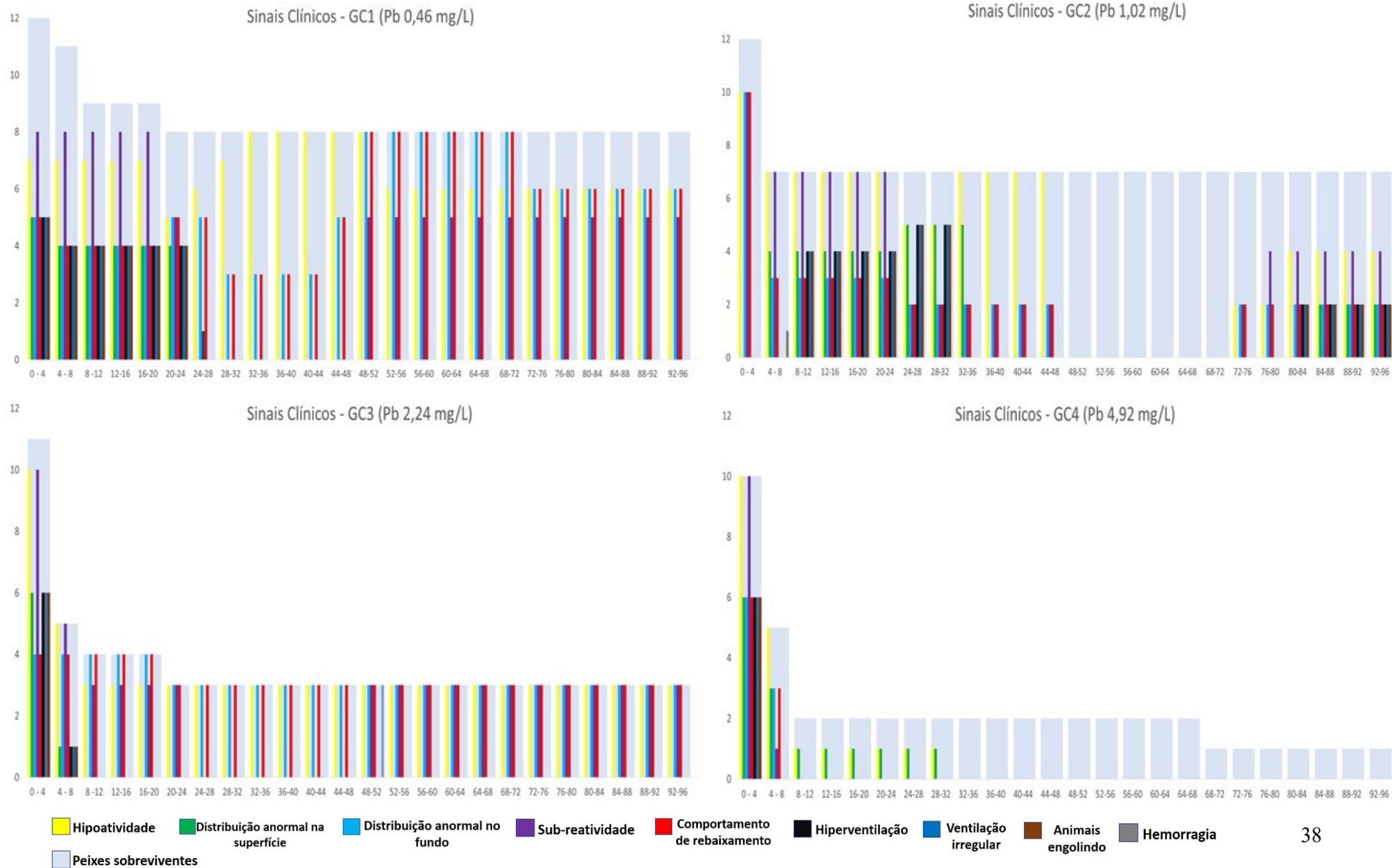


Figura 4. Sinais clínicos do ensaio de toxicidade aguda com chumbo. Conjunto de gráficos que mostram a distribuição de sinais clínicos ao longo do ensaio de toxicidade aguda de chumbo. Eixo X – quantidade de peixes; Eixo Y – Intervalos de tempo de observação.

4.2.2. Comparativo dos sinais clínicos entre grupos

A categoria de sinais clínicos mais comumente observada foi a dos comportamentos anormais de natação. O principal deles foi a hipoatividade, definida como diminuição da atividade espontânea, apatia ou letargia. O segundo sinal clínico mais importante foi a distribuição anormal no fundo, que tem por definição o comportamento de profundidade anormal perto da base inferior do tanque, com o peixe estático no fundo do aquário ou logo acima do fundo do aquário. Em muitos casos, concomitantemente a esses sinais clínicos, foi observada sub-reatividade e comportamento de rebaixamento. A sub-reatividade a estímulos é constatada quando há diminuição da resposta a estímulos visuais (percebido quando se aproxima a mão do aquário) a estímulos de toque e a estímulos de vibração (quando a parede do aquário recebe uma leve batida). O comportamento de rebaixamento (perda do comportamento de cardume), quando indivíduos perdem o instinto de agregação e interações sociais. O comportamento anormal de natação menos frequente foi a distribuição anormal na superfície, cuja definição é a seleção anormal de profundidade para perto da interface água/ar. Esse era um dos últimos sinais clínicos observados antes da morte e geralmente era acompanhado de anormalidades da função ventilatória (OCDE, 2019).

As anormalidades ventilatórias observadas foram: hiperventilação, que é o aumento da frequência dos movimentos operculares, geralmente associados à abertura de boca e opérculos; ventilação irregular, definida por movimentos operculares irregulares e arrítmicos; peixes engolindo (boqueando), constatado quando há movimentos de boca e operculares na superfície da água que promovem a entrada de ar e água. Esses sinais geralmente eram observados nas horas finais que antecediam a morte dos peixes. Em um peixe houve hemorragia visível (OCDE, 2019).

De maneira observacional, percebeu-se um padrão de progressão dos sinais clínicos. Inicialmente, a partir das duas primeiras horas de exposição, notava-se predominantemente hipoatividade, que geralmente estava associada à sub-reatividade, distribuição anormal no fundo e comportamento de rebaixamento. Esse conjunto de sinais clínicos acometia uma grande percentagem de peixes e se prolongava até o fim do experimento. Com o decorrer das horas, os peixes acometidos pelos sinais clínicos anteriores passaram a assumir a distribuição anormal na superfície, frequentemente somada à hiperventilação, ventilação irregular e com comportamento de engolir (boquear). Após algumas horas com esses sinais clínicos, os animais morriam. Portanto, o principal padrão de sinais clínicos associados a mortalidade evidenciou uma progressiva perda de capacidade respiratória e consequente hipóxia, provavelmente, devido à injúria nas brânquias, demonstrada pela avaliação histopatológica. Esse padrão foi percebido em todas as doses testadas e, quanto maior a dose, menor o tempo de progressão dos sinais clínicos até a mortalidade dos animais, bem como maior o número de mortes espontâneas em menos tempo.

Além da progressão de sinais clínicos citados, houve uma quantidade menor de peixes que permaneceram em distribuição anormal no fundo, com hipoatividade intensa, até o final do experimento. Houve casos em que esses animais no fundo do aquário progrediram para não reatividade a estímulos visuais e de vibração, hiperventilação, ventilação irregular e, por fim,

morte. Um peixe do grupo Pb 1,02 mg/L apresentou distribuição irregular na superfície com hemorragia das brânquias notada pela liberação de sangue na água ao redor, no intervalo entre 4 e 8h. Houve, também, alguns peixes que apresentaram distribuição anormal no fundo ou até na superfície, por vezes juntamente com hiperventilação, mas que se recuperavam e sobreviviam até o final do experimento.

A hipoatividade foi variável entre os grupos, tanto na porcentagem de peixes acometidos, quanto na progressão e duração do sinal clínico. No geral, esse sinal clínico foi observado sempre em uma considerável quantidade de peixes por todo período experimental em todos os grupos, sendo considerado o sinal clínico que mais acometeu os peixes nesse ensaio. Quando considerados os picos de observação desse sinal, a hipoatividade acometeu 100% (8/8) dos peixes do grupo Pb 0,46 mg/L no intervalo de 32 e 52 horas, 100% (7/7) dos peixes do grupo Pb 1,02 mg/L nos intervalos entre 4h e 24h e entre 32h e 48h. No grupo Pb 2,24 mg/L, o sinal foi observado em 90,9% (10/12) dos peixes nas primeiras 4h e atingiu 100% entre 4h e 8h e das 20h até o fim do ensaio. No grupo Pb 4,92 mg/L foi observado acometimento de 100% (12/12) dos peixes entre 0 e 3h e (10/10) entre 4h e 8h. Dessa forma, a precocidade dos picos de observação desse sinal estava relacionada com o nível de chumbo. O comparativo da porcentagem de hipoatividade entre grupos foi demonstrado na figura 5.

A distribuição anormal no fundo foi observada em muitos animais e estava associada ao comportamento de rebaixamento, pois esses animais alocados no fundo do aquário perdiam a organização coletiva de cardume. Esses sinais atingiram a totalidade dos peixes no grupo Pb 0,46 mg/L das 48h até as 72h (8/8). O grupo Pb 1,02 mg/L a observação desses sinais chegou a 83,3% (10/12) dos peixes nas primeiras 4h de experimentação. No grupo Pb 2,24 mg/L, esses sinais foram observados em 100% dos peixes das 8h até 20h (4/4) e das 20h até 96h (3/3). No grupo Pb 4,92 mg/L o pico de observação desse sinal foi de 60% dos peixes nas primeiras 4h (6/10) e entre 4h e 8h (3/5). A grande maioria dos peixes distribuídos anormalmente no fundo e com comportamento de rebaixamento também estavam hipoativos. O comparativo da porcentagem de distribuição anormal no fundo e comportamento de rebaixamento entre grupos foi demonstrado na figura 5.

A sub-reatividade a estímulos foi variável no decorrer do experimento e teve momentos de ausência e reaparecimento ao longo das 96h, nos diferentes grupos experimentais. No grupo Pb 0,46 mg/L o pico de observação chegou a 88,8% (8/9) dos peixes entre 8h e 20h. No grupo Pb 1,02 mg/L houve sub-reatividade em 100% dos animais entre 4h e 24h (7/7). No grupo Pb 2,24 mg/L houve diferentes intervalos em que houve sub-reatividade em 100% dos peixes incluindo o intervalo entre 4h e 8h (5/5), entre 20h e 24h (3/3) e das 48h até o fim do experimento (3/3). No grupo Pb 4,92 mg/L o sinal clínico foi observado em 100% (10/10) dos peixes nas primeiras 4h de experimentação. O comparativo da porcentagem de sub-reatividade a estímulos entre grupos foi demonstrado na figura 5.

A distribuição anormal na superfície foi o sinal clínico menos frequente, quando comparado aos anteriores. Comumente, esse sinal era acompanhado de anormalidades ventilatórias com progressão para a morte do animal. Isso justifica os valores menores encontrados e que decrescem em função do tempo, devido a mortalidade dos animais. A distribuição anormal na

superfície não chegou a 100% em nenhum grupo experimental, mas chegou a 50% (4/8) entre 20h e 24h no grupo Pb 0,46 mg/L, a 71,4% (5/7) entre 24h e 36h no grupo Pb 1,02 mg/L, a 54,5% (6/11) nas primeiras 4h no grupo Pb 2,24 mg/L e a 60% (6/10) nas primeiras 4h de experimentação no grupo Pb 4,92 mg/L. O comparativo da porcentagem de distribuição anormal entre grupos foi demonstrado na figura 6.

A hiperventilação, ventilação irregular e animais engolindo (boqueando), geralmente, eram os sinais clínicos que precediam a morte dos animais e estavam fortemente associados à distribuição irregular na superfície. Essas anormalidades de função ventilatória foram menos frequentes, quando comparadas a outros sinais clínicos e não atingiram 100% em nenhum grupo experimental, entretanto, chegou a 50% (4/8) entre 20h e 24h no grupo Pb 0,46 mg/L, a 71,4% (5/7) entre 24 e 36h no grupo Pb 1,02 mg/L, a 54,5% (6/11) nas primeiras 4h no grupo Pb 2,24 mg/L e a 60% (6/10) nas primeiras 4h de experimentação no grupo Pb 4,92 mg/L. O comparativo da porcentagem das anormalidades respiratórias entre grupos foi demonstrado na figura 6.

Os níveis de mortalidade variaram de acordo com a concentração de chumbo na solução. A mortalidade foi de 33,33% no grupo Pb 0,46 mg/L, 41,66% no grupo Pb 1,02 mg/L, 75% no grupo Pb 2,24 mg/L e 91,66% no grupo Pb 4,92 mg/L. Portanto, o experimento demonstrou relação positiva entre a dose e a mortalidade. A curva de progressão de mortalidade foi muito semelhante entre os grupos, entretanto os grupos com maior concentração iniciaram as mortalidades antes. As mortalidades nos grupos Pb 0,46 mg/L e Pb 1,02 mg/L começaram a partir das 5 primeiras horas enquanto, nos grupos Pb 2,24 mg/L e Pb 4,92 mg/L, começaram a partir das 3 primeiras horas. A maior parte das mortes acontecia até as 24h de experimentação e depois havia estabilização da mortalidade, muito embora, no grupo Pb 4,92 mg/L a última morte tenha ocorrido no intervalo entre 68 e 72h. Foi realizado o cálculo de concentração letal e os resultados encontram-se na tabela 2 enquanto o comparativo entre as mortalidades dos grupos encontra-se ilustrado na figura 6.

Tabela 2. Concentrações letais do ensaio de toxicidade aguda com chumbo

MORTALIDADE (%)	CONCENTRAÇÃO LETAL	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
10	0,26	0,03	2,37
50	1,1	0,4	3,01
90	4,64	0,76	28,29
99	15,03	0,68	-----

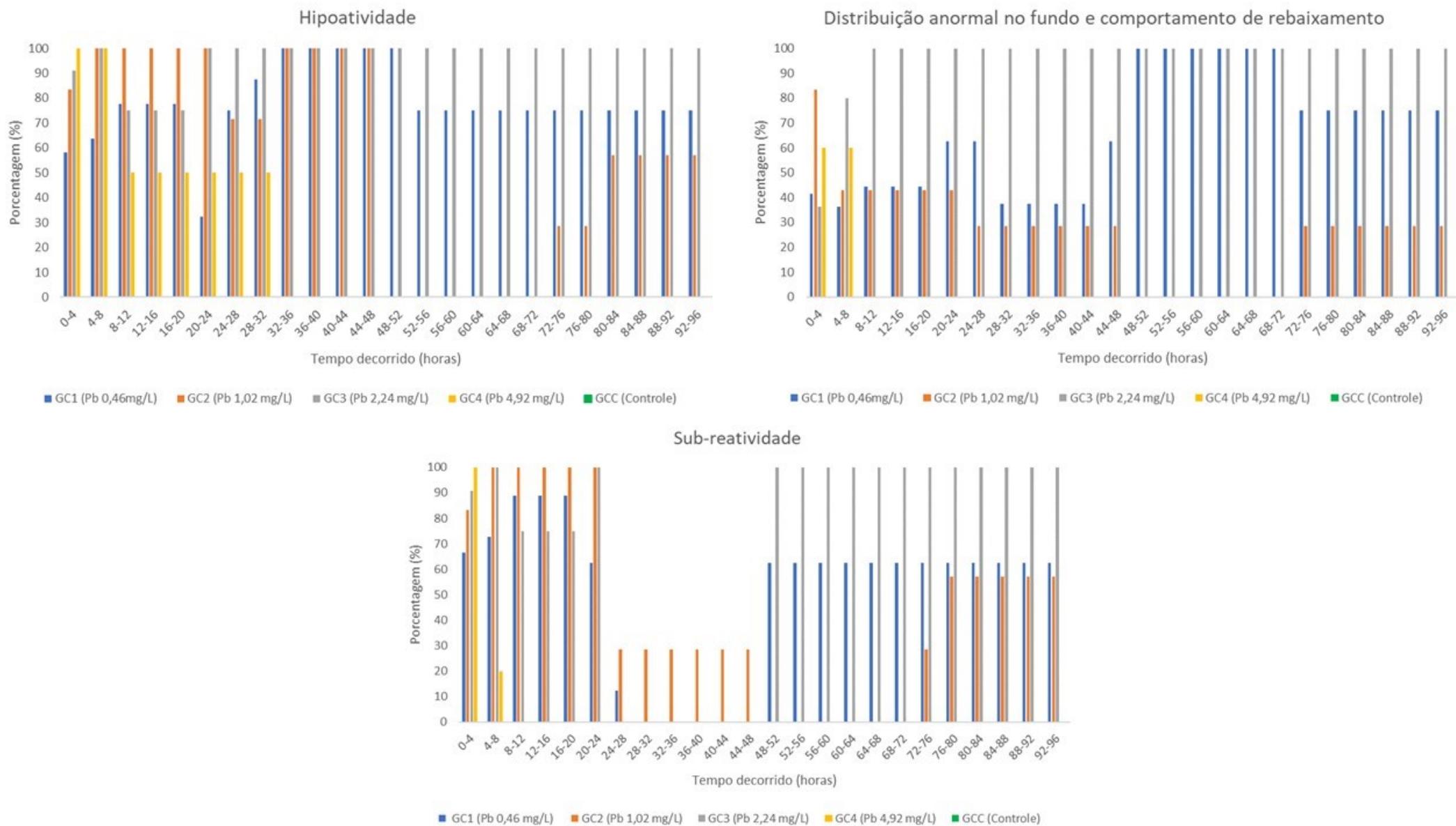


Figura 5. Comparativo de sinais clínicos entre grupos do ensaio de toxicidade aguda de chumbo

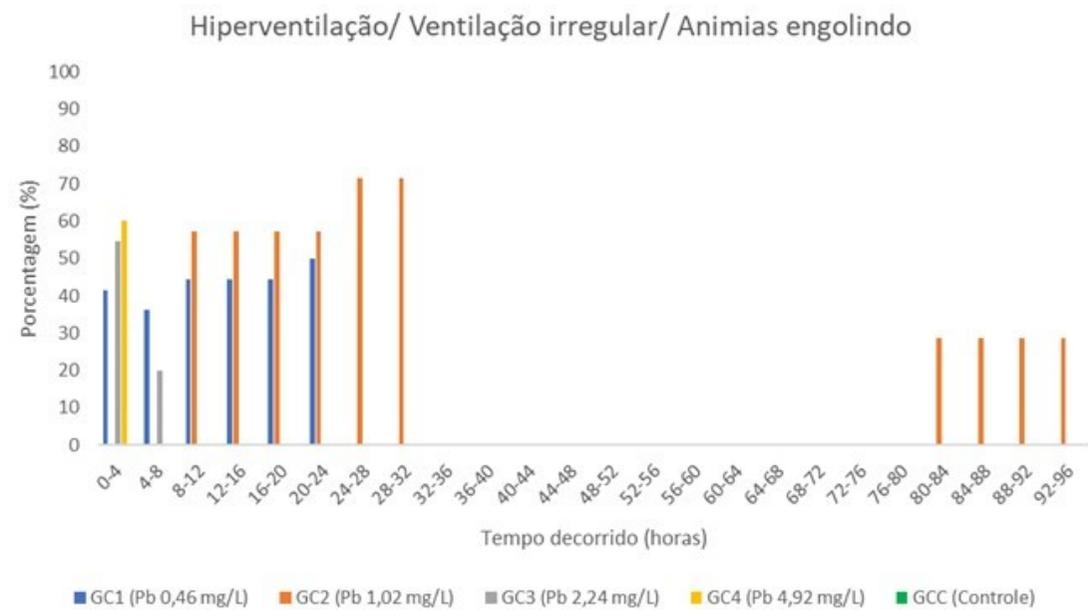
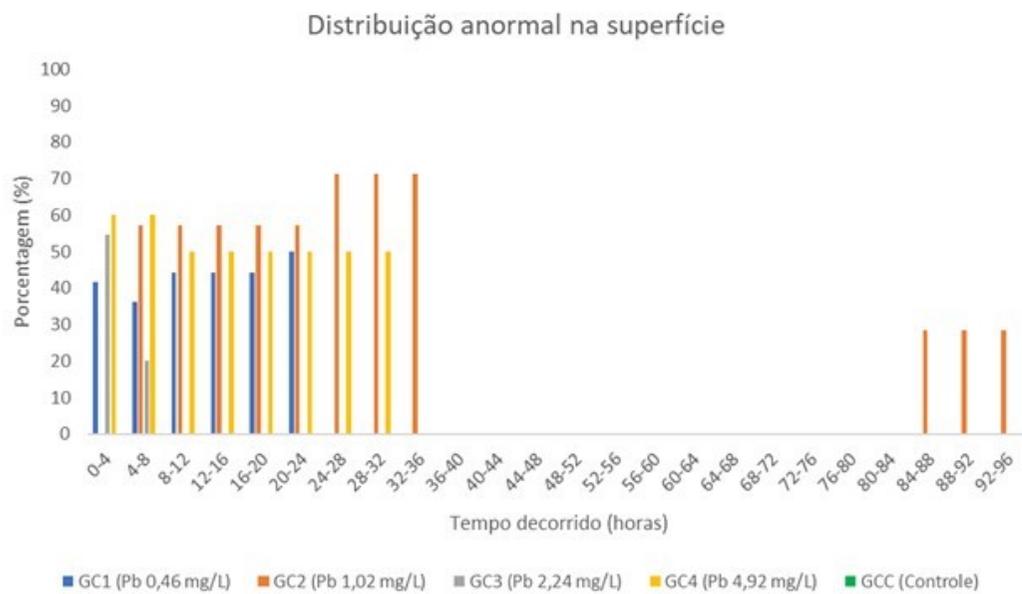


Figura 6. Comparativo dos sinais clínicos e mortalidade entre grupos do ensaio de toxicidade aguda chumbo.

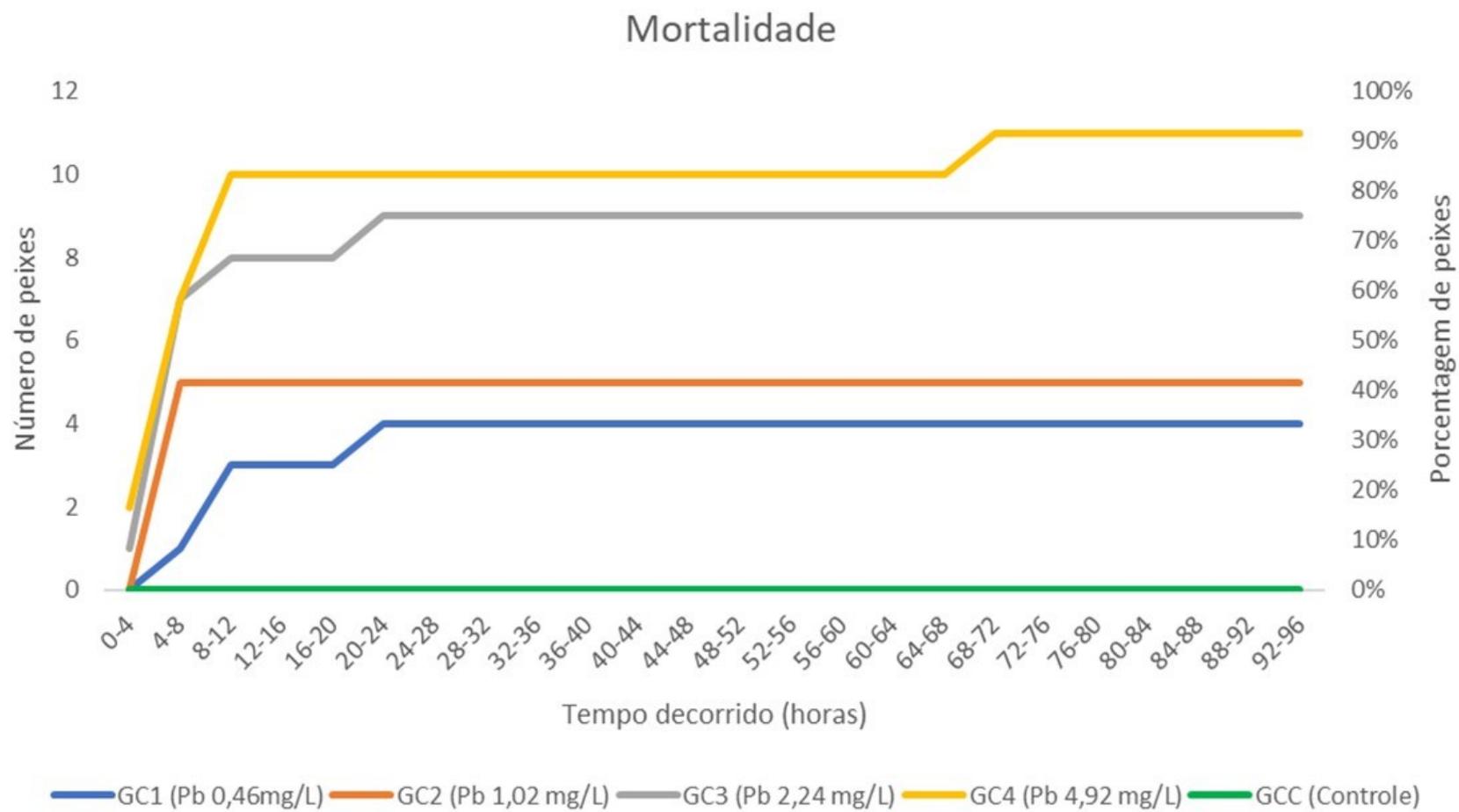


Figura 7- Mortalidade do ensaio de toxicidade aguda com Pb.

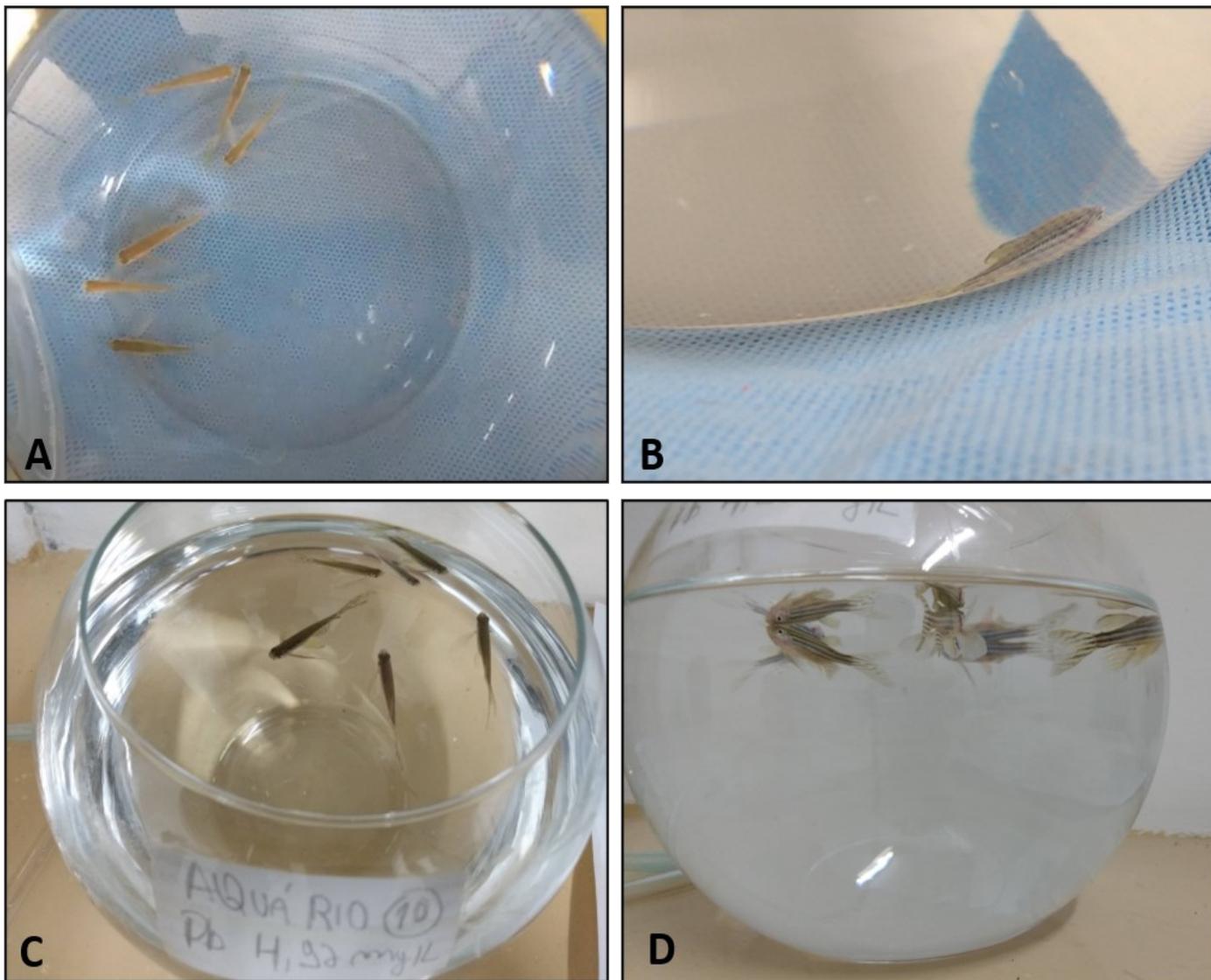


Figura 8. Representação de sinais clínicos de comportamento anormais de natação. A) Peixes do grupo Pb 0,46 mg/L com distribuição anormal no fundo e comportamento de rebaixamento. B) Peixe do grupo Pb 1,02 mg/L com distribuição anormal no fundo, e comportamento de rebaixamento. C) Peixes do grupo Pb 4,92 mg/L com distribuição anormal na superfície. D) Peixes do grupo Pb 4,92 mg/L com distribuição anormal na superfície.

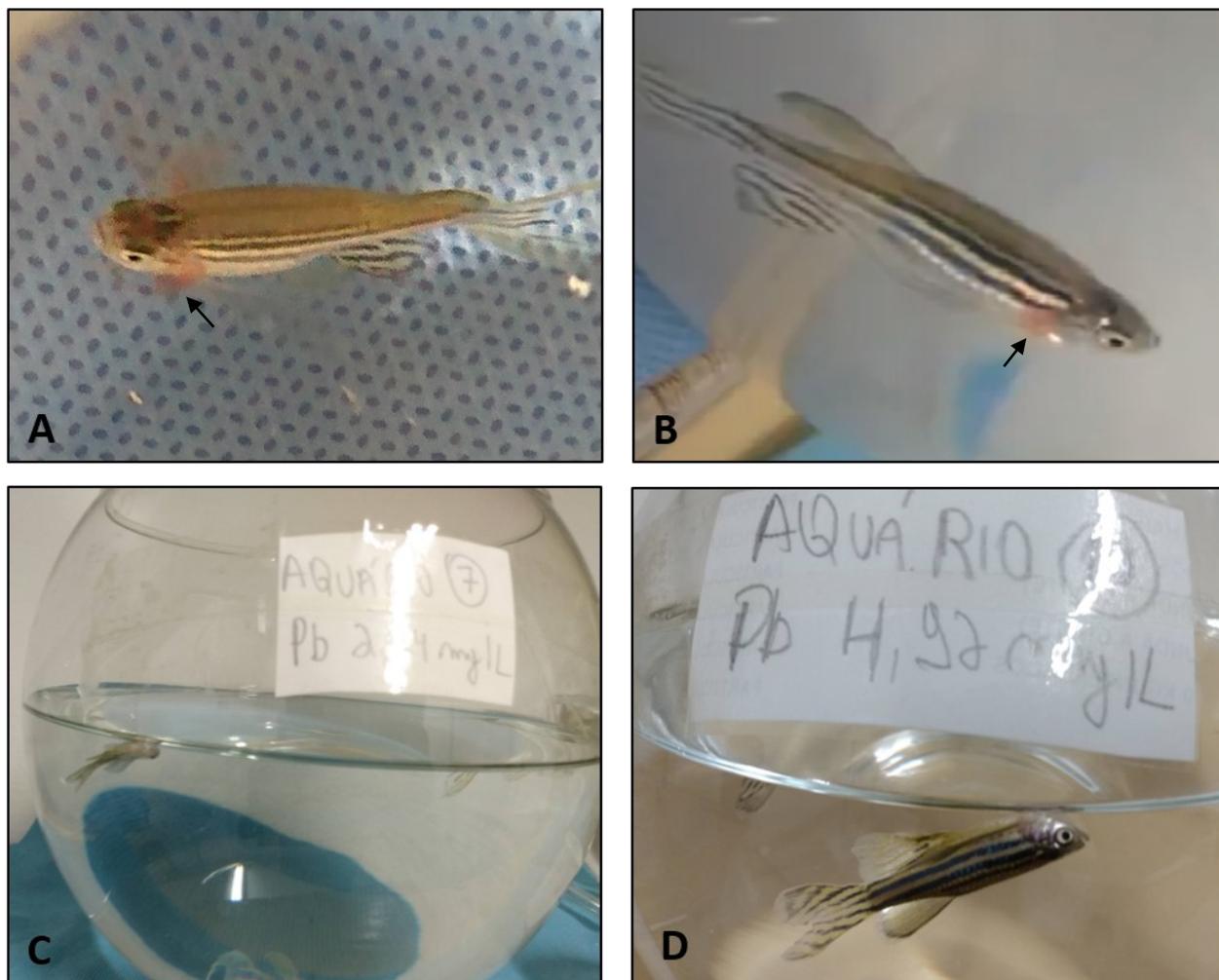


Figura 9. Demonstração do sinal clínico de hemorragia e de mortalidades. A e B) Peixe do grupo Pb 1,02 mg/L com hemorragia e liberação de sangue na água, evidenciado pela cor vermelha (seta). C) Aquário do grupo Pb 2,24 mg/L com peixe morto na superfície do aquário. D) Aquário do grupo Pb 4,92 mg/L com peixe morto na superfície do aquário.

4.2.3. Alterações patológicas

Com exceção de um peixe do grupo 1,02 mg/L, que demonstrou hemorragia nas brânquias, não foram encontradas lesões macroscópicas significativas nos peixes dos grupos experimentais e controle.

As lesões histológicas nos grupos experimentais se concentraram nas brânquias, sendo que, ocasionalmente, algumas lesões acometiam a pele. Foram notados dois padrões distintos de lesão nas brânquias, que foram associados à exposição ao chumbo, uma vez que não foram observados nos peixes do grupo controle.

O primeiro padrão (padrão 1), geralmente encontrado em peixes que morreram espontaneamente, era caracterizado por perda acentuada da organização de lamelas primárias e secundárias associada à fragmentação celular acentuada, hipereosinofilia citoplasmática, picnose e cariólise (necrose aguda focalmente extensa acentuada) (fig. 10, 11 e 12). Essas células necróticas comumente se desprendiam das lamelas (fig. 10, 11 e 12). Em conjunto com a perda de lamelas e da organização lamelar, havia acúmulos de restos celulares nos espaços interlamelares (fig. 11 e 12). Adicionalmente, havia hiperemia ativa associada a lesão e áreas multifocais de hemorragia.

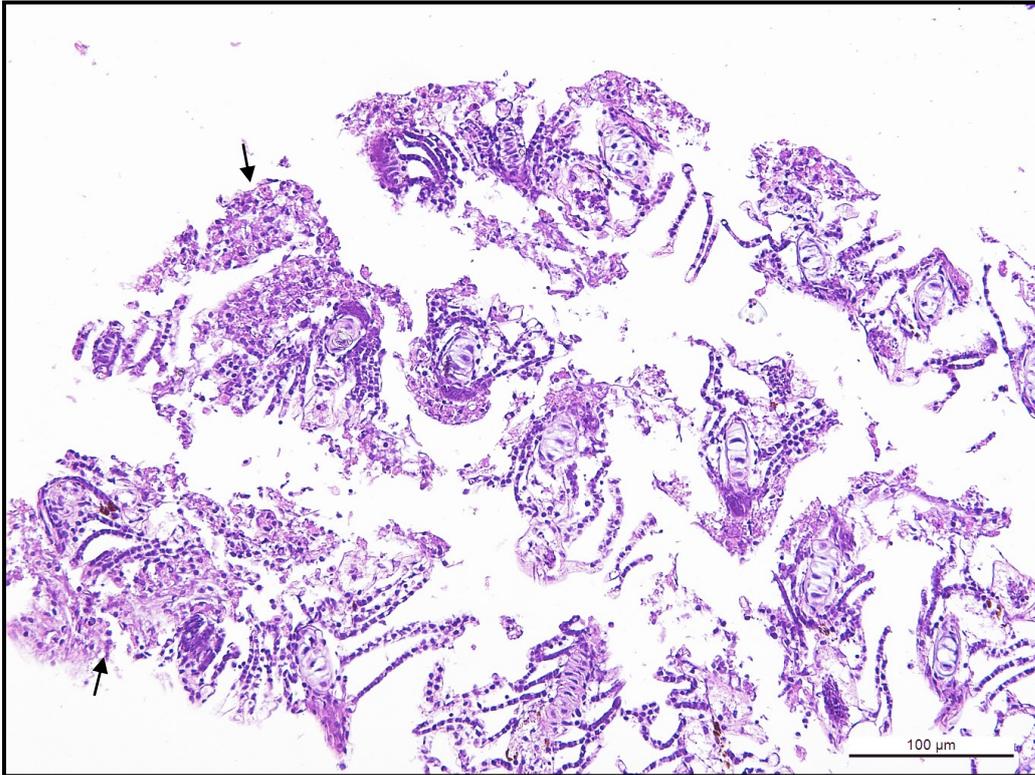


Figura 10. Histopatologia do peixe 9.1. Grupo Pb 4,92 mg/L. Brânquias. Necrose difusa e acentuada das lamelas, com desprendimento multifocal do epitélio lamelar e acúmulo multifocal de restos celulares entre os espaços interlamelares (setas) (H.E, 200x)

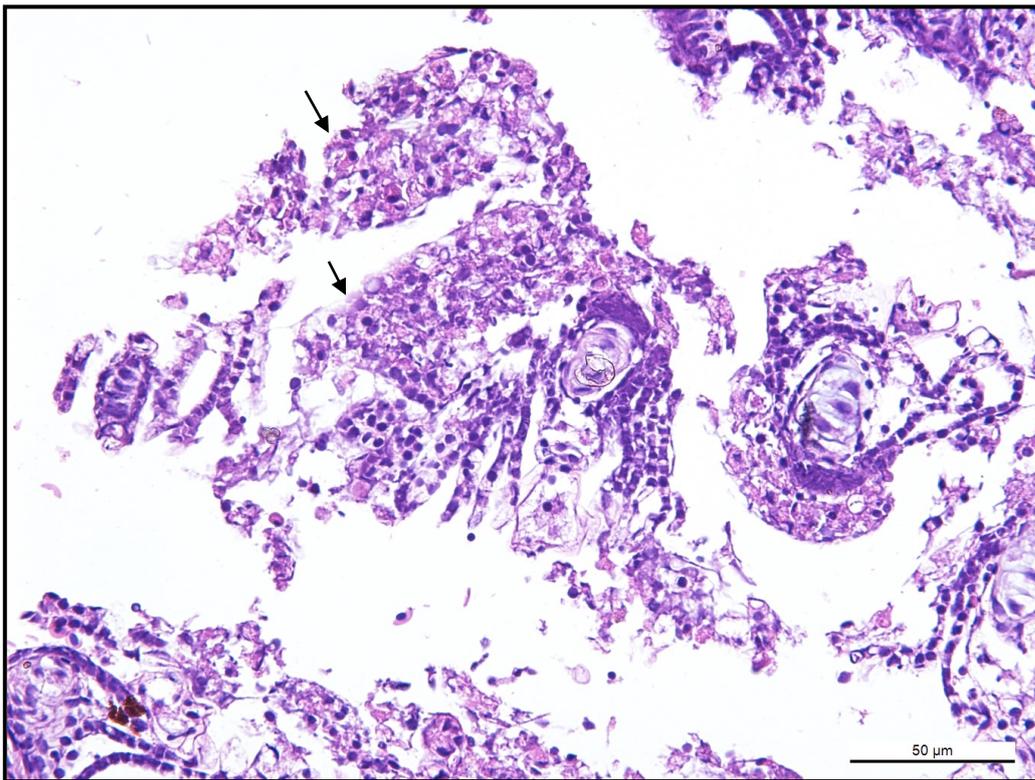


Figura 11. Histopatologia do peixe 9.1. Grupo Pb 4,92 mg/L. Brânquias. Necrose difusa e acentuada com perda acentuada de lamelas e acúmulo multifocal acentuado de restos celulares nos espaços interlamelares (setas) (H.E, 400x).

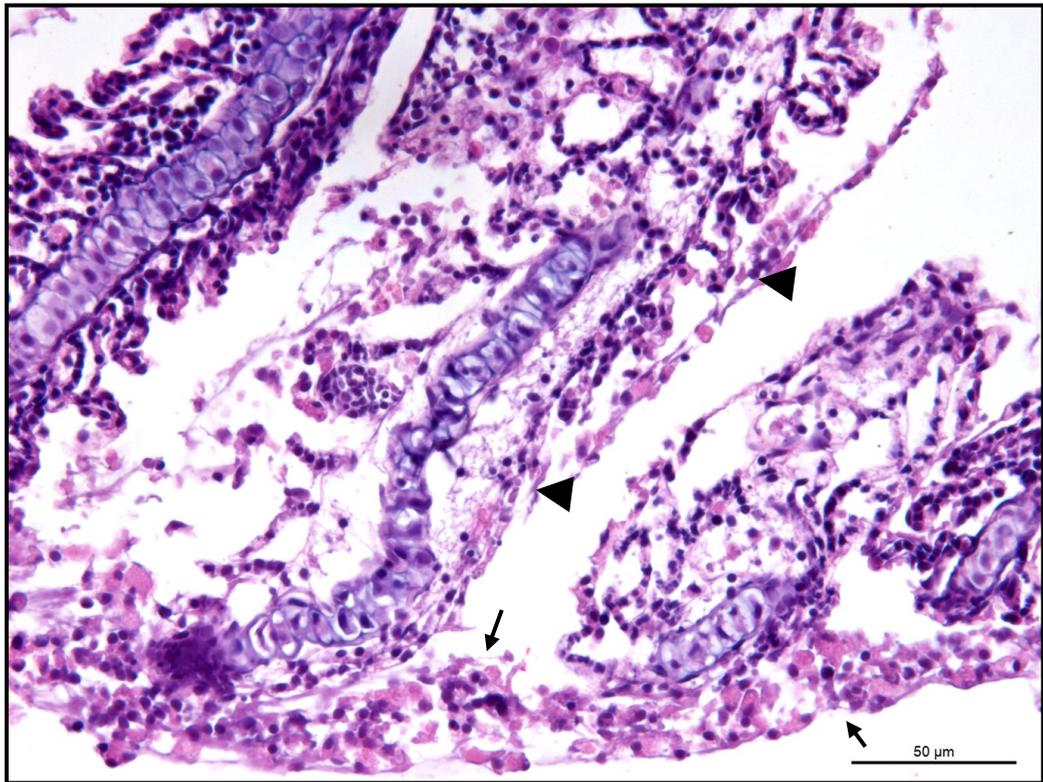


Figura 12. Histopatologia do peixe 9.3. Grupo Pb 4,92 mg/L. Brânquias. Necrose multifocal a coalescente das lamelas secundárias com desprendimento do epitélio (cabeça de seta) e acúmulo multifocal de restos celulares nos espaços interlamelares (setas). (H.E, 400x).

Outro padrão (padrão 2), geralmente encontrado em peixes que sobreviveram às 96h e foram submetidos a eutanásia, era caracterizado por espessamento acentuado das lamelas secundárias, com discreta a moderada desorganização lamelar e numerosas células com núcleos fragmentados e citoplasma hipereosinofílico e fragmentado (fig. 13, 14 e 15). Havia, também, hiperplasia de células epiteliais de revestimento com fusão moderada de lamelas secundárias (fig. 13, 14 e 15) e acúmulo, em quantidades variáveis, de material granular amorfo, fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares) que formava agregados em espaços bem delimitados entre as células epiteliais de revestimento lamelar (fig. 13, 14 e 15 e 14). Ocasionalmente havia perda da conformação de células e acúmulo de restos celulares na pele da cabeça e da nadadeira peitoral (fig. 17 e 18) e hemorragia das brânquias (fig. 16). As alterações observadas no padrão 2 relacionadas à hiperplasia foram consideradas consistentes, enquanto a fragmentação do citoplasma e núcleo das células será melhor estudada, devido à possibilidade de relação dessa alteração com o método de eutanásia. No grupo controle não havia alterações histológicas com brânquias e pele com adequada apresentação morfológica (Fig. 19, 20 e 21). Foram encontrados alguns artefatos, comumente descritos como lesões, como a vacuolização de células de revestimento dos túbulos renais, vacuolização do citoplasma de hepatócitos e excesso de basofilia do citoplasma de hepatócitos em fêmeas com produção de proteína vitelogênica.

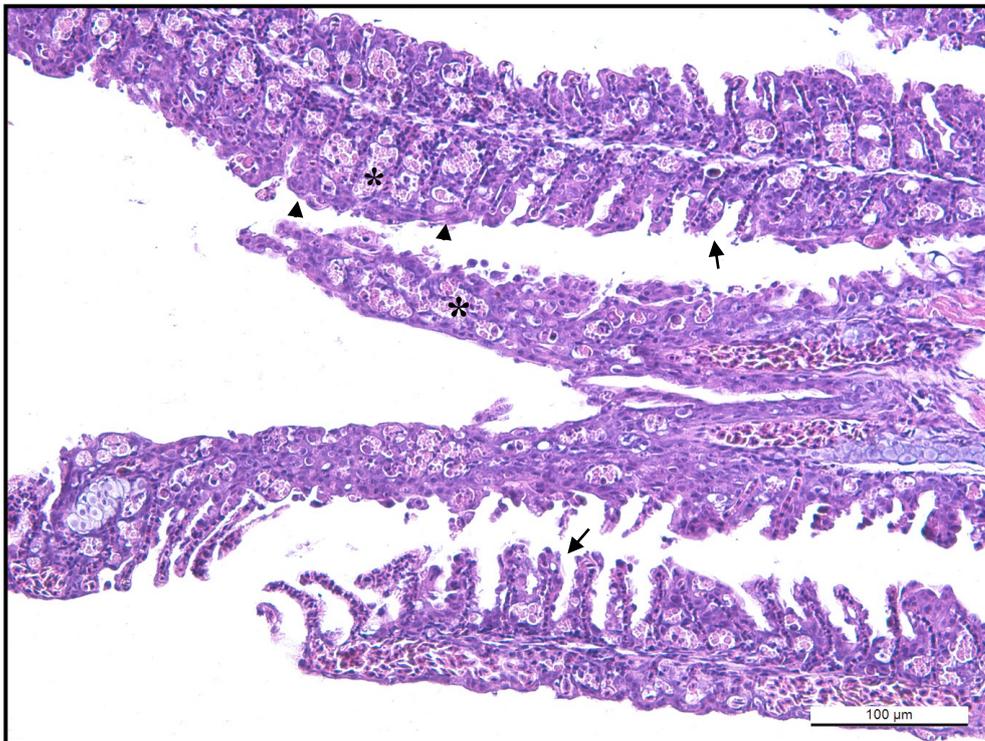


Figura 13. Histopatologia do peixe 7.5. Grupo 2,24 mg/L. Brânquias. Espessamento difuso moderado de lamelas secundárias por hiperplasia epitelial (setas), com áreas multifocais de achatamento e fusão de lamelas secundárias (cabeça de seta) e áreas de acúmulo de material granular fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares) em espaços bem delimitados entre as células epiteliais de revestimento lamelar (asterisco) (H.E, 200x).

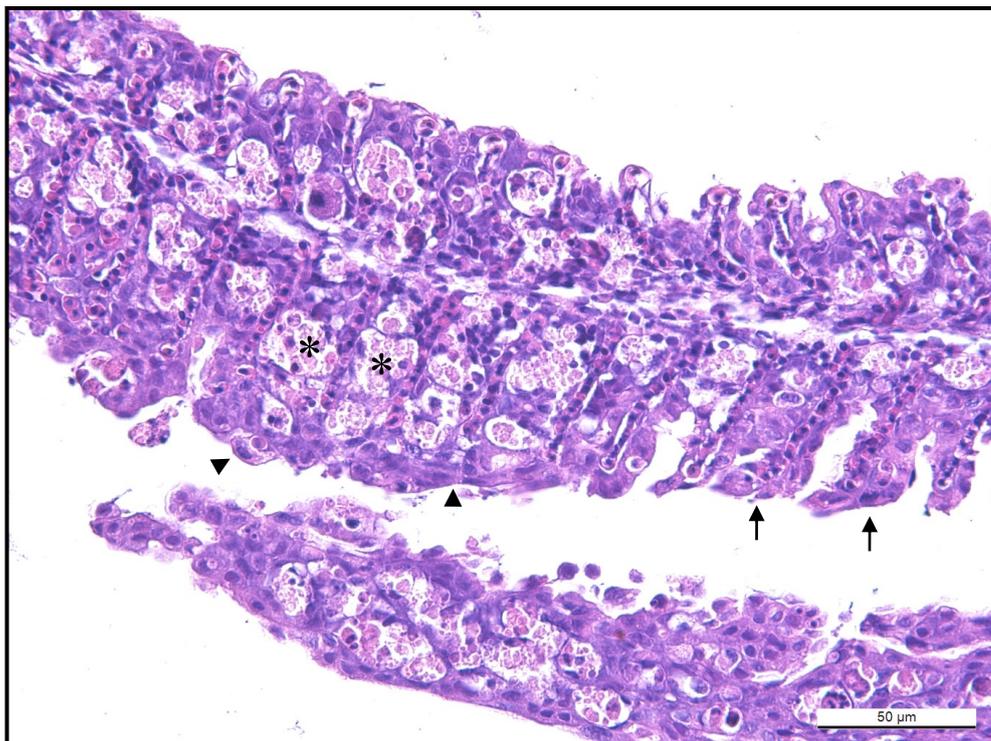


Figura 14. Histopatologia do peixe 7.5. Grupo Pb 2,24 mg/L. Brânquias. Hiperplasia epitelial com fusão de lamelas moderada (cabeça de seta) e acúmulo de material granular fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares) entre as células epiteliais das lamelas secundárias (asterisco) (H.E, 400x)

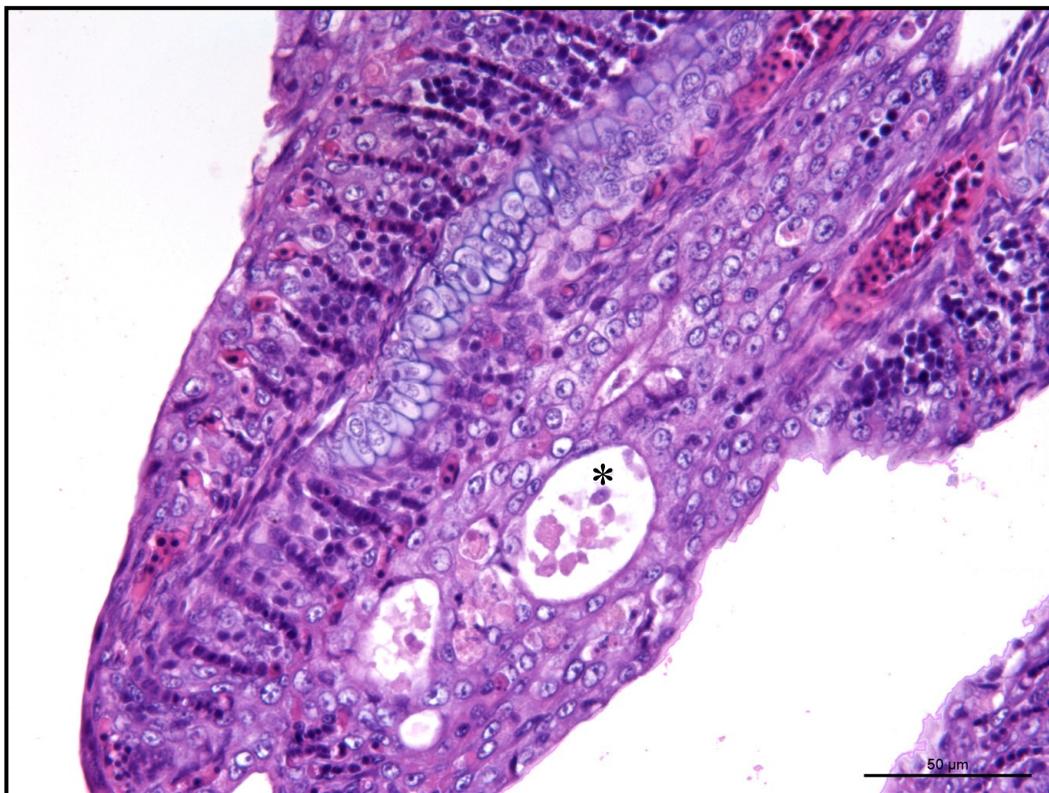


Figura 15. Histopatologia do peixe 10.5. Grupo 4,92 mg/L. Brânquias. Espessamento difuso e acentuado das lamelas com fusão difusa acentuada de lamelas secundárias, hiperplasia epitelial difusa acentuada e áreas multifocais acentuadas de acúmulo de restos celulares (asterisco) (H.E, 400x).

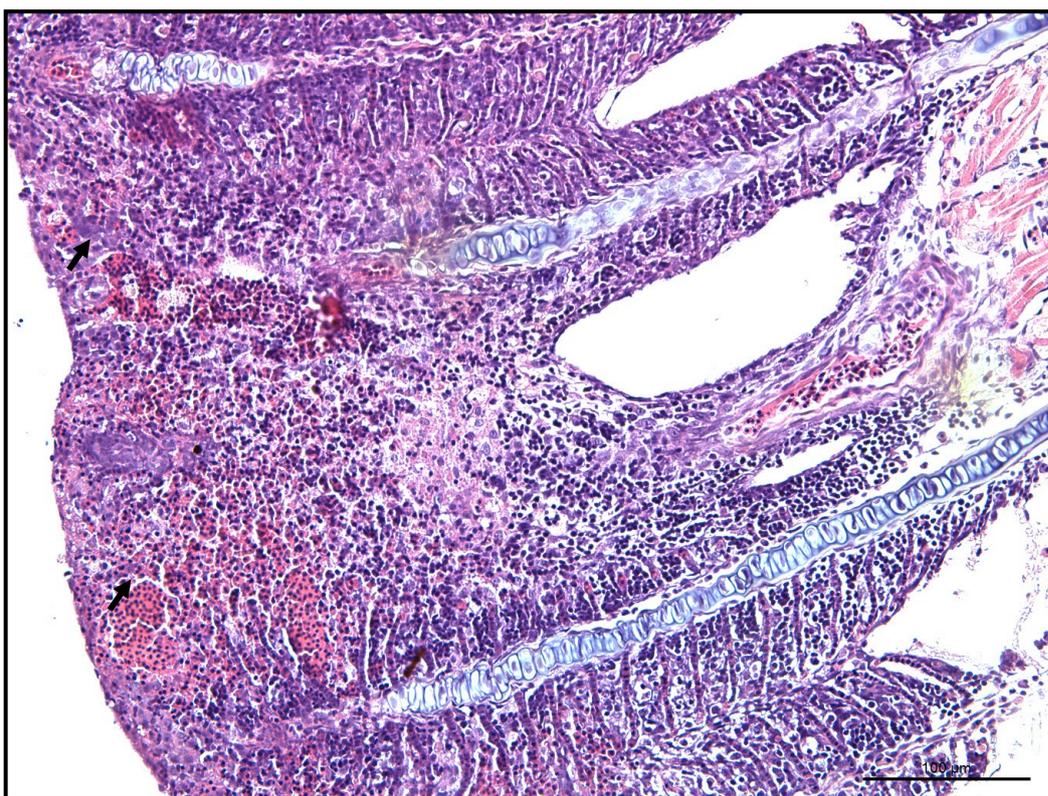


Figura 16. Histopatologia do peixe 9.3. Grupo Pb 4,92 mg/L. Brânquias. Espessamento e fusão difusa acentuada de lamelas primárias e secundárias e áreas multifocais de hemorragia acentuada (seta) (H.E, 200x).

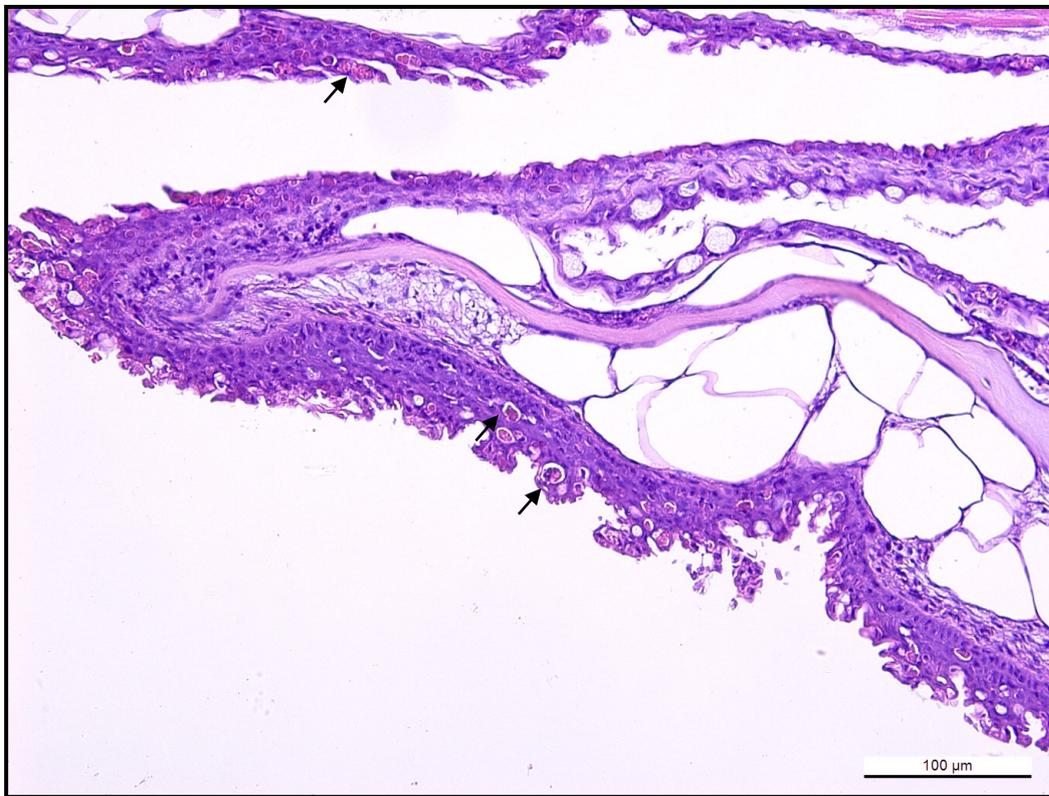


Figura 17. Histopatologia do peixe 7.5. Grupo Pb 2,24 mg/L. Pele. Áreas multifocais de acúmulo de material granular fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares) entre as células epiteliais da epiderme (setas) (H.E, 200x).

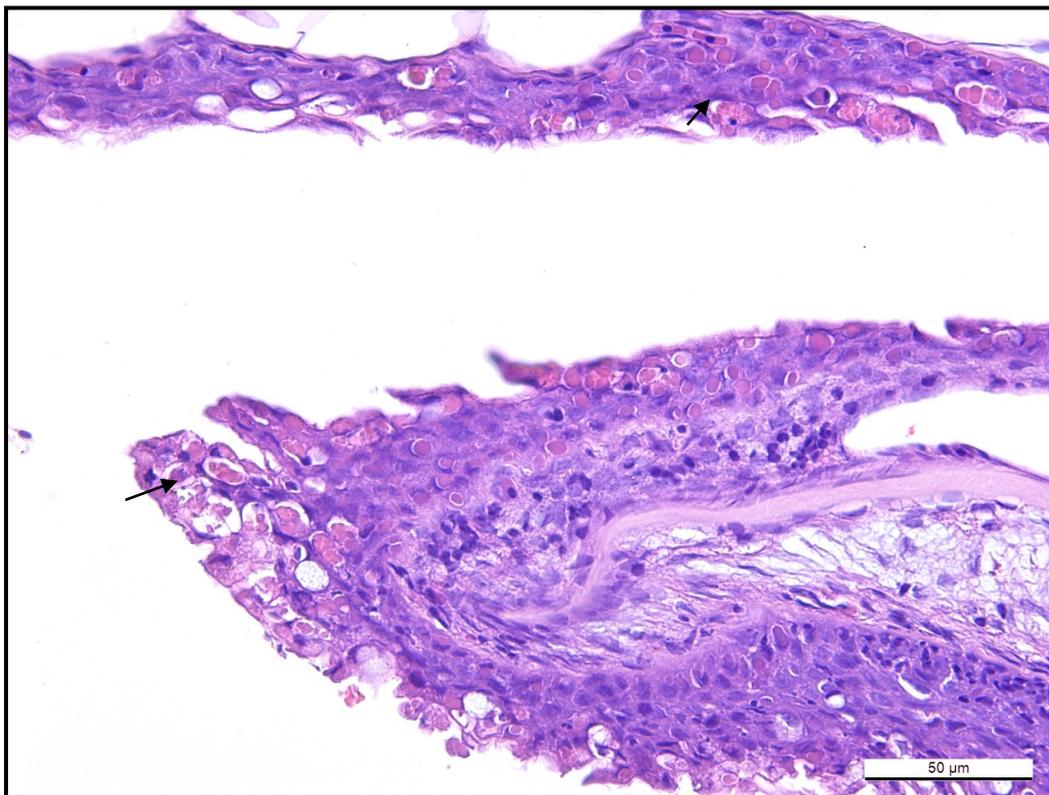


Figura 18. Histopatologia do peixe 7.5. Grupo Pb 2,24 mg/L. Pele. Áreas multifocais de acúmulo de material granular fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares) entre células epiteliais da epiderme (setas) (H.E, 400x).



Figura 19. Peixe 2.1. Grupo Controle. Cavidade opercular com brânquias sem alterações histológicas. (H.E, 50x).



Figura 20. Peixe 2.1. Grupo Controle. Brânquias. Lamelas primárias e secundárias sem alterações histológicas (H.E, 200x).

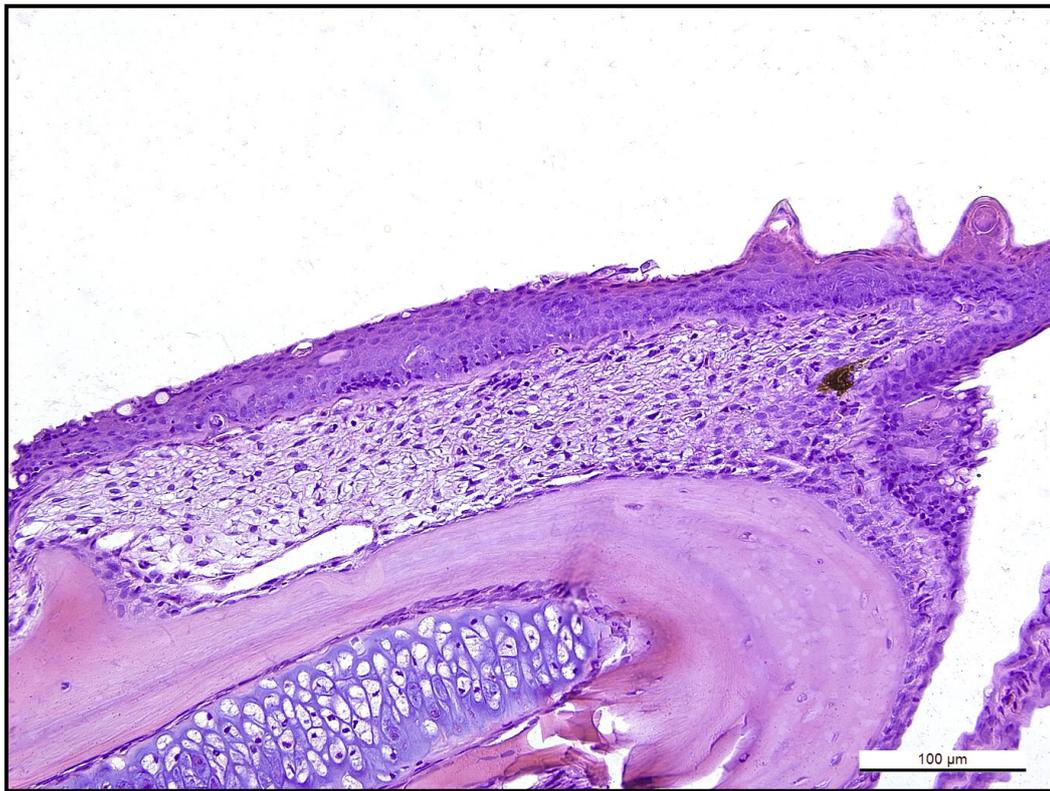


Figura 21. Peixe 2.1. Grupo Controle. Pele. Sem alteração histológicas (H.E., 200x).

4.2.4. Descrição das alterações anatomopatológicas por grupo

Foram avaliados histologicamente os tecidos de seis peixes de cada grupo experimental. Esses peixes foram identificados numericamente e foi realizada a correlação de lesões anatomopatológicas com o momento da morte do animal. Os peixes foram enumerados em um esquema X.Y, no qual o primeiro número (X) equivale ao aquário que o animal estava, enquanto o segundo número (Y) representa ordem em que ele morreu em relação ao seu aquário (1º, 2º, 3º). Como exemplo, o peixe 4.1 foi o primeiro peixe a morrer do aquário 4. No experimento com chumbo, a distribuição dos *zebrafish* ocorreu com um peixe destinado à histopatologia seguido de um animal encaminhado para toxicologia. Coincidentemente, os peixes com identificação terminada em números ímpares foram destinados à histopatologia, enquanto os pares foram encaminhados para toxicologia.

Grupo GC1 (Pb 0,46 mg/L)

Nesse grupo experimental, dois peixes (3.1 e 4.1) morreram espontaneamente as 11h30min minutos e 6h09min após o início do experimento, respectivamente. Ambos os peixes apresentaram o padrão 1 de lesão, com necrose difusa acentuada associada à acúmulo de restos celulares nos espaços interlamelares e hiperemia difusa acentuada.

Os outros quatro peixes avaliados (3.3, 3.5, 4.4, 4.6) foram submetidos a eutanásia. Todos esses animais apresentaram o padrão 2 de lesão, com necrose individual de células com espessamento, fusão e hiperplasia de lamelas secundárias associada à acúmulo de restos celulares entre as células epiteliais de revestimento lamelar. A intensidade das lesões de padrão 2 variou entre os animais, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no Grupo Pb 0,46mg/L

<i>Animal</i>	<i>Tipo de morte</i>	<i>Tempo de morte</i>	<i>Padrão de lesão</i>	<i>Intensidade</i>
4.1	Natural	6h09min	Padrão 1	Acentuada
3.1	Natural	11h36min	Padrão 1	Acentuada
3.3	Eutanásia	96h	Padrão 2	Acentuada
3.5	Eutanásia	96h	Padrão 2	Discreta
4.4	Eutanásia	96h	Padrão 2	Acentuada
4.6	Eutanásia	96h	Padrão 2	Moderada

Animais organizados por tempo de morte. h- horas, min- minutos

Grupo GC2 (Pb 1,02 mg/L)

Nesse grupo experimental, três peixes (5.1, 6.1 e 6.3) morreram espontaneamente após 5h25min, 4h59min e 5h29min de experimentação, respectivamente. Todos os animais apresentaram o padrão 1 de lesão.

Os outros três peixes avaliados (5.3, 5.5 e 6.5) foram submetidos a eutanásia. Esses animais apresentaram o padrão 2. A intensidade das lesões de padrão 2 variou entre os animais, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no Grupo Pb 1,02mg/L

<i>Animal</i>	<i>Tipo de morte</i>	<i>Tempo de morte</i>	<i>Padrão de lesão</i>	<i>Intensidade</i>
6.1	Natural	4h59min	Padrão 1	Acentuada
5.1	Natural	5h25min	Padrão 1	Acentuada
6.3	Natural	5h29min	Padrão 1	Acentuada
5.3	Eutanásia	96h	Padrão 2	Acentuada
5.5	Eutanásia	96h	Padrão 2	Moderada
6.5	Eutanásia	96h	Padrão 2	Discreta

Animais organizados por tempo de morte. H- horas, min- minutos

Grupo GC3 (Pb 2,24 mg/L)

Nesse grupo experimental, cinco peixes (7.1, 7.3, 8.1, 8.3, 8.5) morreram espontaneamente após 3h12min, 22h55min, 4h54min, 5h27min e 6h34min de experimentação, respectivamente. Todos os animais apresentaram o padrão 1 de lesão. Adicionalmente, um peixe (7.3) apresentou hiperemia e alguns vasos sanguíneos.

O outro peixe avaliado (7.5) foi submetido a eutanásia. Esse animal apresentou o padrão 2 de lesão. Além disso, esse peixe apresentou esse mesmo padrão de lesão, especialmente com o acúmulo de restos celulares em espaços bem delimitados entre as células epiteliais na pele, principalmente da cabeça e no epitélio das narinas. A intensidade e padrão de lesões está demonstrada na Tabela 5.

Tabela 5. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no Grupo Pb 2,24mg/L

<i>Animal</i>	<i>Tipo de morte</i>	<i>Tempo de morte</i>	<i>Padrão de lesão</i>	<i>Intensidade</i>
7.1	Natural	3h12min	Padrão 1	Acentuada
8.1	Natural	4h54min	Padrão 1	Acentuada

8.3	Natural	5h27min	Padrão 1	Acentuada
8.5	Natural	6h34min	Padrão 1	Acentuada
7.3	Natural	22h55min	Padrão 1	Acentuada
7.5	Eutanásia	96h	Padrão 2	Acentuada

Animais organizados por tempo de morte. h- horas, min- minutos

Grupo GC4 (Pb 4,92 mg/L)

Nesse grupo experimental, cinco peixes (9.1, 9.3, 10.1, 10.3 e 10.5) morreram espontaneamente após 4h50min, 7h06min, 3h45min, 4h54min e 8h50min de experimentação, respectivamente. Todos os animais apresentaram o padrão 1 de lesão. Entretanto, dois peixes (9.3 e 10.5) apresentaram achados de ambos os padrões em diferentes proporções. Em um peixe (9.3) havia predominância do padrão e áreas com aspectos histológicos encontrados no padrão 2 como áreas multifocais discretas de acúmulo de material granular fracamente eosinofílico (interpretado como restos celulares). O outro peixe (10.5), apresentou predominância do padrão 1, com áreas multifocais a coalescentes com moderado acúmulo de restos celulares.

O outro peixe avaliado (9.6) foi submetido à eutanásia. Esse animal apresentou o padrão 2 de lesão. A intensidade das lesões de padrão 2 variou entre os animais, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no Grupo Pb 4,92mg/L

<i>Animal</i>	<i>Tipo de morte</i>	<i>Tempo de morte</i>	<i>Padrão de lesão</i>	<i>Intensidade</i>
10.1	Natural	3h45min	Padrão 1	Acentuada
9.1	Natural	4h50min	Padrão 1	Acentuada
10.3	Natural	4h54min	Padrão 1	Acentuada
9.3	Natural	7h06min	Padrão 1 + 2	Padrão 1- acentuado Padrão 2- moderado
10.5	Natural	8h50min	Padrão 1 + 2	Padrão 1- acentuado Padrão 2- moderado
9.6	Eutanásia	96h	Padrão 2	Discreto

Animais organizados por tempo de morte. h- horas, min- minutos

Grupo Controle

No grupo controle, não foram observadas alterações histopatológicas significativas. As brânquias desses animais apresentaram adequada conformação morfológica com lamelas primária e secundária sem alterações.

4.2.5. Parâmetros da água por grupo

Os principais parâmetros da água analisados foram: temperatura, pH e oxigênio dissolvido (OD). Esses parâmetros foram aferidos duas vezes ao dia. Os dados de cada grupo estão descritos individualmente e, posteriormente, o comparativo entre eles é apresentado.

Grupo GC1 (Pb 0,46 mg/L)

Durante as 96 horas de experimento, a temperatura teve mínima e máxima de 24,9 e 26,4 °C, respectivamente. O pH se manteve no intervalo de 6,39 a 7,48 com tendência a alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O OD variou entre 3,55 e 8,8 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo Pb 0,46 mg/L foi representado na tabela 7.

Grupo GC2 (Pb 1,02 mg/L)

Durante as 96 horas de experimento, a temperatura teve mínima e máxima de 25,3 e 26,55 °C., respectivamente. A temperatura permaneceu entre 25 e 26 C°. O pH esteve entre 6,1 e 6,94 com tendência a alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O OD variou entre 3,55 e 7,85 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo Pb 1,02 mg/L foi representado na tabela 7.

Grupo GC3 (Pb 2,24 mg/L)

Durante as 96 horas de experimento, a temperatura teve mínima e máxima de 25,3 e 26,7 °C, respectivamente. O pH se manteve no intervalo de 6,2 a 6,93 com tendência a alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O OD variou entre 3,3 e 7,15 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo Pb 2,24 mg/L foi representado na tabela 7.

Grupo GC4 (Pb 4,92 mg/L)

Durante as 96 horas de experimento, a temperatura teve mínima e máxima de 25,4 e 26,7 °C, respectivamente. O pH se manteve no intervalo de 6,2 a 6,9 com tendência a alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O OD variou entre 3,45 e 7 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo Pb 4,92 mg/L foi representado na tabela 7.

Grupo Controle

Durante o experimento, a temperatura teve mínima e máxima de 25,0 e 26,7 °C. O pH variou de 6,26 a 7,5 com a tendência de alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O oxigênio dissolvido (OD) variou de entre 3,5 e 8,9 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo controle foi representado na tabela 7.

Tabela 7. Tabela com os parâmetros de água do ensaio de toxicidade aguda de chumbo

TEMPERATURA		
GRUPO	Média	Desvio padrão
GC1 (Pb 0,46 mg/L)	25,6	0,62
GC2 (Pb 1,02 mg/L)	25,6	0,57
GC3 (Pb 2,24 mg/L)	25,6	0,65
GC4 (Pb 4,92 mg/L)	25,8	0,65
GCC (Controle)	25,6	0,62
pH		
GC1 (Pb 0,46 mg/L)	6,8	0,35
GC2 (Pb 1,02 mg/L)	6,6	0,27
GC3 (Pb 2,24 mg/L)	6,8	0,2
GC4 (Pb 4,92 mg/L)	6,5	0,26
GCC (Controle)	6,8	0,37
Oxigênio dissolvido		
GC1 (Pb 0,46 mg/L)	4,92	1,6
GC2 (Pb 1,02 mg/L)	4,70	1,35
GC3 (Pb 2,24 mg/L)	4,67	1,12
GC4 (Pb 4,92 mg/L)	4,69	1,13
GCC (Controle)	4,86	1,61

4.2.6. Comparativo de parâmetros de água ente grupos:

Os parâmetros de água estiveram, em sua maior parte, dentro do protocolo estabelecido pela OCDE. Isso mostra que a metodologia utilizada foi eficaz em evitar que outros fatores, além do tratamento experimental, interferissem nos resultados. O pH permaneceu entre 6,0 e 7,5; a temperatura variou entre 25 e 27 °C e o OD variou entre 3,3 mg/L e 9,0. As variações dos parâmetros foram muito semelhantes entre os grupos, de maneira que o chumbo não interferiu nos parâmetros, quando comparados com o controle. Em alguns momentos, o OD esteve em valores abaixo dos recomendados na OCDE. (2019). Isso se deve ao fato de a solução não receber aeração suplementar durante o período experimental. Entretanto, a redução de OD nos grupos experimentais foi semelhante ao grupo controle, o que demonstra que os sinais clínicos de hipóxia estiveram exclusivamente relacionados ao tratamento experimental, afinal os peixes do grupo controle, mesmo com o OD baixo, não apresentaram nenhum tipo de sinal clínico, mortalidade ou lesão histopatológica. Outro fator reforça esse fato, é que os momentos em que ocorreram a maior parte das mortes e picos de sinais clínicos não eram os períodos em que o OD esteve com seus menores valores, atribuindo-se então a responsabilidade exclusiva ao tempo de exposição ao metal. A comparação dos parâmetros entre grupos está representada pela figura 22.

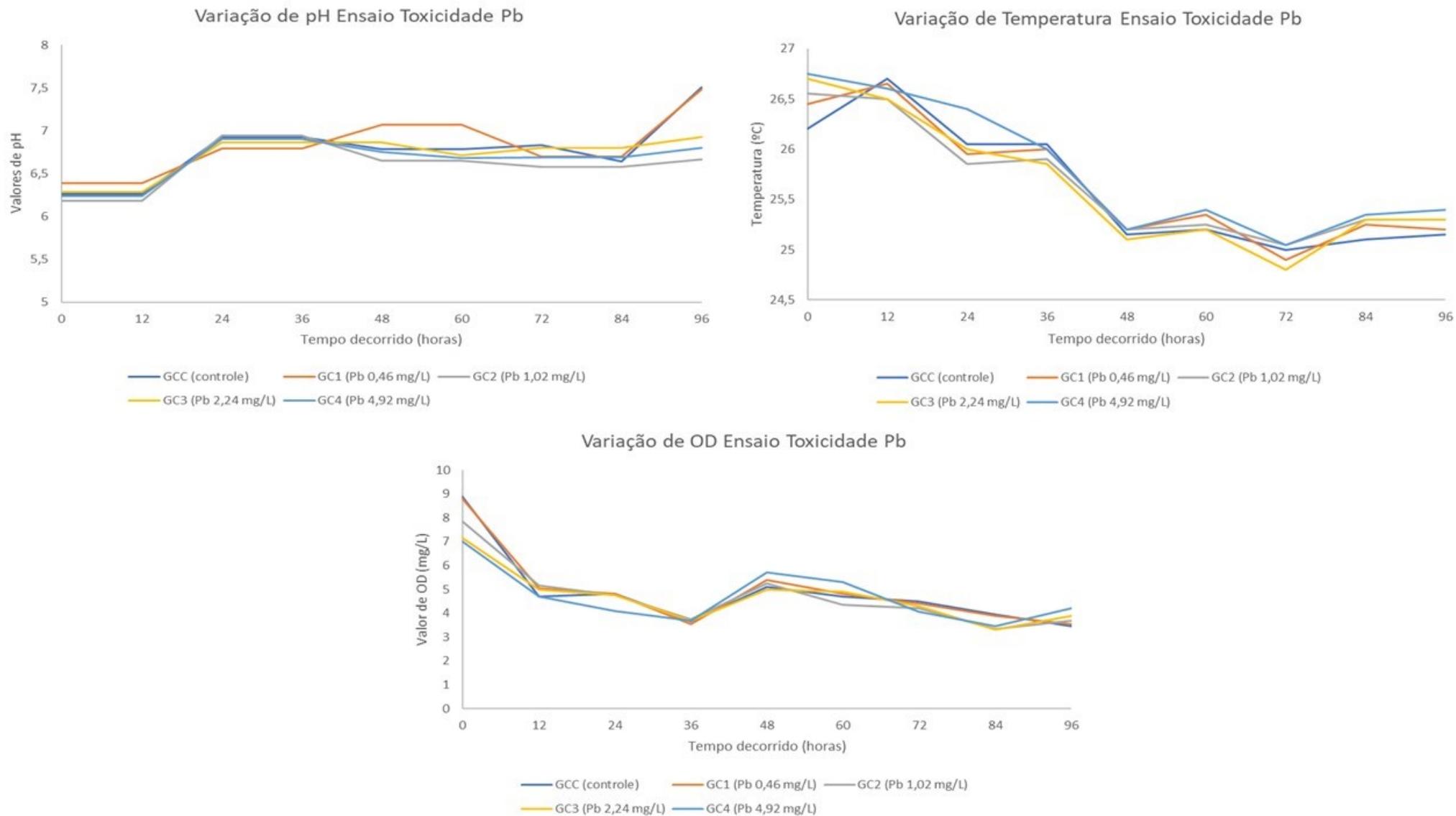


Figura 22. Comparativo dos parâmetros de água entre grupos do ensaio de toxicidade aguda chumbo

4.3. ENSAIO SEMIESTÁTICO DE TOXICIDADE AGUDA COM FERRO

4.3.1. Avaliação de sinais clínicos por grupo experimental

Grupo GF1 (Fe 2,66 mg/L)

A mortalidade chegou a 100% (12/12 peixes) em 56h. As mortes dos peixes ocorreram nos seguintes intervalos: um entre 4h e 8h, um entre 8h e 12h, um entre 12h e 16h, três entre 20h e 24h, dois entre 24h e 28h, dois entre 32h e 36h e, por fim, dois peixes entre 52h e 56h de experimentação (fig. 26). Os sinais clínicos mais frequentes foram a hipoatividade, a distribuição anormal no fundo, o comportamento de rebaixamento, a sub-reatividade, a distribuição anormal na superfície e as alterações de funções ventilatórias.

Hipoatividade foi observada em 100% dos peixes desde as primeiras 4h até às 52h de experimentação. Comportamento anormal no fundo e comportamento de rebaixamento foram registrados entre 50 e 100% dos peixes, desde as primeiras 4h até às 56h, quando a mortalidade atingiu 100%. A sub-reatividade foi constatada entre 44,4 e 100% dos peixes no intervalo das primeiras 4h até às 44h. Distribuição irregular na superfície foi observada 50 e 77,8% dos peixes desde as primeiras 4h até às 24h de experimentação (fig. 27). As anormalidades de função respiratória, que incluíam hiperventilação, ventilação irregular e peixes boqueando, foram observadas entre 44,4 e 77,8% dos peixes e verificadas das primeiras 4h às 20h. A proporção de acometimento de cada sinal clínico variou de acordo com o horário e número de mortalidades. O detalhamento da distribuição dos sinais clínicos observados no grupo Fe 2,66 mg/L encontra-se na figura 23.

Grupo GF2 (Fe 5,86 mg/L)

A mortalidade nesse grupo chegou a 100% (12/12 peixes) em 36h de experimentação. As mortes dos peixes ocorreram nos seguintes intervalos: um entre 12h e 16h, dois entre 16h e 20h, cinco entre 20h e 24h, um entre 24h e 28h e os últimos três entre 32h e 36h de experimentação (fig. 26). Os sinais clínicos mais observados foram hipoatividade, sub-reatividade, distribuição anormal no fundo, comportamento de rebaixamento seguidos por distribuição anormal na superfície e distúrbios ventilatórios.

Hipoatividade foi encontrada em 100% dos peixes desde as primeiras 4h até às 32h de experimentação, quando a mortalidade atingiu 100%. Comportamento anormal no fundo e comportamento de rebaixamento foram registrados entre 44,4 e 63,3% dos peixes, desde as primeiras 4h até às 32h. A sub-reatividade foi constatada entre 55,6 e 100% dos peixes no intervalo das primeiras 4h até às 32h. Distribuição irregular na superfície esteve entre 25 e 55,6% dos peixes, sendo observada desde as primeiras 4h até às 32h de experimentação. As anormalidades de função respiratória, que incluíam hiperventilação e ventilação irregular, foram observadas entre 33,3 e 75% dos peixes e verificadas das primeiras 4h às 32h. O número de peixes boqueando variou entre 11,1 e 45% e foi observada desde às 4h primeiras horas até às 12h. A proporção de acometimento de cada sinal clínico variou de acordo com o

horário e número de mortalidades. O detalhamento da distribuição dos sinais clínicos observados no grupo Fe 5,86 mg/L encontra-se na figura 23.

Grupo GF3 (Fe 12,88 mg/L)

A mortalidade nesse grupo experimental chegou a 100% (12/12 peixes) em 56h de experimentação. As mortes dos peixes ocorreram nos seguintes intervalos: um entre 20 e 24h, um entre 32h e 36h, dois das 44h às 48h, quatro entre 48h e 52h e os últimos quatro peixes entre 52h e 56h (fig. 26). Os sinais clínicos mais observados foram hipoatividade, sub-reatividade, distribuição anormal na superfície, alterações de funções ventilatórias, distribuição anormal no fundo e comportamento de rebaixamento.

Hipoatividade foi encontrada entre 50 e 100% dos peixes desde as primeiras 4 até às 52h de experimentação, quando a mortalidade atingiu 100%. Comportamento anormal no fundo e comportamento de rebaixamento foram registrados entre 33,3 e 36,4% dos peixes, desde as primeiras 4h até às 24h. A sub-reatividade foi constatada entre 87,3 e 100% dos peixes no intervalo das primeiras 4h até às 48h. Distribuição irregular na superfície esteve entre 50 e 100% dos peixes, sendo observada desde as primeiras 4h até às 52h de experimentação (fig. 27). As anormalidades de função respiratória, que incluíam hiperventilação, ventilação irregular e peixes boqueando foram observadas entre 30 e 100% dos peixes e verificadas das primeiras 4h às 44h. A proporção de acometimento de cada sinal clínico variou de acordo com o horário e número de mortalidades. O detalhamento da distribuição dos sinais clínicos observados no grupo Fe 12,88 mg/L encontra-se na figura 23.

Grupo GF4 (Fe 28,34 mg/L)

A mortalidade alcançou 100% (12/12 peixes) em 56h. As mortes dos peixes ocorreram nos seguintes intervalos: dois entre 48h e 52h e dez no intervalo entre 52h e 56h de experimentação (fig. 26). Os sinais clínicos mais observados foram a hipoatividade, a sub-reatividade, a distribuição anormal na superfície, alterações de funções ventilatórias, distribuição anormal no fundo e comportamento de rebaixamento.

Hipoatividade foi encontrada entre 50 e 100% dos peixes desde as primeiras 4h até às 52h de experimentação, quando a mortalidade atingiu 100%. Comportamento anormal no fundo foi registrado em 8,3% dos peixes, desde as primeiras 4h até às 24h. O comportamento de rebaixamento não foi observado nesse grupo. A sub-reatividade foi constatada em 100% dos peixes no intervalo das primeiras 4h até às 52h. Distribuição irregular na superfície esteve entre 91,7 e 100% dos peixes, sendo observada desde as primeiras 4h até às 52h de experimentação. As anormalidades de função respiratória, que incluíam hiperventilação e ventilação irregular foram observadas entre 91,7 e 100% dos peixes e verificadas das primeiras 4h às 52h. A quantidade de animais engolindo/boqueando variou entre 75 e 100% nos intervalos entre 4h e 52h de experimentação. A proporção de acometimento de cada sinal clínico variou de acordo com o horário e número de mortalidades. O detalhamento da distribuição dos sinais clínicos observados no Fe 28,34 mg/L encontra-se na figura 23.

Grupo GFC (controle)

Não foram observados sinais clínicos ou mortalidades no grupo controle.

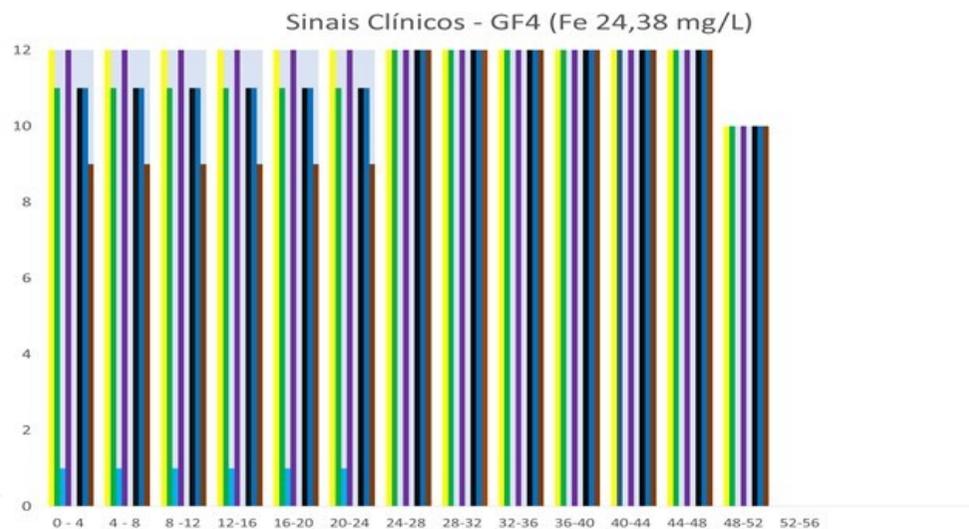
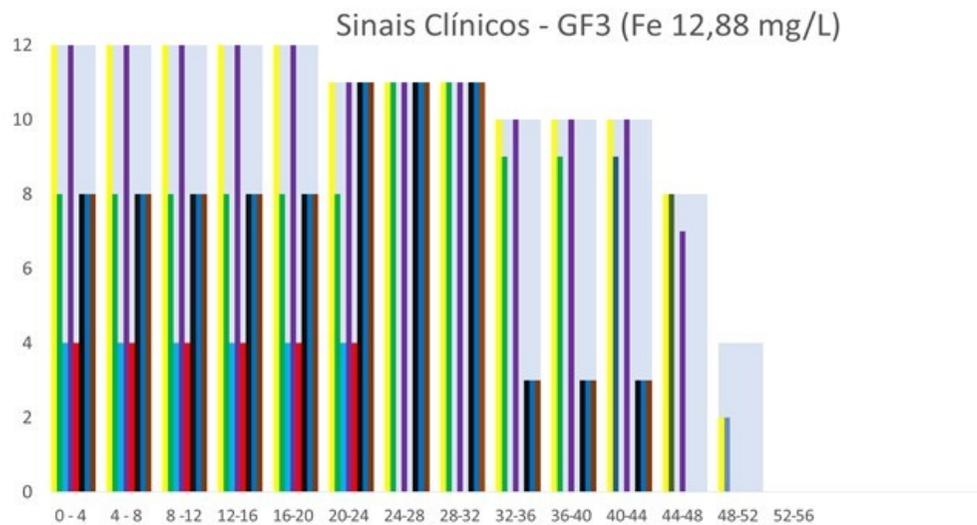
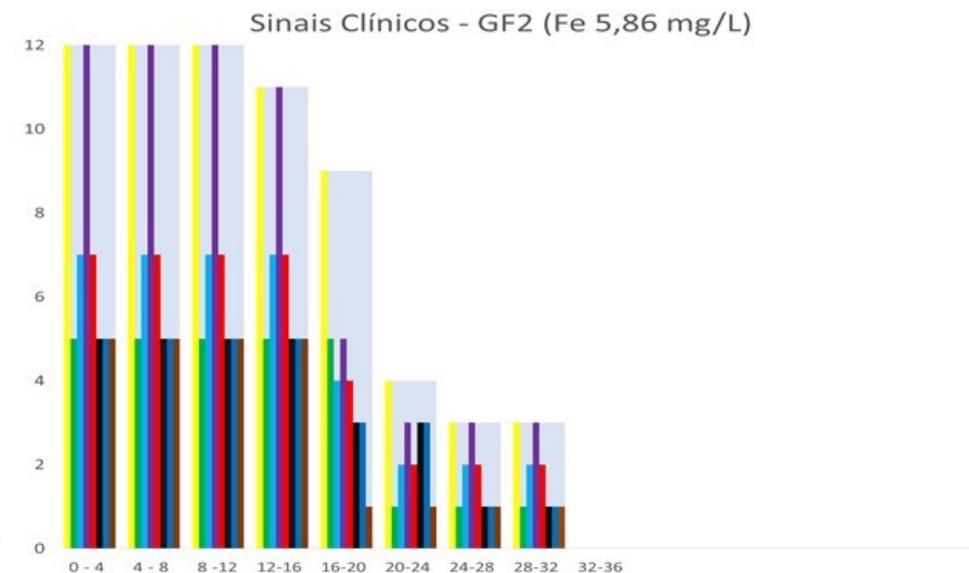
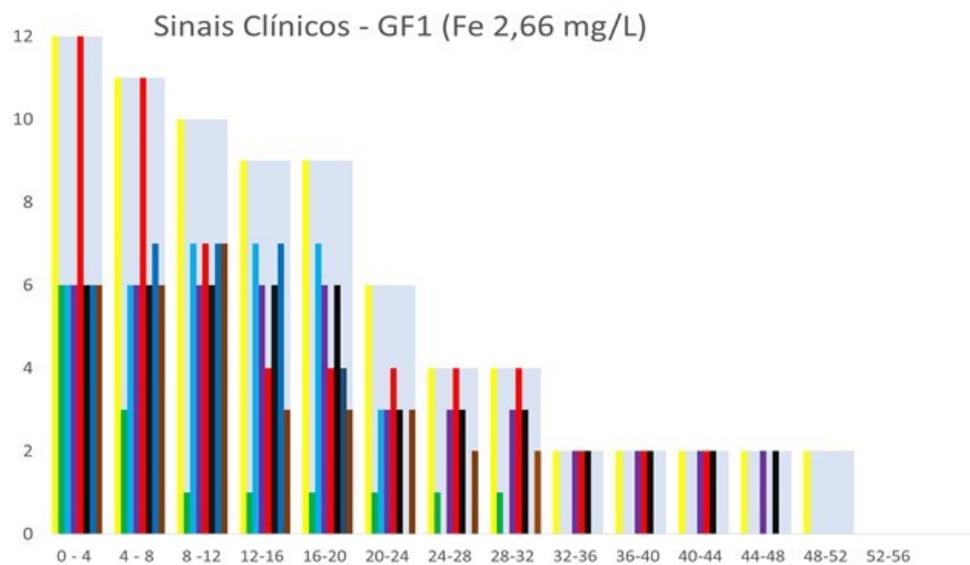


Figura 23. Conjunto de gráficos com a distribuição de sinais clínicos ao longo do ensaio de toxicidade aguda de ferro

4.3.2. Comparativo dos sinais clínicos entre grupos

A hipoatividade foi majoritária nos grupos expostos e acometeu todos os peixes desde o início do experimento até a mortalidade total de cada grupo. A hipoatividade foi o sinal clínico que mais acometeu os peixes nesse ensaio. Quando considerados os picos de observação desse sinal, a hipoatividade acometeu 100% dos peixes do grupo Fe 2,66 mg/L do início do experimento até 52h (mortalidade total) e 100% dos peixes do grupo Fe 5,86 mg/L do início do experimento até 32h (mortalidade total). No grupo Fe 12,88 mg/L, o sinal foi observado em 100% dos peixes das primeiras horas até 48h. No grupo Fe 28,34 mg/L foi observado acometimento de 100% dos peixes do início até 52h. O comparativo da porcentagem de hipoatividade entre grupos está demonstrado na figura 24.

A distribuição anormal na superfície frequente era acompanhada de anormalidades ventilatórias, com progressão para a morte do animal. A distribuição anormal na superfície foi observada em até 77,8% (7/9) dos peixes no grupo Fe 2,66 mg/L e em até 55,6% dos peixes, das 16h até 20h, no grupo Fe 5,86 mg/L. No grupo Fe 12,88 mg/L foi observada em 100% dos peixes entre 24h e 32h (11/11) e das 44h até 48h (8/8). No grupo Fe 28,34 mg/L chegou a 100% dos peixes das 24h às 52h. O comparativo da porcentagem de distribuição anormal entre grupos está demonstrado na figura 24.

A sub-reatividade a estímulos foi variável entre os grupos, mas nos grupos Fe 12,88 mg/L e Fe 28,34 mg/L foi semelhante à hipoatividade e acometeu 100% dos peixes até a mortalidade total. No grupo Fe 2,66 mg/L, o pico de observação chegou a 100% dos peixes das 24h às 44h. No grupo Fe 5,86 mg/L, houve sub-reatividade em 100% dos animais do início do experimento até as 16h e depois das 24h até 32h. No grupo Fe 12,88 mg/L, houve sub-reatividade em 100% dos peixes do início até as 44h de experimentação. No grupo Fe 28,34 mg/L o sinal clínico foi observado em 100% dos peixes nas primeiras horas até as 52h. O comparativo da porcentagem de sub-reatividade entre grupos está demonstrado na figura 24.

A hiperventilação e a ventilação irregular eram os sinais clínicos que, geralmente, precediam a morte dos animais e estavam fortemente associados à distribuição irregular na superfície. Essas anormalidades de função ventilatória, no grupo Fe 2,66 mg/L chegou a 77,8% das 12h até 16h. No grupo Fe 5,86 mg/L houve alterações ventilatórias em 75% dos peixes das 20h até 24h. O sinal foi observado em 100% dos peixes no grupo Fe 12,88 mg/L, de 20h até 32h e em 100% dos peixes no grupo Fe 28,34 mg/L das 24 até 52h. O número de animais engolindo (boqueando) foi idêntico das outras anormalidades respiratórias, com exceção do grupo Fe 2,66 mg/L que apresentou 50% dos peixes boqueando das 24h até as 32h. O comparativo da porcentagem das anormalidades respiratórias está demonstrado na figura 25.

A distribuição anormal no fundo foi observada em alguns animais e estava associada ao comportamento de rebaixamento, pois esses animais alocados no fundo do aquário perdiam a organização coletiva de cardume. No grupo Fe 2,66 mg/L, esses sinais acometeram 100% dos peixes de 32h até 48h. No grupo Fe 5,86 mg/L a observação desses sinais chegou a 66,7% de

24h até 32h. No grupo Fe 12,88 mg/L, esses sinais foram observados em 36,4% dos peixes das 20h até às 24h. No grupo Fe 28,34 mg/L esse sinal só atingiu 8,3 % do início até as 24h. O comparativo da porcentagem de distribuição anormal no fundo entre grupos está demonstrado na figura 25.

O nível de mortalidade chegou a 100% em todos os grupos tratados. A diferença entre grupos esteve relacionada ao período de início das mortes e o tempo até a mortalidade total. No grupo Fe 2,66 mg/L, as mortes começaram a partir das 4 primeiras horas e a mortalidade total ocorreu com 56h. No grupo Fe 5,86 mg/L, as mortes começaram a partir das 20 horas e a mortalidade total ocorreu entre as 32h e 36h. No grupo Fe 12,88 mg/L, as mortes começaram a partir das 20h e a mortalidade total aconteceu entre 52h e 56h. No Fe 28,34 mg/L, a mortalidade começou a partir de 48 horas e a mortalidade total aconteceu entre 52h e 56h. Portanto os grupos Fe 2,66 mg/L; Fe 12,88 mg/L e Fe 28,34 mg/L tiveram sua mortalidade total no mesmo período, mas o horário de início das mortes foi diferente. Não foi possível calcular as concentrações letais do experimento com ferro, pois todas as concentrações atingiram mortalidade total em momentos semelhantes. O comparativo da mortalidade entre grupos está demonstrado na figura 26.

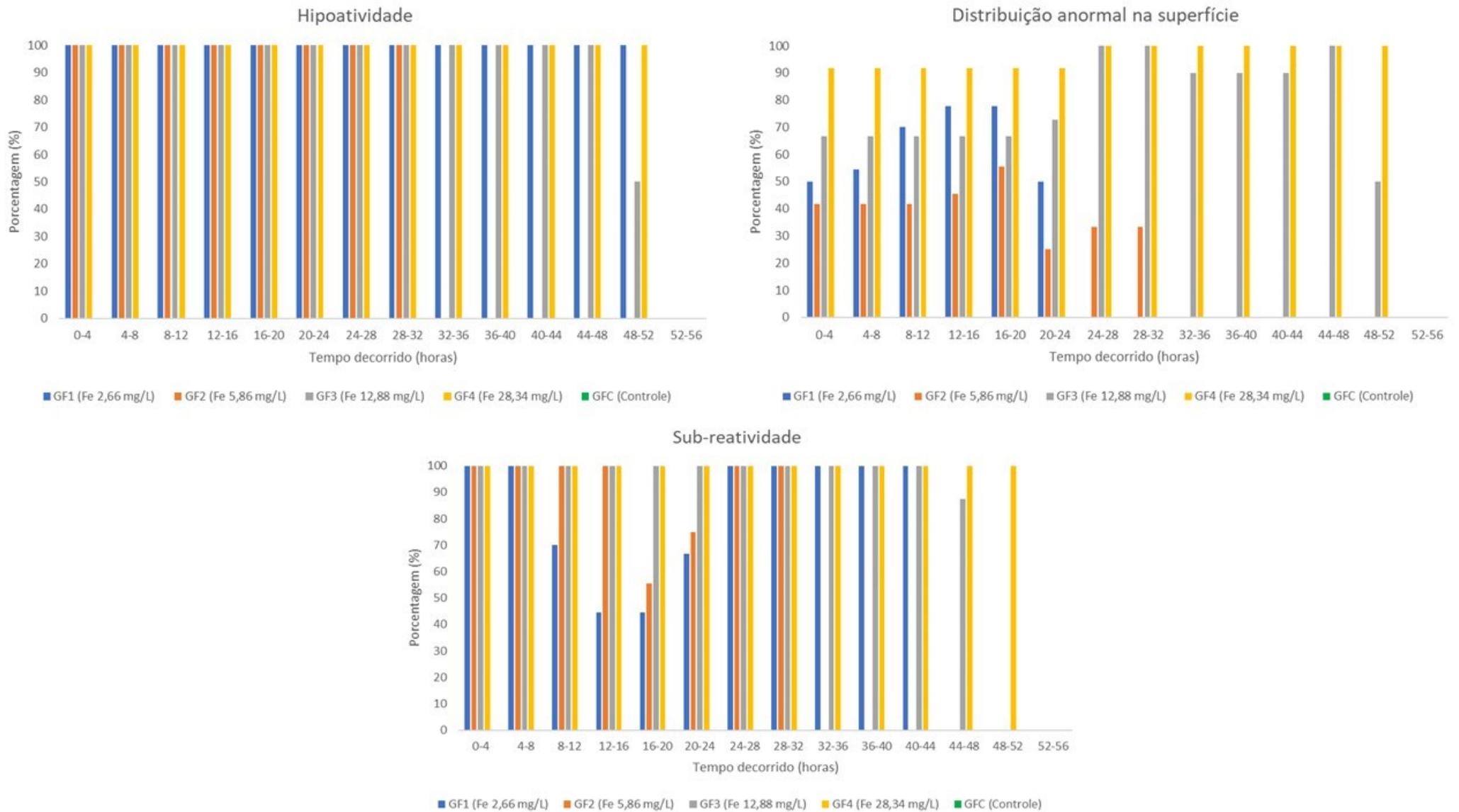
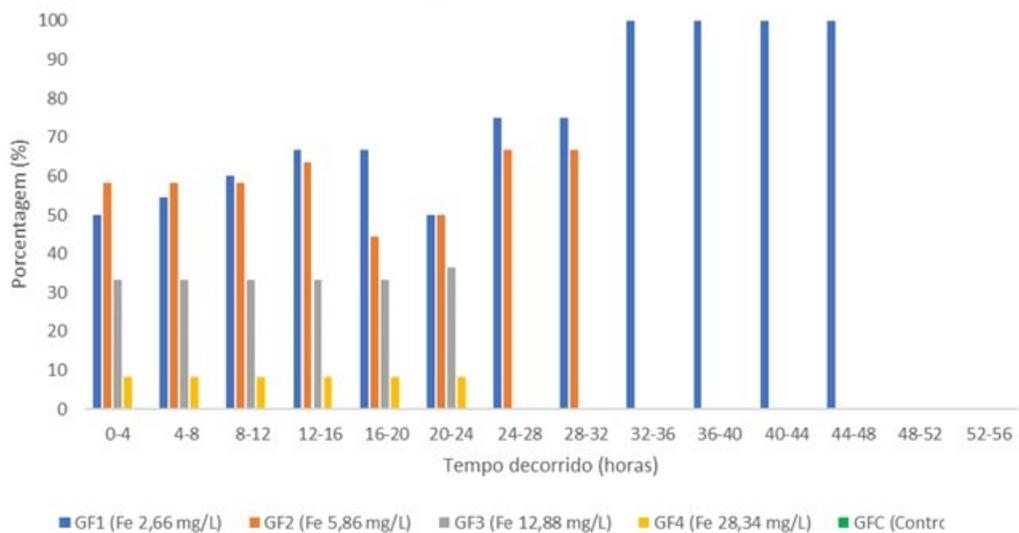


Figura 24. Comparativo dos sinais clínicos entre grupos do ensaio de toxicidade aguda de ferro

Distribuição anormal no fundo



Hiperventilação/ Ventilação irregular/ Anímias engolindo

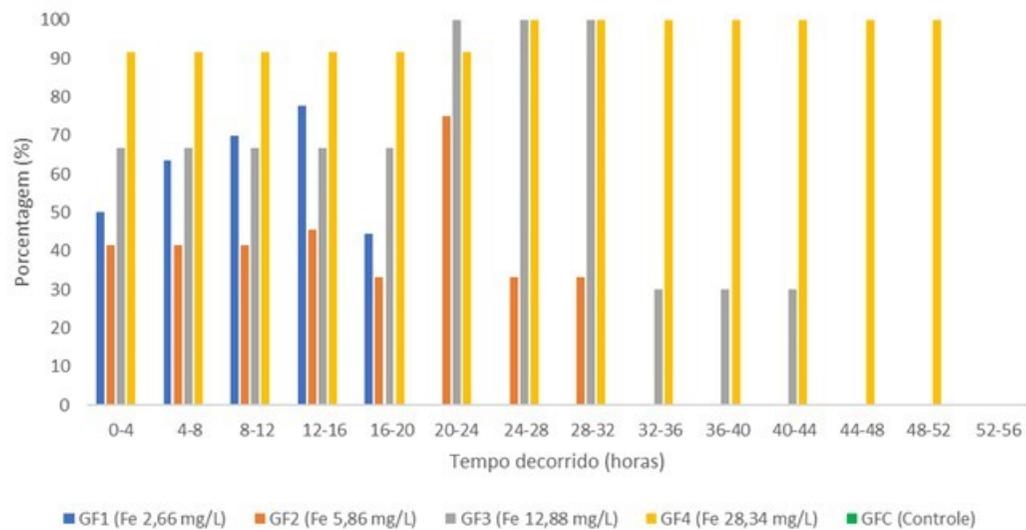


Figura 25. Comparativo entre sinais clínicos e mortalidade do ensaio de toxicidade aguda de ferro

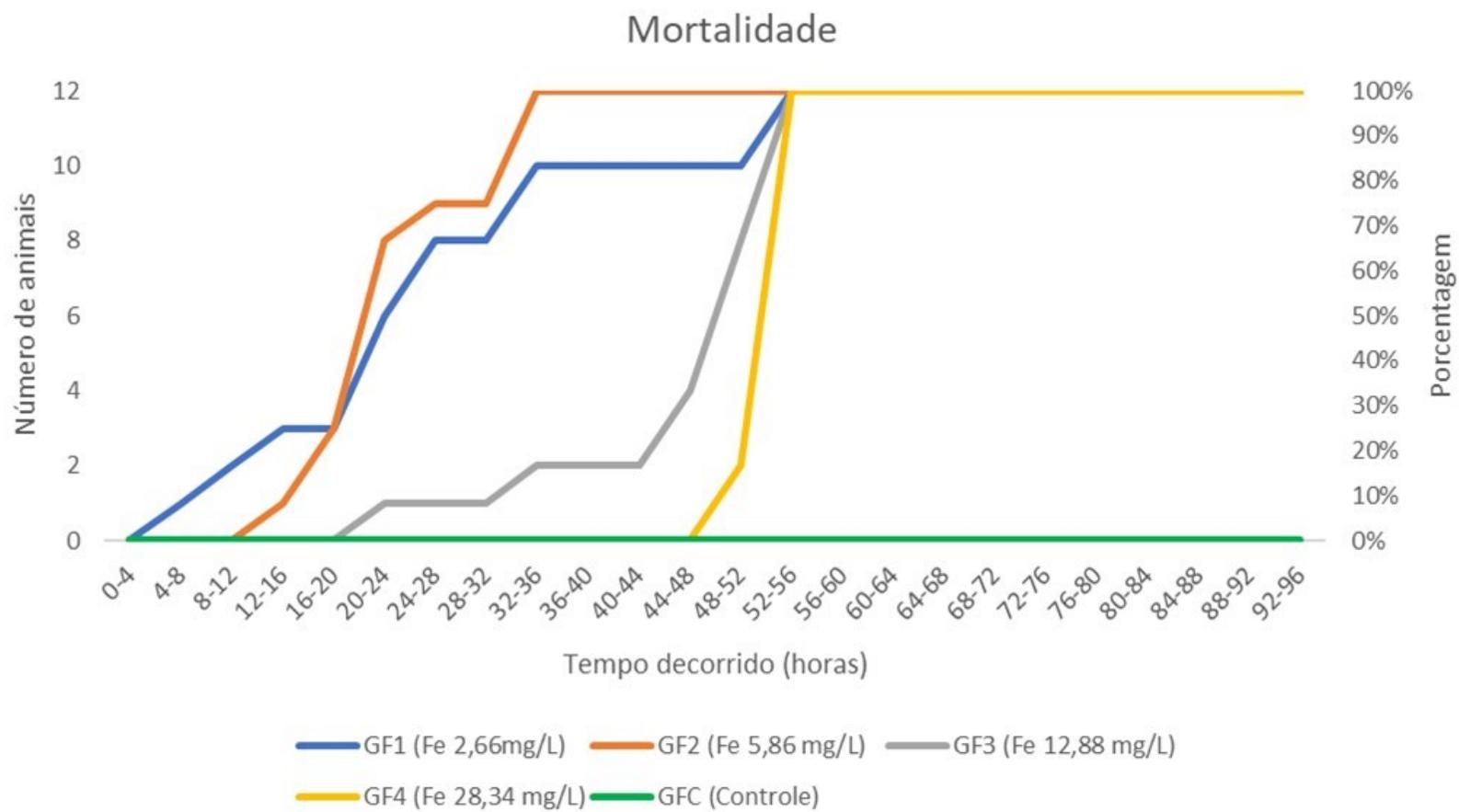


Figura 26. Mortalidade do ensaio de toxicidade com ferro

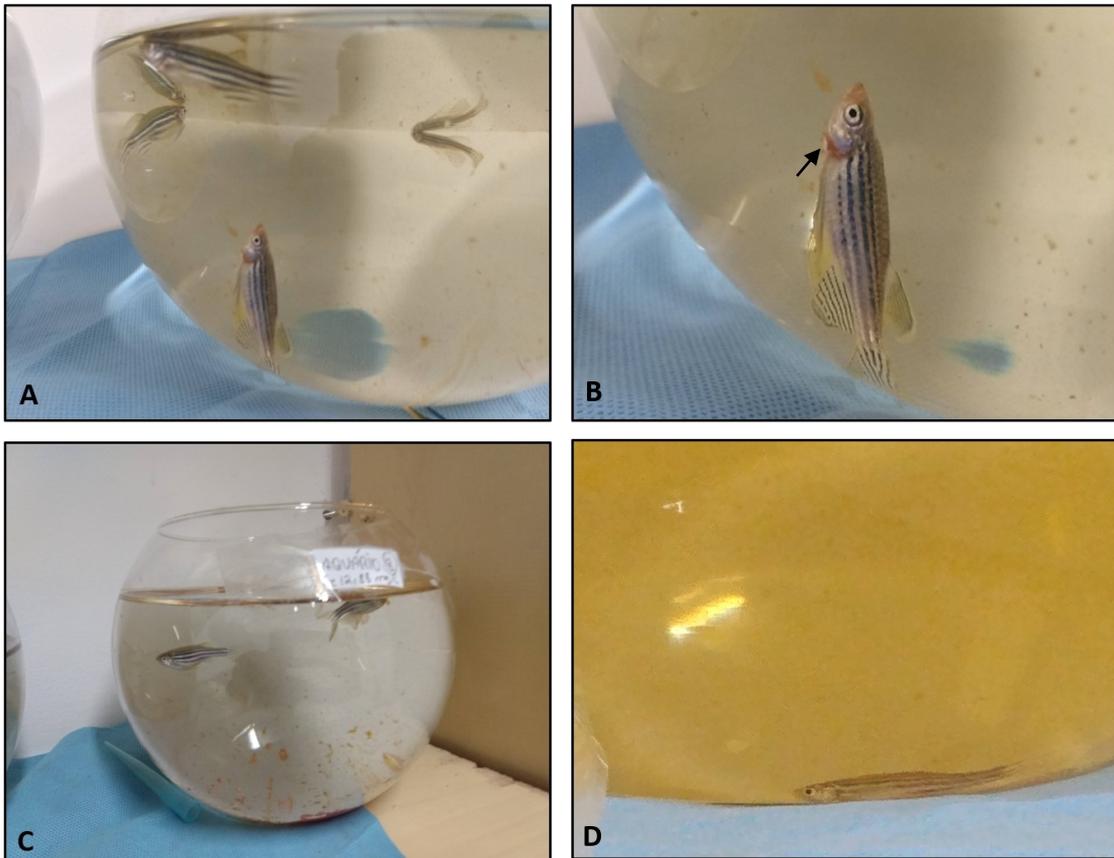


Figura 27. Demonstração de sinais clínicos e mortalidade no ensaio de toxicidade aguda com ferro. A) Peixes do grupo Fe 2,66 mg/L com distribuição anormal na superfície. Há um peixe morto boiando no centro do aquário. B) Aumento da figura A demonstrando o peixe morto espontaneamente com precipitados de ferro aderidos ao corpo (seta). C) Peixes do grupo Fe 12,88 mg/L com distribuição anormal na superfície. D) Peixe do grupo Fe 5,86 mg/L com distribuição anormal no fundo.

4.3.3. Alterações patológicas

Observou-se alterações anatomopatológicas devido ao tratamento experimental nos diferentes grupos. Quanto as alterações macroscópicas, observou-se o acúmulo de material alaranjado na superfície das brânquias e da pele de alguns peixes dos grupos experimental, correspondente aos precipitados de ferro presentes na água (fig. 28 e 29).

Nos grupos experimentais, todos os peixes morreram naturalmente e houve lesões histológicas nas brânquias, cavidade oral, estômago e intestinos. Nas brânquias, a avaliação histológica permitiu definir um padrão de lesão caracterizada por desorganização das lamelas secundárias frequentemente associada à desprendimento, perda do epitélio de revestimento das lamelas secundárias e acúmulo de restos celulares desprendidos nos espaços interlamelares (fig. 30, 33, 34 e 35). Os restos celulares estavam entremeados por material amarronzado granular que se corava de azul pela reação de Azul da Prússia, sendo interpretados como precipitados de ferro (fig. 31, 33, 36, 37, 38 e 39). Os restos celulares com os precipitados de ferro eram comumente encontrados nos espaços interlamelares (fig. 31, 33, 36 e 37) e no lúmen da cavidade oral (fig. 33), mas em alguns peixes foram encontrados no lúmen do estômago (fig. 38) e dos intestinos (fig. 39). Ocasionalmente, os precipitados encontrados nas brânquias estavam intimamente aderidos a superfície das lamelas secundárias (fig. 36 e 37). No grupo controle não havia alterações histológicas com brânquias e pele com adequada apresentação morfológica (fig. 40 e 41). Foram encontrados alguns artefatos, comumente descritos como lesões, como a vacuolização de células de revestimento dos túbulos renais, vacuolização do citoplasma de hepatócitos e excesso de basofilia do citoplasma de hepatócitos em fêmeas com produção de proteína vitelogenética.



Figura 28. Macroscopia do peixe do grupo Fe 28,34 mg/L. Precipitados de ferro na superfície do corpo que conferem ao muco cor alaranjada.

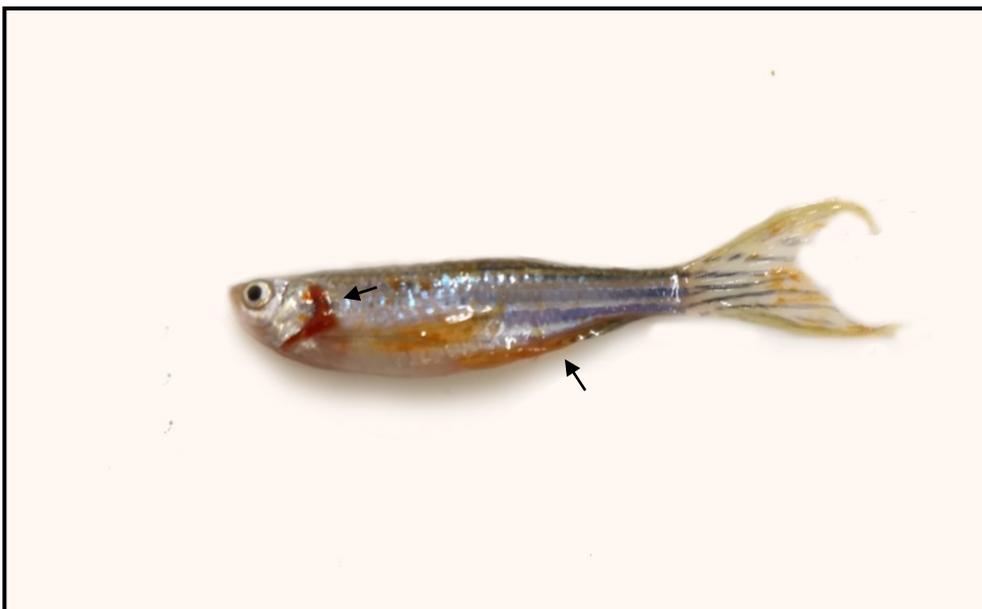


Figura 29. Macroscopia do peixe do grupo Fe 2,66 mg/L. Precipitados de ferro grumosos de cor alaranjada na superfície da pele, ao redor do opérculo e no muco das brânquias (setas).

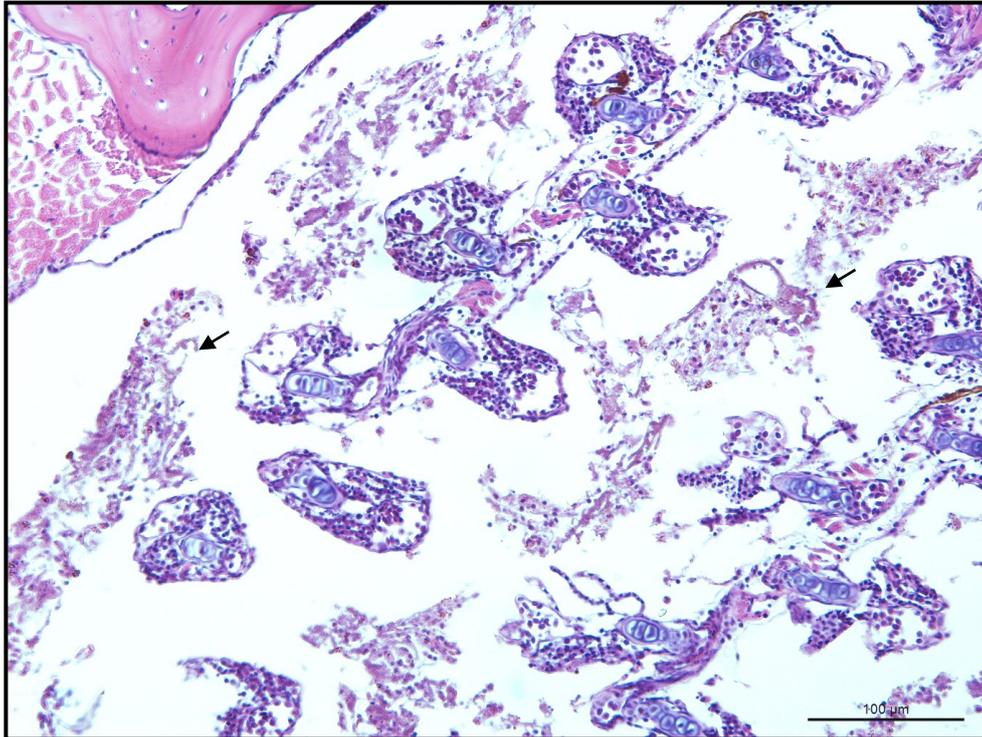


Figura 30. Histologia do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Brânquias. Desorganização lamelar com desprendimento das lamelas e acúmulo acentuado de restos celulares e precipitados nos espaços interlamelares (setas) (H.E., 200x).

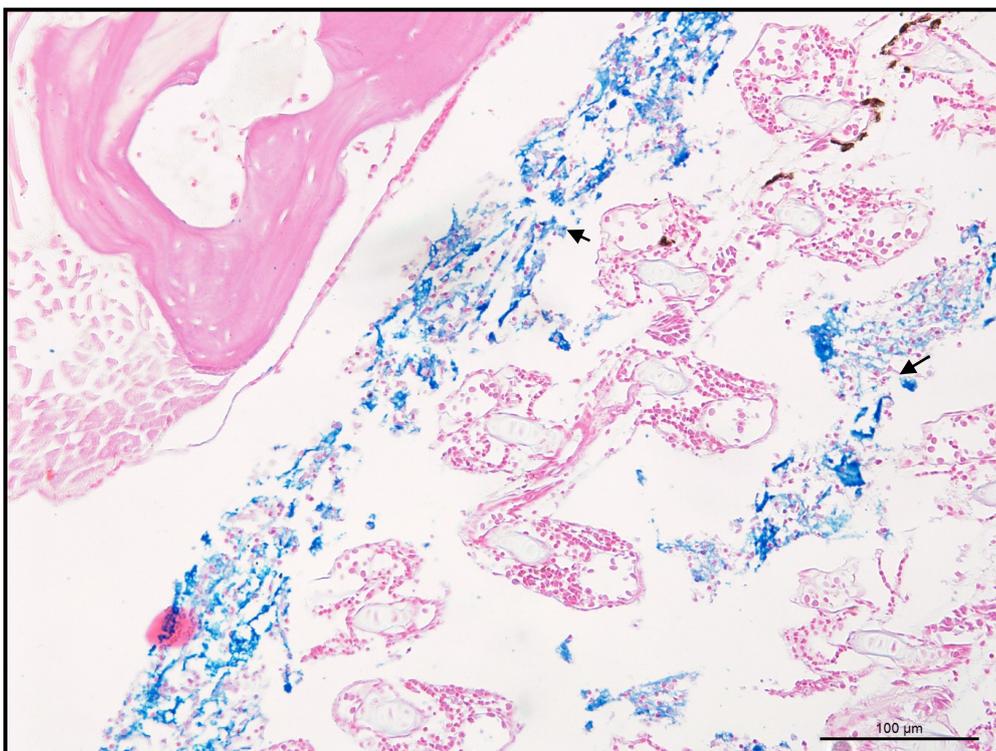


Figura 31. Histoquímica especial do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Brânquias. Coloração especial da figura 28, com evidenciação de quantidade acentuada de precipitados de ferro corados de azul (setas), em meio aos restos celulares (Azul da Prússia, 200x)

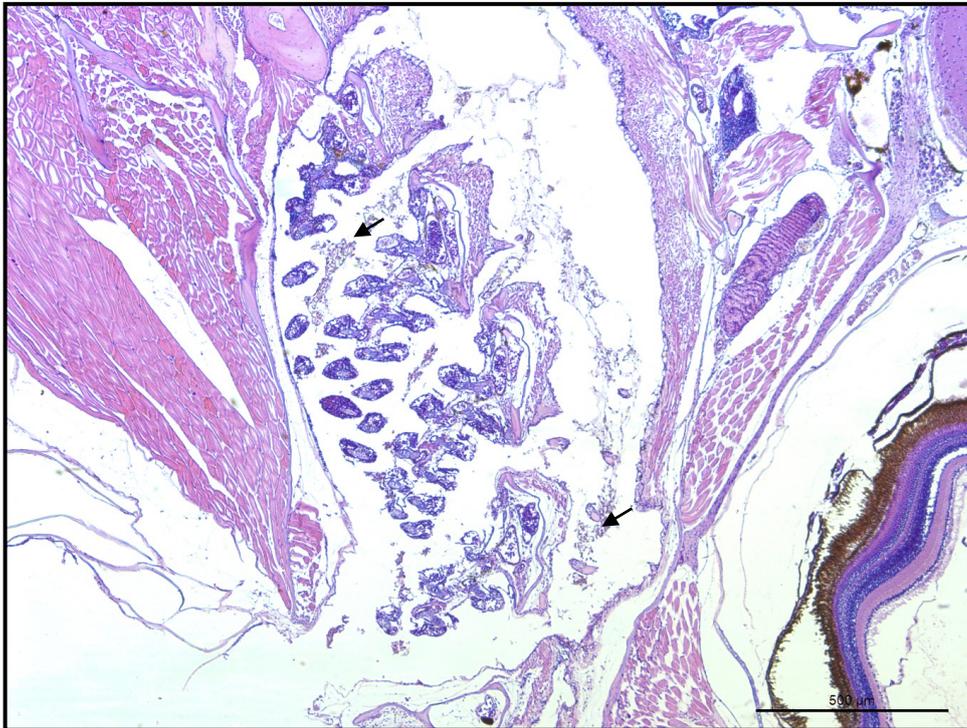


Figura 32. Histopatologia do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Cavidade oral e brânquias- Cavidade oral com acentuada quantidade de restos celulares e precipitados de ferro (H.E, 50x)

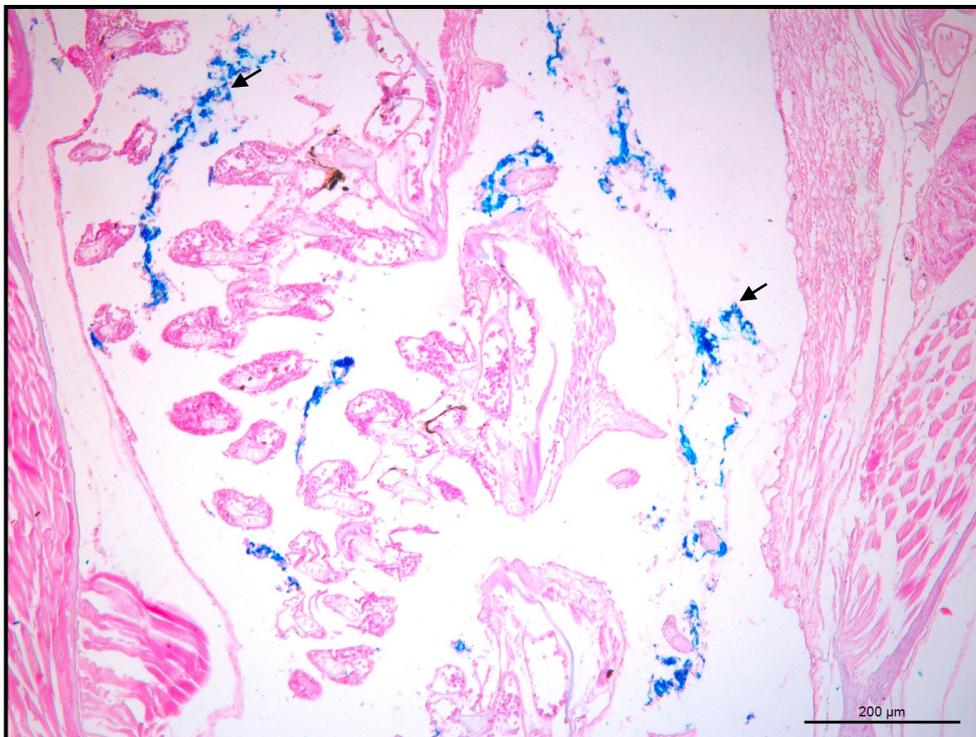


Figura 33. Histoquímica especial do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Cavidade oral e brânquias. Cavidade oral e espaços interlamelares com quantidade acentuada de precipitados de ferro corados em azul (setas) (Azul da prússia, 100x).

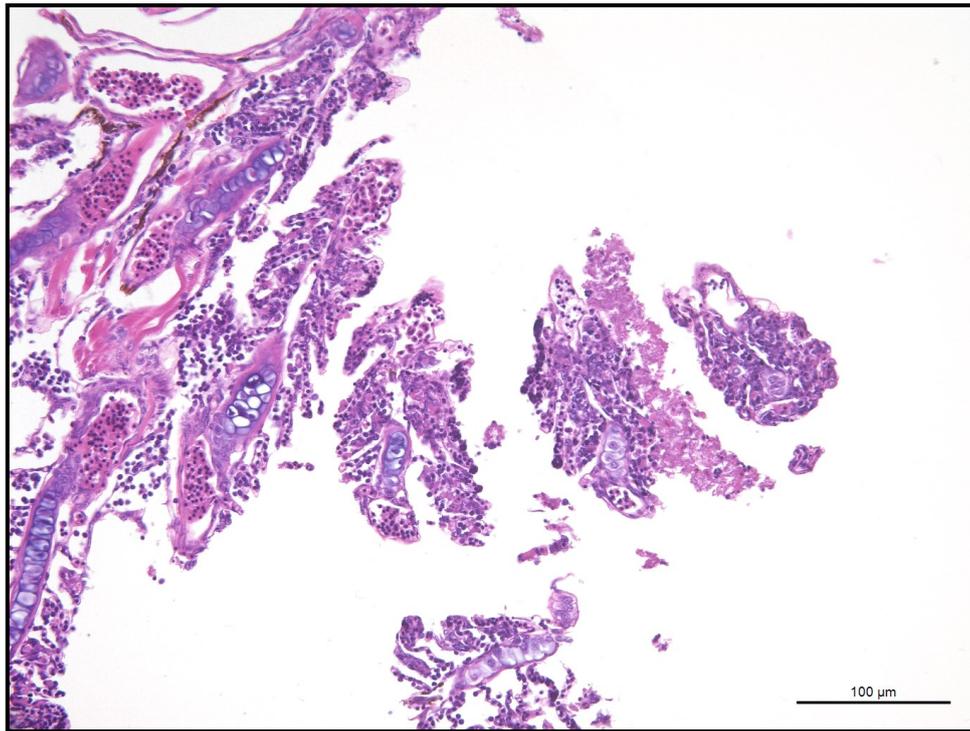


Figura 34. Histopatologia do peixe 3.1. Grupo Fe 2,66 mg/L. Brânquias. Desorganização lamelar moderada e área focal discreta de acúmulo de restos celulares no espaço interlamelar (H.E, 200x).

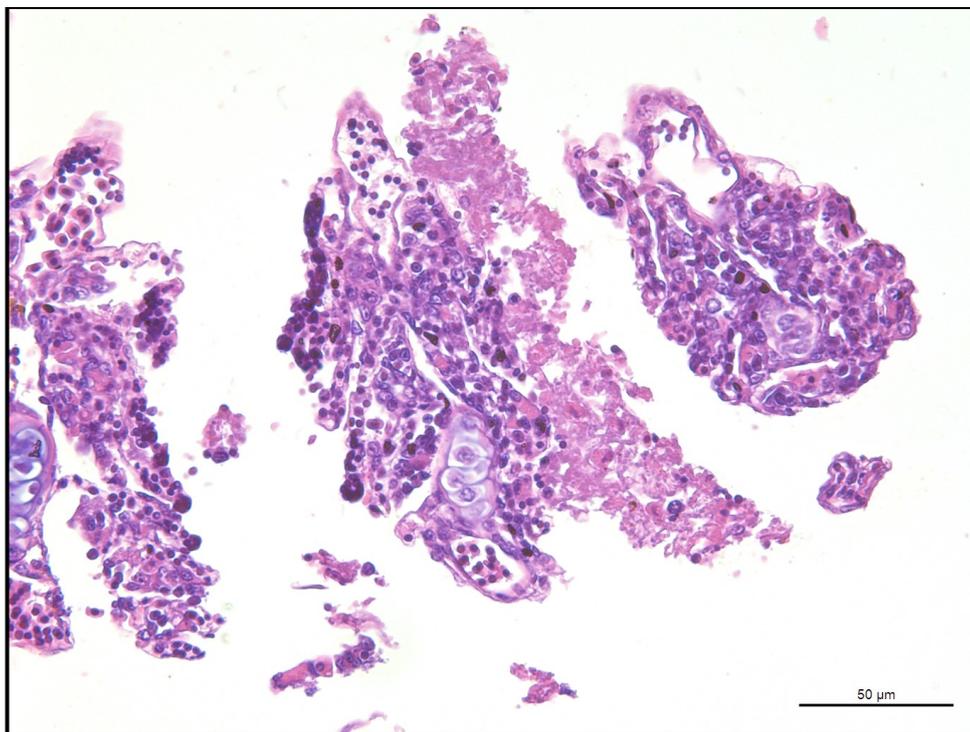


Figura 35. Histopatologia do peixe 3.1. Grupo Fe 2,66 mg/L. Brânquias. Desorganização lamelar moderada e área focal discreta de acúmulo de restos celulares no espaço interlamelar (H.E, 400x).

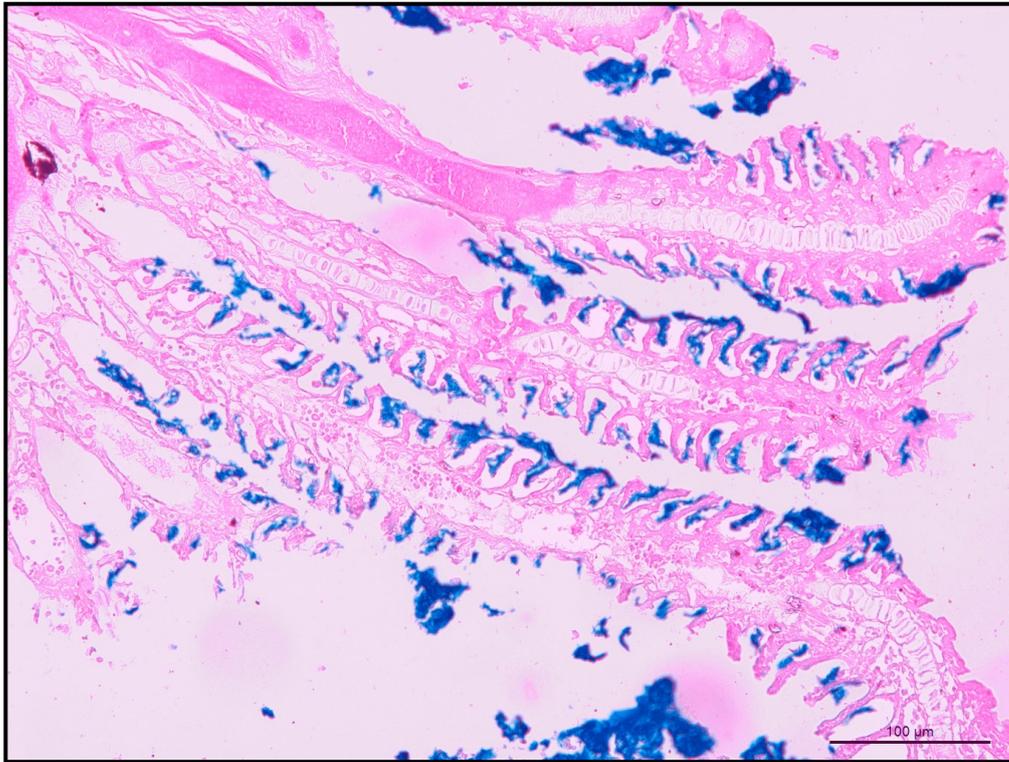


Figura 36. Histoquímica especial do peixe 10.1. Grupo Fe 28,34 mg/L. Brânquias. Coloração especial evidenciando precipitados de ferro intimamente depositados na superfície das lamelas secundárias (cor azul) (Azul da Prússia, 200x).

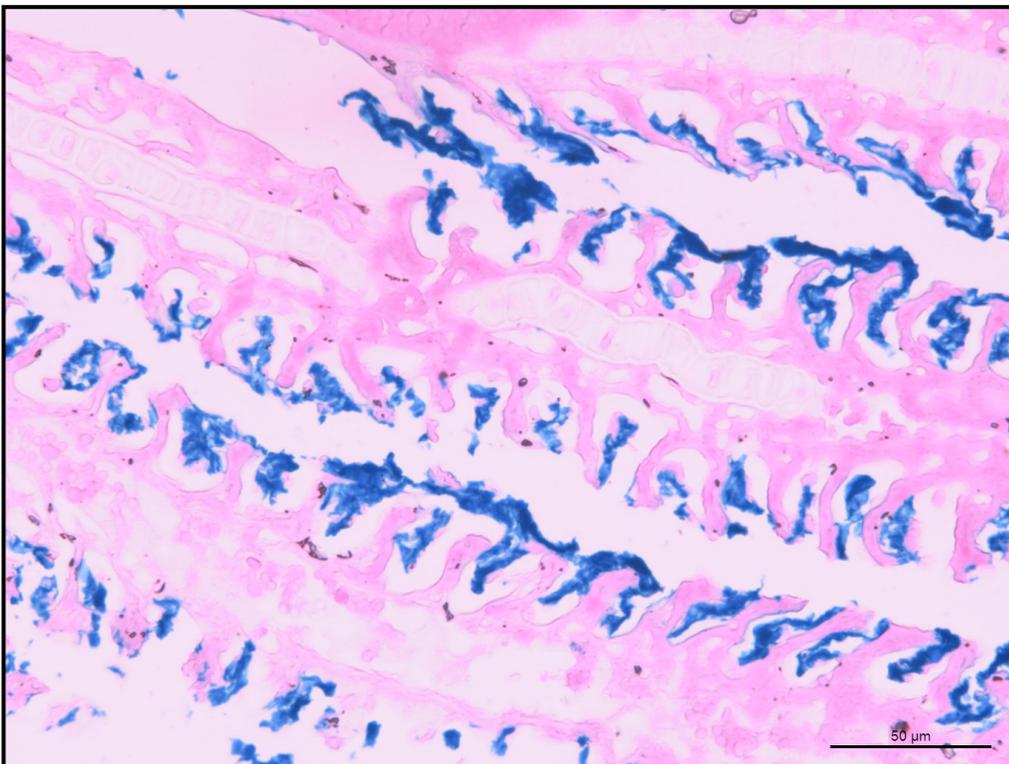


Figura 37. Histoquímica especial do peixe 10.1. Grupo Fe 28,34 mg/L. Brânquias. Coloração especial evidenciando precipitados ferro de intimamente depositados na superfície das lamelas secundárias (cor azul) (Azul da Prússia, 400x).

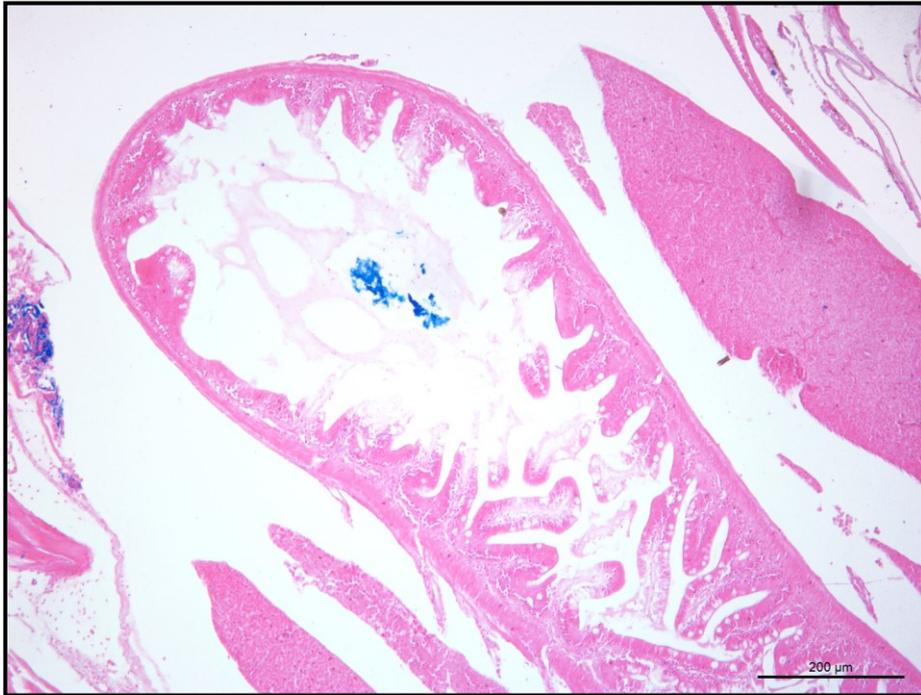


Figura 38. Histoquímica especial do peixe 9.5. Grupo Fe 28,34 mg/L. Intestino. Precipitados de ferro corados no lúmen intestinal corados em azul (Azul da Prússia, 100x).

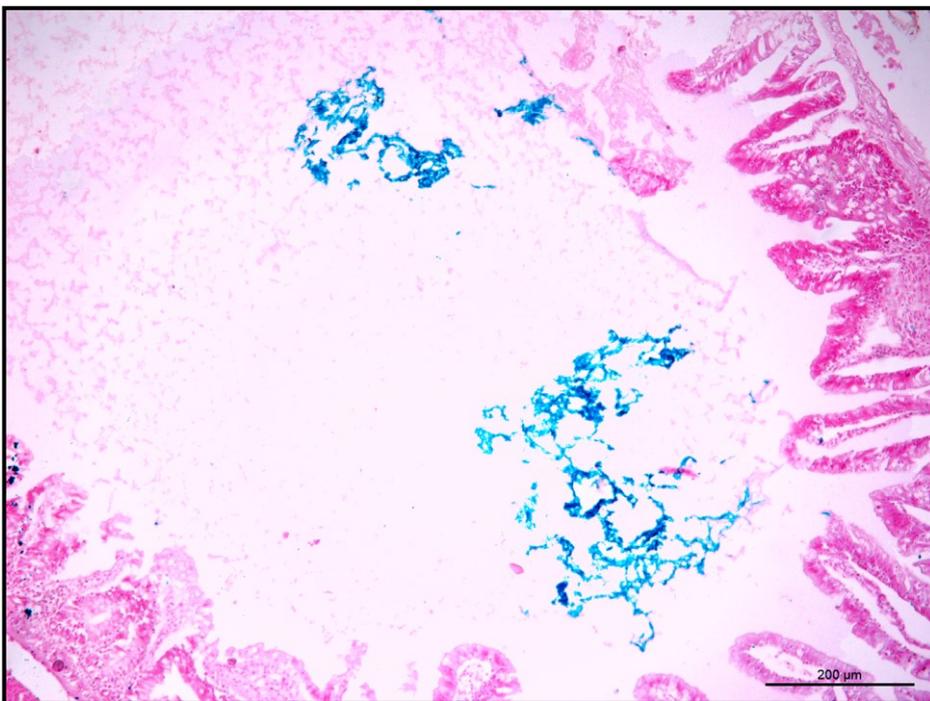


Figura 39. Histoquímica especial do peixe 8.6. Grupo Fe 12,88 mg/L. Estômago. Precipitados de ferro corados em azul no lúmen do estômago (Azul da Prússia, 100x).



Figura 40. Histologia do peixe 2.1. Grupo Controle. Brânquias e cavidade oral. Sem alterações histológicas (H.E, 100x).

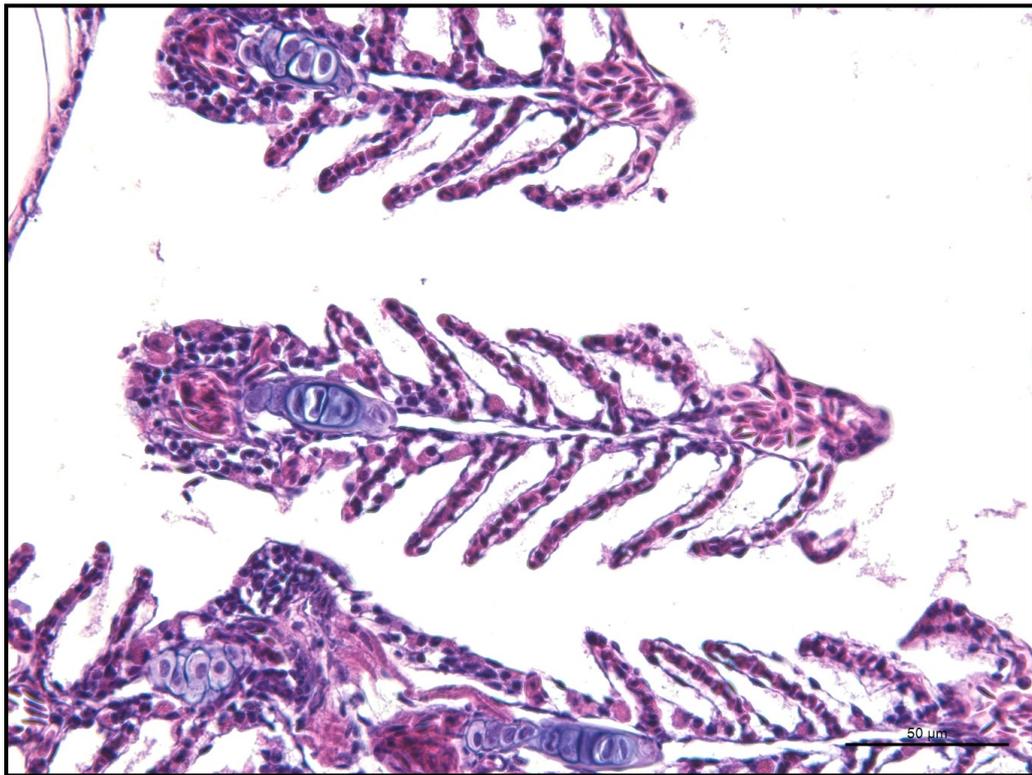


Figura 41. Histologia do peixe 2.1. Grupo Controle. Brânquias. Sem alterações histológicas (H.E, 400x).

4.3.4. Descrição das alterações anatomopatológicas por grupo

Seis peixes, de cada grupo experimental, foram avaliados histologicamente. Esses peixes foram identificados numericamente e foi realizada a correlação de lesões anatomopatológicas com o momento da morte do animal. Os peixes foram enumerados em um esquema X.Y, no qual o primeiro número (X) equivale ao aquário que o animal estava, enquanto o segundo número (Y) representa ordem em que ele morreu em relação ao seu aquário (1º, 2º, 3º). Como exemplo, o peixe 4.1 foi o primeiro peixe a morrer do aquário 4. No experimento com ferro, devido as numerosas mortes concomitantes, os peixes destinados à histopatologia, eram preferencialmente, aqueles coletados imediatamente após a constatação da morte.

Grupo GF1 (Fe 2,66 mg/L)

Nesse grupo experimental, os peixes (3.1, 4.1, 3.2, 3.4, 4.4 e 4.6) morreram espontaneamente após 6h40min, 9h00min, 12h29min, 24h06min, 25h16min e 56h56min de experimentação, respectivamente. Todos os animais apresentaram lesões nas brânquias com acúmulo de restos celulares e precipitados de ferro em diferentes locais e com intensidades variáveis. O horário de morte, locais e a intensidade dos acúmulos de restos celulares e precipitados de ferro estão representados na Tabela 8.

Tabela 8. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no grupo Fe 2,66mg/L

Animal	Tipo de morte	Tempo de morte	Locais com restos celulares e precipitados	Intensidade
3.1	Natural	6h40min	Espaços interlamelares	Discreta
4.1	Natural	9h00min	Espaços interlamelares e cavidade oral	Acentuada
3.2	Natural	12h29min	Espaços interlamelares e cavidade oral	Moderada
3.4	Natural	24h06min	Espaços interlamelares	Discreta
4.4	Natural	25h16min	Espaços interlamelares e cavidade oral	Discreta
4.6	Natural	56h56min	Espaços interlamelares	Discreta

Animais organizados por tempo de morte. h- horas, min- minutos

Grupo GF2 (Fe 5,86 mg/L)

Nesse grupo experimental, os peixes (6.1, 6.3, 6.4, 5.6, 6.5 e 6.6) morreram espontaneamente após 23h33min, 24h40min, 24h48min, 34h42min, 34h47min e 34h47min de experimentação,

respectivamente. Todos os animais apresentaram lesões nas brânquias com restos celulares e precipitados de ferro acumulados em diferentes locais e com intensidades variadas. O horário de morte, locais e a intensidade dos acúmulos de restos celulares e precipitados de ferro estão representados na Tabela 9.

Tabela 9. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no grupo Fe 5,86mg/L

<i>Animal</i>	<i>Tipo de morte</i>	<i>Tempo de morte</i>	<i>Locais com restos celulares e precipitados</i>	<i>Intensidade</i>
6.1	Natural	23h33min	Espaços interlamelares, cavidade oral	Moderada
6.3	Natural	24h40min	Espaços interlamelares	Moderada
6.4	Natural	24h48min	Cavidade oral, espaços interlamelares	Moderada
5.6	Natural	34h42min	Espaços interlamelares, cavidade oral	Discreta
6.5	Natural	34h47min	Espaços interlamelares, cavidade oral, estômago e intestinos	Moderada
6.6	Natural	34h47min	Espaços interlamelares, estômago	Discreta

Animais organizados por tempo de morte. h- horas, min- minutos

Grupo GF3 (Fe 12,88 mg/L)

Nesse grupo experimental, os peixes (8.2, 7.2, 7.3, 8.4, 7.5 e 8.6) morreram espontaneamente após 23h48min, 51h01min, 51h37min, 52h, 53h30min e 53h37min de experimentação, respectivamente. Todos os animais apresentaram lesões nas brânquias com restos celulares e precipitados de ferro acumulados em diferentes locais e com intensidades variadas. O horário de morte, locais e a intensidade dos acúmulos de restos celulares e precipitados de ferro estão representados na Tabela 10.

Tabela 10. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no grupo Fe 12,88mg/L

<i>Animal</i>	<i>Tipo de morte</i>	<i>Tempo de morte</i>	<i>Locais com restos celulares e precipitados</i>	<i>Intensidade</i>
8.2	Natural	23h48min	Espaços interlamelares, cavidade oral	Discreta

7.2	Natural	51h01min	Espaços interlamelares e cavidade oral	Acentuada
7.3	Natural	51h37min	Espaços interlamelares	Discreta
8.4	Natural	52h	Espaços interlamelares	Acentuada
7.5	Natural	53h30min	Espaços interlamelares e cavidade oral	Moderada
8.6	Natural	53h37min	Espaços interlamelares, cavidade oral, intestino	Moderada

Animais organizados por tempo de morte. h- horas, min- minutos

Grupo GF4 (Fe 28,34mg/L)

Nesse grupo experimental, os peixes (10.1, 9.1, 10.3, 9.5, 9.7 e 10.5) morreram espontaneamente após 51h28min, 51h45min, 53h, 53h07min, 53h56min e 55h44min de experimentação, respectivamente. Todos os animais apresentaram lesões nas brânquias com restos celulares e precipitados de ferro acumulados em diferentes locais e com intensidades variadas. O horário de morte, locais e a intensidade dos acúmulos de restos celulares e precipitados de ferro estão representados na Tabela 11.

Tabela 11. Correlação mortalidade e padrão de lesões histológicas encontradas no grupo Fe 28,34mg/L

Animal	<i>Tipo de morte</i>	<i>Tempo de morte</i>	<i>Locais com restos celulares e precipitados</i>	<i>Intensidade</i>
10.1	Natural	51h28min	Espaços interlamelares, cavidade oral	Acentuada
9.1	Natural	51h45min	Espaços interlamelares, cavidade oral	Acentuada
10.3	Natural	53h	Espaços interlamelares, cavidade oral	Acentuada
9.5	Natural	53h07min	Espaços interlamelares, cavidade oral, intestinos	Acentuada

9.7	Natural	53h56min	Espaços interlamelares, cavidade oral	Acentuada
10.5	Natural	55h44min	Espaços interlamelares, cavidade oral	Acentuada

Animais organizados por tempo de morte. h- horas, min- minutos

Grupo GFC (Controle)

Nesse grupo, não houve alterações histopatológicas significativas. As brânquias desses animais apresentaram adequada conformação morfológica com lamelas primária e secundária sem alterações.

4.3.5. Parâmetros da água por grupo

Os parâmetros da água analisados foram: temperatura, pH e OD. Esses parâmetros foram aferidos duas vezes ao dia. Os dados de cada grupo estão descritos individualmente e posteriormente o comparativo entre eles.

Grupo GF1 (Fe 2,66 mg/L)

Durante às 56 horas até a mortalidade total dos animais, a temperatura teve mínima e máxima de 23,9 a 24,9 °C. O pH se manteve no intervalo de 6,2 a 6,7 com tendência a alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O OD variou entre 4 e 6,4 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo Fe 2,66 mg/L foi representado na tabela 12.

Grupo GF2 (Fe 5,86 mg/L)

Durantes as 36 horas até a mortalidade total dos peixes, a temperatura atingiu mínima e máxima de 23,8 e 24,5 °C. O pH se manteve no intervalo de 6,5 a 6,8 com tendência a alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O OD variou de 4 a 6,1 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo Fe 5,86 mg/L foi representado na tabela 12

Grupo GF3 (Fe 12,88 mg/L)

Durante as 56 horas até a mortalidade total dos peixes, a temperatura registrada teve mínima e máxima de 23,8 e 24,7 °C. O pH se manteve no intervalo de 6,5 a 6,8 com tendência a alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O OD variou de 3,7 a 6,7 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca

de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo Fe 12,88 mg/L foi representado na tabela 12.

Grupo GF4 (Fe 24,34 mg/L)

Durante as 56 horas até a mortalidade total dos peixes, a temperatura registrada teve mínima e máxima de 23,7 a 24,8 °C. O pH se manteve no intervalo de 6,0 a 7,1 com tendência a alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O OD variou de 3,9 a 6,1 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo Fe 24,34 mg/L foi representado na tabela 12.

Grupo GFC (Controle)

Durante o experimento, a temperatura registrada teve mínima e máxima de 23,8 a 24,7 °C. O pH se manteve no intervalo de 6,2 a 7,3 com tendência a alcalinização com o decorrer do tempo de experimentação. O OD variou de 3,6 e 7,7 mg/L com decréscimo progressivo do valor em função do tempo e elevação considerável após troca de soluções. Os valores da média e desvio padrão dos parâmetros do grupo Controle foi representado na tabela 12.

Tabela 12. Tabela com os parâmetros de água do ensaio de toxicidade aguda de ferro

TEMPERATURA		
GRUPO	Média	Desvio padrão
GF1 (Fe 2,66 mg/L)	24,3	0,33
GF2 (Fe 5,86 mg/L)	24,3	0,34
GF3 (Fe 12,88 mg/L)	24,5	0,53
GF4 (Fe 24,34 mg/L)	24,5	0,44
GFC (Controle)	24,4	0,40
pH		
GF1 (Fe 2,66 mg/L)	6,5	0,20
GF2 (Fe 5,86 mg/L)	6,7	0,13
GF3 (Fe 12,88 mg/L)	6,7	0,32
GF4 (Fe 24,34 mg/L)	6,6	0,48
GFC (Controle)	7,0	0,43
OXIGÊNIO DISSOLVIDO		
GF1 (Fe 2,66 mg/L)	5	0,95
GF2 (Fe 5,86 mg/L)	4,84	1,14

GF3 (Fe 12,88 mg/L)	5,03	1,14
GF4 (Fe 24,34 mg/L)	5,0	0,94
GFC (Controle)	5,56	1,60

4.3.6. Comparativo de parâmetros de água entre grupos:

Os parâmetros de água estiveram, em sua maior parte, dentro do protocolo estabelecido pela OCDE. O pH permaneceu entre 6,0 e 7,5; a temperatura variou entre 23,7 e 24,9 °C e o OD variou entre 6,7 e 3,75 mg/L. As variações dos parâmetros foram muito semelhantes entre os grupos. Em alguns momentos, o OD esteve em valores abaixo dos recomendados na OCDE, (2019). Isso se deve ao fato de a solução não receber aeração suplementar durante o período experimental. Entretanto, a redução de OD nos grupos experimentais foi semelhante ao grupo controle, o que demonstra que os sinais clínicos de hipóxia estiveram exclusivamente relacionados ao tratamento experimental, afinal os peixes do grupo controle, mesmo com o OD baixo, não apresentaram nenhum tipo de sinal clínico, mortalidade ou lesão histopatológica. Outro fator reforça esse fato, é que os momentos em que ocorreram a maior parte das mortes e picos de sinais clínicos não eram os períodos em que o OD esteve com seus menores valores, atribuindo-se então a responsabilidade exclusiva ao tempo de exposição ao metal. O controle de pH foi um ponto crítico do trabalho. Devido a liberação de prótons ácidos após a mistura do cloreto férrico em água, as soluções teste assim que diluídas possuíam pH entre 2 e 4, que é inadequado aos peixes e o pH ácido poderia causar lesões e mortalidade, comprometendo avaliação da participação do ferro. Por isso foi utilizado bicarbonato de sódio até manter o pH das soluções dos grupos experimentais entre 6 e 7, que seriam intervalos adequados para manutenção do *zebrafish* prescritos pela OCDE. Entretanto, como já discutido, a elevação de pH e a aeração favorecem a precipitação e formação de hidróxidos e polímeros de ferro, influenciando na toxicidade daquela solução. A praticidade do controle desse pH se mostrou muito desafiadora durante a execução do experimento. A comparação dos parâmetros entre grupos está representada pela figura 42.

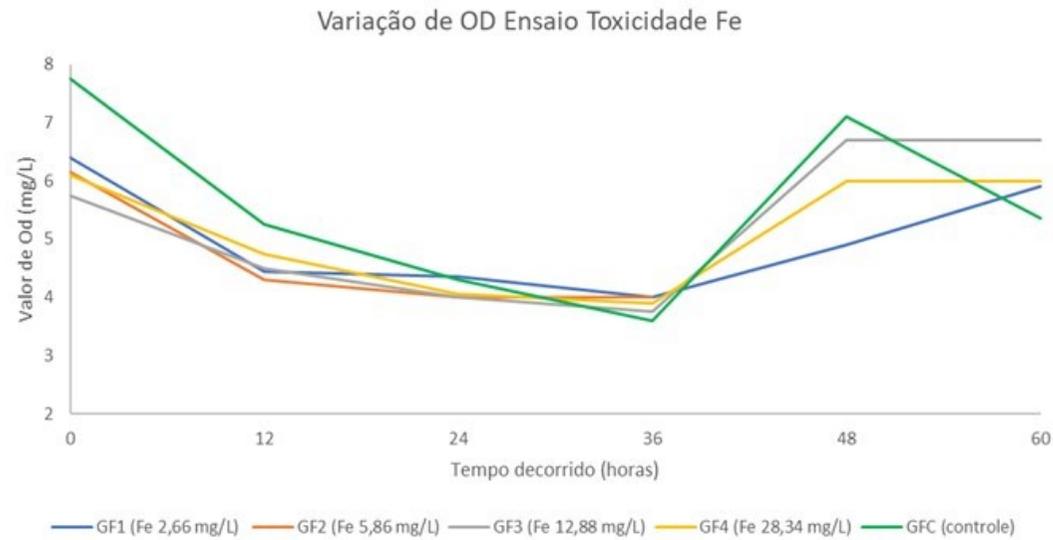
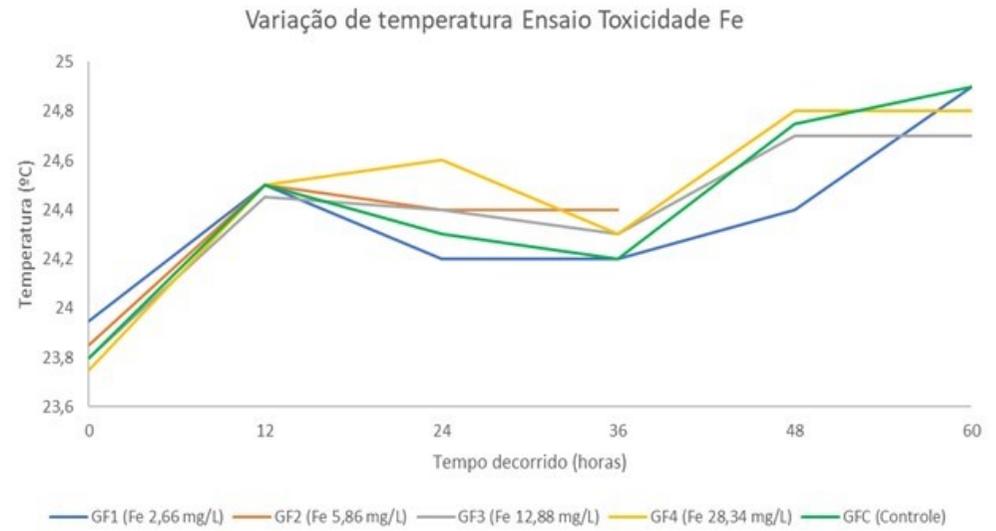
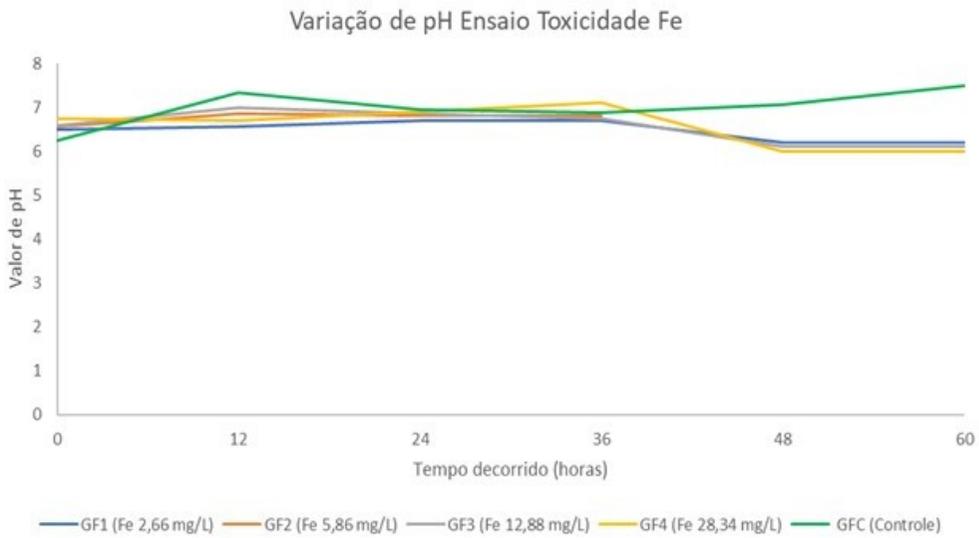


Figura 42. Comparativo entre os parâmetros de água do ensaio de toxicidade aguda de ferro.

5. DISCUSSÃO

5.1. ENSAIO SEMIESTÁTICO DE TOXICIDADE AGUDA COM CHUMBO

As águas com diferentes diluições de chumbo (0,46; 1,02, 2,24 e 4,92 mg/L), avaliadas no estudo, causaram sinais clínicos, lesões histopatológicas e mortalidade em *zebrafish* (*Danio rerio*). Quando comparadas com concentrações utilizadas em outros estudos, quanto ao valor e a capacidade de indução de lesões ou mortes, observou-se diferenças devido à ampla variação de concentrações já testadas e a dependência de seus efeitos em relação à espécie de peixe e o interesse do estudo. De forma geral, as concentrações utilizadas em outros estudos variaram de 0,4 a 925 mg/L e os sinais clínicos, lesões histológicas e índices de mortalidade foram variáveis, mas geralmente eram observados a partir de concentrações de metais semelhantes ou levemente maiores do que as avaliadas no presente trabalho. Fatores como diferentes espécies de peixe, idade, hábito alimentar, sexo, composição do tóxico e condições experimentais, sob os quais os testes são realizados, podem inferir em diferenças na correlação entre dose e mortalidade dos estudos, mesmo quando a mesma espécie é utilizada em experimentos (Singh e Ansari, 2017).

As concentrações avaliadas no presente estudo estiveram mais próximas das utilizadas em estudos que avaliaram a toxicidade desse metal em tilápias (Doaa e Hanan, 2013) e em peixes marinhos (Macirella et al., 2019). O estudo sobre a toxicidade do metal em tilápias, com foco na análise histopatológica, utilizou acetato de chumbo diluído nas concentrações de 0,4 e 0,7 mg/L, por três semanas. Nesse estudo não houve mortalidades, e as concentrações foram consideradas sub-letais, porém foram descritas lesões em brânquias, ovário e fígado. Os autores notaram correlação positiva entre lesões e a concentração nos tempos testados (Doaa e Hanan, 2013). No estudo com uma espécie marinha (peixe *Ornate wrasse* [*Thalassoma pavo* L.]), com foco na análise morfofuncional e estrutural das brânquias, foram utilizadas as diluições de nitrato de chumbo, em água deionizada, nos valores de 0,8, 2,0 e 12,0 mg/L, pelo período de até 196 horas. Nesse estudo, não houve mortalidades em nenhuma das doses testadas, mas houve lesões nas concentrações mais altas, sendo tempo dependentes (Macirella et al., 2019).

Doses maiores do que as avaliadas no presente estudo foram descritas em ensaios sobre a toxicidade do metal em *zebrafish* (*Danio rerio*), bagres africanos (*Clarias gariepinus*), em *Spotted snakehead* (*Channa punctatus*) e em curimatá (*Prochilodus lineatus*). No estudo de toxicidade de chumbo e cobalto em *zebrafish* adultos, o acetato de chumbo foi diluído em água destilada para obtenção dos níveis de 10, 15, 20, 25 e 30 mg/L. Esse estudo avaliou a sensibilidade dessa espécie ao metal e determinou a CL_{50} de 41,27 mg/L em 24 horas e 21,63 mg/L em 96 horas. Apenas a mortalidade foi avaliada nesse estudo (Singh e Ansari, 2017).

No estudo sobre lesões histológicas e bioacumulação em bagres africanos expostos a diluições de acetato de chumbo, a CL_{50} de 122 mg/L foi determinada e foram avaliados, também, níveis sub-letais do metal de 6,1 (5% CL_{50}); 12,2 (10% CL_{50}) e 24,4 (20% CL_{50}) mg/L, por seis semanas. As doses sub-letais induziram alterações histológicas nas brânquias, fígado e rins e bioacumulação principalmente nas brânquias e no fígado (Al-Balawi et al., 2013). O potencial imunotóxico do chumbo em *Spotted snakehead* foi testado com diluições

de acetato de chumbo baseados na CL_{50} de 925 mg/L. Nesse estudo, o nível de 9,43mg/L (1,02% CL_{50}) foi testado por 96 horas e foi sugerido comprometimento da capacidade de fagocitose de macrófagos intestinais e injúrias a mucosa do intestino associados ao metal (Paul et al., 2014). Testes com curimatá que avaliaram injúrias nas brânquias e alterações sanguíneas, utilizaram acetato de chumbo diluído baseados na CL_{50} de 95 mg/L. Foram utilizados os níveis sub-letais de 24 e 71 mg/L por 96 horas e foram observadas alterações histológicas nas brânquias e hiperglicemia (Martinez et al., 2004).

Os níveis avaliados no presente estudo foram maiores que o descrito pela deliberação normativa DN COPAM/CERH nº 001/2008 para águas de classe II (0,01 mg/L). Essa deliberação discrimina as, águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário e à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo. No entanto, os níveis avaliados nesse estudo foram semelhantes ou superiores aos níveis máximos de chumbo encontradas na água de rios, após as rupturas de barragens em Mariana-MG (0,9 mg/L registrado no Rio Doce após a ruptura da barragem de Fundão) (SEMAD, 2016) e Brumadinho-MG (0,147 mg/L registrado no Rio Paraopeba após a ruptura da barragem do Córrego do Feijão) (IGAM, 2020). Mesmo que os níveis testados tenham sido maiores aos detectados nos rios após os desastres de ruptura de barragem, esses foram estipulados com o intuito de induzir lesões histológicas nos peixes, o que poderia não foi obtido nos teste-pilotos com concentrações menores.

Os sinais clínicos notados durante o experimento foram: hipoatividade, distribuição anormal na superfície, distribuição anormal no fundo, sub-reatividade a estímulos, comportamento de rebaixamento, hiperventilação, ventilação irregular, animais engolindo (boqueando) e hemorragia, para determinação desses sinais foram utilizados os critérios estabelecidos pelo "Test Guideline" Nº 203 (OCDE, 2019)

Quando comparados com outros estudos de toxicidade de Pb em peixes, percebe-se semelhanças entre os sinais clínicos e alterações de comportamentos com os registrados no presente trabalho. As alterações de natação errática, perda de equilíbrio, peixes agregados em um dos cantos do aquário e repouso no fundo do recipiente, foram registradas em um estudo que avaliou a toxicidade de chumbo e cobalto, em *zebrafish*. Os autores comentam que, frequentemente, os peixes se mantinham na superfície, com evolução dos sinais clínicos para distúrbio ventilatório de respiração dificultada com movimento opercular mais forte e excesso de secreção de muco da superfície corporal (Singh e Ansari, 2017). Outro trabalho que testou acetato de chumbo em tilápias documentou diminuição na atividade natatória e aumento da produção de muco (Doaa e Hanan, 2013).

Rajeshkumar et al. (2017) apontaram uma diversidade de sinais semelhantes, como aumento dos movimentos operculares e distúrbio de coordenação nas atividades de natação, principalmente no início da exposição ao metal, com retorno ao comportamento normal após contato prolongado. Outros trabalhos apontam a diminuição na resposta à estímulo, redução da resposta de fuga, alteração do padrão e velocidade de natação (Lee et al., 2009; Roy et al., 2015). Alguns sinais clínicos relatados na literatura não foram notados no presente estudo

como rejeição a alimentos e distúrbios neurológicos (Lee et al., 2009; Roy et al., 2015; Rajeshkumar et al., 2017).

Estudos mais antigos atribuem esse conjunto de sinais clínicos a teoria da “anoxia por filme de coagulação” (do inglês “*coagulation film anoxia*”). Essa teoria disserta sobre a capacidade de coagulação do muco presente no corpo e, principalmente, nas brânquias dos peixes, quando esses peixes são expostos a águas com quantidades tóxicas de chumbo ou outros metais como zinco, ferro, cobre, cádmio, mercúrio, manganês, cobalto, níquel, prata, ouro e alumínio. Esse muco precipitado sobre as brânquias impediria a respiração promovendo angústia respiratória e morte por sufocamento (Westfall, 1945; Aronson, 1971). Westfall. (1945) promoveu um dos estudos que embasam essa teoria, com a avaliação de nitrato de chumbo em kinguios (*Carassius auratus*) com descrição do aumento dos movimentos respiratórios, dificuldade em manter o equilíbrio e mortalidade dos peixes expostos.

Os resultados do presente trabalho demonstram que a brânquia é o órgão alvo de injúria pelo Pb nas doses de 0,46; 1,02; 2,24 e 4,96 mg/L, em ensaio de 96 horas. As lesões nas brânquias são de cunho claramente necrótico, se correlacionam e justificam os sinais clínicos e as mortalidades registradas. O conjunto de lesões denominado padrão 1 era composto essencialmente por necrose acentuada das lamelas secundárias, com perda da organização lamelar e de lamelas secundárias e acúmulo acentuado de restos celulares nos espaços interlamelares. Esse conjunto de lesões, foi notado em todos os peixes que morreram espontaneamente, sugerindo que esse grau de lesão é hiperagudo e conduzia a morte dos animais. Essas lesões foram dose dependentes, pois foram registradas em dois peixes no grupo Pb 0,46 mg/L, três no Pb 1,02 mg/L, cinco no Pb 2,24 mg/L e cinco peixes no 4,92 mg/L. A importância da susceptibilidade individual do peixe também deve ser considerada, pois a intensidade e tipos de lesão variaram entre peixes do mesmo grupo experimental.

Outro padrão de lesões encontrado (padrão 2), é resumidamente composto por fragmentação individual de células, com desorganização lamelar, hiperplasia epitelial e fusão de lamelas primárias e acúmulo de restos celulares entre as células epiteliais de revestimento. Esse padrão era encontrado em animais que sobreviviam as 96 horas de experimentação e eram submetidos à eutanásia. Essa lesão aparenta ser sub-letal e necessita de mais tempo para ser formada quando comparada às lesões observadas no padrão 1. O padrão de lesão 2 foi registrado em quatro peixes do grupo Pb 0,46 mg/L, três no Pb 1,02 mg/l, um do Pb 2,24 mg/L e um do Pb 4,92 mg/L. Apesar desse conjunto de lesões não estar diretamente relacionado a morte dos animais, ele comprova o forte comprometimento da capacidade respiratória dos peixes expostos, afinal todos esses peixes estavam hipoativos, sub-reativos e distribuídos anormalmente no fundo ou na superfície do aquário.

Para avaliação histopatológica, houve consulta de literatura específica sobre histologia dos órgãos do *zebrafish* (Menke et al., 2011). O *zebrafish* apresenta versatilidade como modelo experimental, em especial pela possibilidade de processamento do peixe inteiro e visualização de vários sistemas em uma mesma lâmina, permitindo uma avaliação multissistêmica simultânea (Menke et al., 2011). Critérios para discernimento e interpretação de lesões foram rigorosamente utilizados (Ferguson, 2006; Wolf et al., 2015; Wolf e Weller, 2018). Dessa

forma, no experimento de Pb, não foram encontradas lesões além das supracitadas. Entretanto, foram encontrados alguns artefatos, comumente descritos como lesões.

Quando comparados com outros estudos, percebe-se confluência desses resultados com a literatura, principalmente na demonstração da brânquia como órgão alvo. Entretanto o discernimento e interpretação de lesões do presente trabalho, diferiu de outros artigos científicos. Afinal diversos estudos citam outras lesões nas brânquias, como: descolamento epitelial, aneurismas lamelares (telangiectasias), hiperplasia e hipertrofia de células de cloro e células produtoras de muco e alterações dos condrócitos nas porções aferentes dos filamentos (Martinez et al., 2004; Simonato et al., 2008; Al-Balawi et al., 2013; Macirella et al., 2019). No fígado, outros estudos relatam: degeneração vacuolar, necrose, aumento da basofilia e estagnação biliar (Simonato et al., 2008; Dai et al., 2009; Al-Balawi et al., 2013; Rajeshkumar et al., 2017). Nos rins, outros estudos relatam necrose tubular e expansão glomerular (Al-Balawi et al., 2013). Nos intestinos, descreve-se hiperplasia de células produtoras de muco (Xia et al., 2018) e nos ovários há descrições de atresia ovariana (Doaa e Hanan, 2013). Nenhuma dessas alterações foram observadas no presente estudo.

A brânquia foi o órgão mais acometido, provavelmente, por ser uma importante via de absorção e bioacumulação do chumbo, em especial nas espécies de água doce, principalmente quando o metal está diluído na água (Kim e Kang, 2014; Lee et al., 2019). Além disso, a brânquia é possivelmente impactada pelos radicais livres produzidos pelo chumbo, sendo exposta a danos a regulação de íons celular, danos a proteínas e danos a membrana por stress oxidativo (Roger et al., 2005; Verstraeten et al., 2008; Lee et al., 2019). Sugere-se que não foram encontradas lesões em outros órgãos pela rapidez de ocorrência de mortalidades e pelo curto tempo de exposição (96 horas) dos peixes ao metal. Ressalta-se a necessidade de estudos crônicos que permitam uma maior exposição ao metal.

5.2. ENSAIO SEMIESTÁTICO DE TOXICIDADE AGUDA COM FERRO

As águas com diferentes diluições de ferro avaliados no estudo, causaram sinais clínicos, lesões histológicas e mortalidade em *zebrafish* (*Danio rerio*). Quando comparados aos níveis utilizados em outros estudos, percebe-se uma ampla variação entre as concentrações utilizadas e a capacidade de indução de lesões ou mortes. De forma geral, os níveis utilizados em outros estudos variaram de 0,5 a 150 mg/L e os resultados com relação à sinais clínicos, lesões histológicas e mortalidade foram variáveis, mas geralmente eram observados a partir de níveis semelhantes ou levemente maiores (Li et al., 2009; Sant'Anna et al., 2011).

As concentrações avaliadas no presente estudo foram próximas as concentrações testadas em medaka japonês (*Oryzias latipes*) (Li et al., 2009); *rohu* (*Labeo rohita*) (Singh et al., 2019); piau (*Leporinus friderici*) (Gemaque et al., 2019); *zebrafish* (*Danio rerio*) (Sant'Anna et al., 2020) e *blackfish* (*Capoeta fusca*) (Sayadi et al., 2020). No estudo com medaka japonês foram utilizadas nanopartículas de ferro nas concentrações de 0; 0,5; 5 e 50 mg/L, em embriões e em adultos, por 14 dias, com o intuito de avaliar enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, histopatologia e microscopia eletrônica. Todos os peixes sobreviveram até o fim do ensaio. Houve lesões histopatológicas nas brânquias e intestinos associados ao contato com o nano-ferro nos grupos de 5 e 50 mg/L (Li et al., 2009).

O estudo com peixes *rohu*, baseou-se na CL_{50} de 132,04 mg/L de sulfato ferroso heptahidratado. Os autores utilizaram as seguintes diluições sub-letais de sulfato ferroso: 8,25 mg/L (1/16 CL_{50}); 16,51 mg/L (1/8 CL_{50}) e 33,01 mg/L (1/4 CL_{50}). A coleta e avaliação de sangue e tecidos foi realizada nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Houve alterações significativas nas contagens de eritrócitos, leucócitos e hemoglobina, aumento da peroxidação lipídica e diminuição da atividade enzimática antioxidante (superóxido dismutase e catalase). Além disso, houve bioacumulação de ferro nas brânquias e no fígado em todas as doses testadas. Houve lesões histológicas nas brânquias e no fígado, com acúmulo de ferro em hepatócitos evidenciada pela reação de Perls nas concentrações de 16,51 e 33,01 mg/L (Singh et al., 2019).

O estudo com pias juvenis testou a toxicidade de diferentes doses de Fe_2 e Fe_3 por meio de diluições de sulfato ferroso e sulfato férrico nas concentrações de 1,0; 3,0; 7,5; 15,0 mg/L por 96 horas. Os resultados do estudo não demonstraram mortalidades nas doses de 1; 3; 7,5 e 15 mg/L de Fe^{2+} . No entanto, houve mortalidade total na concentração 30 mg/L, após 24 horas. Houve mortalidade total dos peixes expostos as concentrações 7,5; 15 e 30 mg/L de Fe^{3+} após 3 horas, porém, não houve mortalidades nas concentrações de 1,0 e 3,0 mg/L de Fe^{3+} . Desse modo, foi demonstrado que o Fe^{3+} , obtido pela diluição do cloreto férrico, foi mais tóxico do que o Fe_2 para pias juvenis. Esse fato foi reforçado pela análise de batimentos operculares que demonstrou frequência mais rápida nos grupos expostos a Fe^{3+} e pelos aumentos maiores dos valores de hemoglobina e meta-hemoglobina sanguíneos nos peixes expostos a Fe^{3+} (Gemaque et al., 2019). Quando comparado os grupos expostos ao Fe^{3+} com o presente estudo, percebe-se que houve mortalidades absolutas com doses menores do que as utilizadas no estudo citado.

O estudo com *blackfish* (*Capoeta fusca*) adultos, procurou comparar a toxicidade de oxidanopartículas de ferro (Fe_3O_4NP 's) e os sais de ferro: nitrato férrico ($Fe(NO_3)_3$); cloreto férrico ($FeCl_3$); sulfato férrico (Fe_3O_4). Foram realizados ensaios de intoxicação aguda (quatro dias) e crônica (28 dias), nos quais foram avaliadas a bioacumulação, depuração e presença de lesões. Na intoxicação aguda, foram utilizadas nanopartículas de ferro nas doses de 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mg/L. Para os sais de ferro foram utilizadas as doses de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 mg/L. A partir desse experimento foram definidas as CL_{50} , em 96 horas, de 32,3 mg/L para as oxinanopartículas de ferro, 1,6 mg/L para o nitrato férrico, 3,3 mg/L para o cloreto férrico e 5,2 mg/L para o sulfato de férrico. O nitrato férrico foi o composto mais tóxico, seguido do cloreto férrico, sulfato férrico e das oxinanopartículas de ferro. Para a intoxicação crônica foi utilizado o valor de 1/10 da CL_{50} 96h de cada composto testado. Ao final do ensaio crônico foram constatadas alterações comportamentais, lesões histopatológicas e bioacumulação (Sayadi et al., 2020). Quando comparadas as informações de Sayadi et al. (2020) ao presente estudo, nota-se que o cloreto férrico foi considerado pelos autores o segundo composto mais letal. Houve mortalidade total, no presente estudo, no grupo 2,66 mg/L, em 96 horas, enquanto o CL_{50} 96h definido pelos autores foi de 3,3 mg/L.

Os níveis de ferro avaliados no presente estudo foram maiores que o padrão de ferro dissolvido descrito pela deliberação normativa DN COPAM/CERH nº 001/2008 para águas de classe II (0,3 mg/L). No entanto, os níveis avaliados nesse estudo foram semelhantes ou superiores aos níveis máximos de ferro dissolvido encontradas na água de rios, após os as rupturas de barragens em Mariana-MG (18,7 mg/L registrado no Rio Doce após a ruptura da barragem de Fundão) (SEMAD, 2016) e Brumadinho-MG (1,22 mg/L registrado no Rio Paraopeba após a ruptura da barragem do Córrego do Feijão) (IGAM, 2020). Mesmo que os níveis testados tenham sido maiores aos detectados nos rios após os desastres de ruptura de barragem, esses foram estipulados com o intuito de induzir lesões histopatológicas nos peixes, o que não foi obtido com testes-piloto com doses menores.

O relatório de análise do Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM) enfatiza a variação de ferro total, que é o somatório do ferro dissolvido (formas iônicas dissolvidas na água), ferro particulado (confere a água cor avermelhada, pode ser retirado por sedimentação) e óxidos de ferro. Segundo o relatório, a variação do ferro total está diretamente relacionada com as atividades de mineração desenvolvidas na área do desastre, pois são encontrados no rejeito de minério, sobretudo no minério de ferro. O ferro total foi acentuadamente alterado devido ao desastre, seus índices chegaram a 62 mg/L nos 60 dias após o rompimento, sendo que esses valores variavam de acordo com as chuvas. Embora, o padrão normativo para o ferro preveja apenas a forma dissolvida, constatou-se que a liberação de ferro no rio Paraopeba seria melhor detectada se considerada a fração total desse parâmetro. Os resultados das análises mostraram que o ferro liberado pela barragem estaria associado à fração total e não estaria dissolvido na água. Isso ocorre devido à sedimentação do ferro adsorto a partículas sólidas, que avança em velocidade muito inferior à de matéria dissolvida, esta que se dissemina na mesma velocidade da água. Os autores relataram uma forte correlação entre os valores de ferro total e alterações na coloração e turbidez da água (IGAM, 2020). Considerando-se os valores de ferro total, observa-se que as doses utilizadas no experimento são semelhantes ou inferiores ao valor de ferro total encontrado após ruptura de barragem.

De maneira observacional, percebeu-se a água dos aquários em tons vermelho-alaranjados, com considerável precipitação e acúmulo de material alaranjado no fundo. Essa precipitação era mais abundante nos aquários dos grupos Fe 12,88 e 28,34 mg/L. À medida que os peixes permaneciam nas soluções, iniciava a formação de grumos alaranjados no muco da pele e principalmente nas brânquias, cavidade opercular, ao redor do opérculo e da boca. A partir de então os peixes diminuam sua natação passando a estar hipoativos, ou até sub-reativos a estímulos e, ocasionalmente, com comportamento de rebaixamento e perda da organização de cardume. Em seguida, comumente, os peixes assumiam o posicionamento de distribuição anormal na superfície, somada as alterações de função ventilatória como hiperventilação, ventilação irregular e, finalmente, o ato de engolir (boquear) com progressão para a morte. Alguns peixes com esse conjunto de sinais clínicos ficavam momentaneamente distribuídos anormalmente no fundo. No entanto, era mais comum o posicionamento na superfície, principalmente nos peixes submetidos a maiores concentrações. Portanto, o principal padrão de sinais clínicos associados a mortalidade evidenciou uma progressiva perda de capacidade respiratória e consequente hipóxia, provavelmente associada à precipitação do ferro no muco

do peixe que promove injúria nas brânquias, demonstrada pela avaliação histopatológica. Esse padrão foi percebido em todas as doses testadas e culminou em mortalidade, primeiramente nos peixes dos grupos Fe 2,66 e 5,86 mg/L e, posteriormente, nos peixes dos grupos Fe 12,88 e 28,34 mg/L.

Os sinais clínicos notados durante o experimento, ordenados pela frequência, foram: hipoatividade, distribuição anormal na superfície, sub-reatividade a estímulos, hiperventilação, ventilação irregular, animais engolindo (boqueando), distribuição anormal no fundo e comportamento de rebaixamento.

Os sinais clínicos registrados no presente trabalho foram semelhantes aos relatados na literatura. Um relato de intoxicação no Lago *Pansky*, na República Checa, contaminado por efluentes de uma pedreira, o qual continha altas doses de ferro (87 mg/L), alumínio (119 mg/L) e baixo pH (3,17). Os autores comentam que as carpas espontaneamente intoxicadas, estavam com a cor escura e nas margens do lago, mas com respiração rápida, sem reações a estímulos externos, sem resposta de escape e as brânquias estavam obstruídas por material amarronzado (Slaninova et al., 2014). Outro estudo aponta que mudanças nos batimentos operculares, natação atípica, alterações nas brânquias e dificuldades em se alimentar podem estar relacionados a intoxicação por ferro, sendo que os autores mostraram que o aumento da frequência de batimento opercular pode ser dose dependente (Gemaque et al., 2019). O estudo sobre teste de nano-oxipartículas de ferro e diferentes sais de ferro em *blackfish* observou alterações comportamentais como perda gradual de equilíbrio e aumento da distribuição e da atividade na superfície do aquário (Sayadi et al., 2020). O estudo que testou doses entre 105 e 135 mg/L de ferro, manganês e alumínio em alevinos de *Kutum* (*Rutilus kutum*), relata que houve peixes com excitação, natação errática e aumento da produção de muco nas brânquias (Zahedi et al., 2014).

Para entendimento da mortalidade deve-se ressaltar que a precipitação do ferro ocorre principalmente em função do pH e do oxigênio disponível. Esses fatores levam o Fe^{2+} altamente solúvel a ser oxidado em Fe^{3+} altamente insolúvel e termoestável. O Fe^{3+} pode ser completamente hidrolisado em pH próximo à neutralidade em hidróxidos de alto peso molecular (HMM) e hidróxidos de baixo peso molecular (LMM) além de polímeros de ferro, sendo que em pH entre 5 e 9, o ferro é mais encontrado na forma de hidróxidos de alto peso molecular, polímeros de ferro ou associados a colóides e partículas suspensas, especialmente matéria orgânica (Teien et al., 2008). O Fe^{3+} quando cobre a superfície das brânquias, conduz a dano celular com consequente disfunção respiratória (Teien et al., 2008; Slaninova et al., 2014; Singh et al., 2019). Apesar de alguns trabalhos alegarem a maior toxicidade do Fe^{2+} pela sua alta biodisponibilidade e capacidade de aceleração da formação de radicais livres intracelulares, a maior parte dos trabalhos aponta o Fe^{2+} como maior causador de mortalidade pela sua capacidade de precipitação na superfície das brânquias (Teien et al., 2008; Slaninova et al., 2014; Gemaque et al., 2019; Singh et al., 2019; Sayadi et al., 2020). Entretanto, os compostos com maior quantidade de se precipitar nas brânquias é o Fe^{3+} e os hidróxidos de ferro de baixo peso molecular, geralmente adquiridos em pH igual ou menores do que 5 e baixa disponibilidade de oxigênio. Esses elementos se precipitam principalmente no muco

presente no corpo, ao redor das brânquias e na cavidade opercular (Danzell e Macfarlane, 1999; Li et al., 2009; Slaninova et al., 2014). Teien et al., (2008) reforçam que em pH acima de 6,3, já ocorre grande formação de hidróxidos de alto peso molecular e polímeros de ferro que teriam menor capacidade de acumulação nas brânquias.

Ao se contextualizar com o presente trabalho, recorda-se que na metodologia estabelecida, realizava-se o ajuste de pH, com bicarbonato de sódio, para valores entre 6 e 7, como indicado pela OCDE, e posterior aeração por no mínimo 12 horas antes do início do experimento. Nesse período de 12 horas, as soluções sofriam o processo de alcalinização pelo bicarbonato diluído e de oxigenação pela aeração. Esses fatores favoreceram a precipitação do ferro diluído e formação de grandes quantidades de hidróxidos de ferro de alto peso molecular e polímeros de ferro, que deixavam de permanecer suspensos e decantavam no fundo do aquário. Um fator importante observado é que quanto maior a concentração, maior o nível de precipitação e perda do ferro suspenso na solução. Isso justifica as mortalidades ocorrerem primeiro nos grupos Fe 2,66 e Fe 5,86 mg/L, afinal, nesses grupos, havia mais ferro suspenso disponível para precipitação na superfície do corpo dos peixes, enquanto nos grupos com maiores concentrações de ferro houve maior formação de produtos de ferro pouco acumuláveis.

A análise anatomopatológica do presente estudo demonstrou que a brânquia foi o órgão com lesões histológicas evidentes e que justificavam a morte dos peixes. Macroscopicamente a alteração mais evidente foi a presença de material granular alaranjado na superfície do corpo e das brânquias. Resumidamente, a lesão histológica é caracterizada por desorganização das lamelas secundárias frequentemente associada à desprendimento, perda do epitélio de revestimento das lamelas secundárias e acúmulo de restos celulares e precipitados de ferro, principalmente nos espaços interlamelares e na cavidade oral. A reação de azul da Prússia (Perls) auxiliou na identificação do precipitado de ferro na superfície das brânquias, sendo encontrado apenas na superfície e não intracelularmente. As lesões e acúmulos de precipitados de ferro mostraram dose dependência sendo maiores nas concentrações mais altas. Deve-se considerar a importância da susceptibilidade individual do peixe, pois houve diferença de intensidade e locais de acúmulo de precipitados de ferro em peixes do mesmo grupo experimental.

Para avaliação histopatológica, foram consultada literatura específica sobre histologia dos órgãos do *zebrafish* (Menke et al., 2011). Critérios para discernimento e interpretação de lesões foram rigorosamente utilizados (Ferguson, 2006; Wolf et al., 2015; Wolf e Weller, 2018). Dessa forma, no experimento de Fe não foram encontradas alterações em brânquias além das supracitadas. Entretanto, foram encontrados alguns artefatos, comumente descritos como lesões.

A macroscopia foi semelhante a observadas em outros trabalhos que evidenciaram a importância de acúmulo de flocos avermelhados ou amarronzados, equivalentes ao precipitado de ferro na superfície do corpo do peixe, principalmente das brânquias (Danzell e Macfarlane, 1999; Slaninova et al., 2014). Outros achados macroscópicos citados na literatura foram o espessamento das brânquias, produção excessiva de muco, hemorragias na superfície

ventral e edema na cloaca em carpas comuns (Slaninova et al., 2014). Microscopicamente houve grande similaridade entre as lesões do presente estudo e as encontradas na literatura. O registro de acúmulo de precipitados de ferro na superfície das brânquias, frequentemente associado a desprendimento epitelial é citado em alguns estudos em diferentes espécies (Dazell e Macfarlane, 1999; Li et al., 2009; Slaninova et al., 2014; Singh et al., 2019). Há também relatos do acúmulo de precipitados no intestino (Li et al., 2009). Outros achados relatados na literatura são: desorganização do epitélio lamelar com redução dos espaços interlamelares (Li et al., 2009; Slaninova et al., 2014); fusão de lamelas e hiperplasia distal de lamelas primárias (Dazell e Macfarlane, 1999; Singh et al., 2019; Sayadi et al., 2020); infiltrado de células com grânulos citoplasmáticos eosinofílicos, vacuolização e espessamento do epitélio lamelar, necrose de lamelas primárias das porções distais para a base (Slaninova et al., 2014); aneurisma, edema, sinequias lamelares, necrose de lamelas secundárias, hiperplasia epitelial (Dazell e Macfarlane, 1999; Sayadi et al., 2020) e; ruptura de lamelas, descolamento epitelial, hipertrofia de células epiteliais (Dazell e Macfarlane, 1999). Há relatos de degeneração dos túbulos proximais dos rins (Slaninova et al., 2014) e de vacuolização com acúmulo intracitoplasmático de ferro em hepatócitos (Singh et al., 2019) e de necrose de hepatócitos (Slaninova et al., 2014). Houve também a utilização da coloração de Giemsa em brânquias com lesão associada a intoxicação por ferro e demonstrou bactérias entre os restos necróticos e precipitados de ferro (Slaninova et al., 2014). Muitos desses achados nas brânquias não foram encontrados no presente estudo.

A brânquia foi o principal órgão acometido, provavelmente por ser uma importante via de absorção e bioacumulação do metal e pela capacidade da precipitação do ferro, principalmente Fe^{3+} e hidróxidos de ferro de baixo peso molecular, na sua superfície, o que causa obstrução e dano físico ao órgão (Teien et al., 2008; Slaninova et al., 2014; Gemaque et al., 2019; Singh et al., 2019; Sayadi et al., 2020). A toxicidade do ferro provocou lesões histopatológicas, associadas aos precipitados de ferro, que justificam a mortalidade e os sinais clínicos que evidenciam a perda de capacidade respiratória e anóxia dos peixes. Essa toxidade, sofre forte influência do pH e da oxigenação da água, sendo que eles predis põem a presença de hidróxidos de alto peso molecular e polímeros de ferro que tem maior dificuldade de se depositar nas brânquias (Teien et al., 2008). Provavelmente, não foram encontradas lesões em outros órgãos pela rapidez de ocorrência de mortalidades e pelo curto tempo de exposição ao ferro (96 horas), sendo que há necessidade de estudos crônicos que permitam uma maior exposição ao metal. Correlacionando-se com a realidade dos rios após a ruptura de barragens, percebe-se que a presença de Fe^{3+} e diferentes hidróxidos de ferro podem ser tóxicos aos peixes, causando danos as brânquias. Esses elementos influenciam fortemente nos valores de ferro total, o qual pode alterar a coloração e turbidez da água e está mais relacionado aos resíduos do minério de ferro (IGAM, 2020).

Ressalta-se o cuidado com o processamento dessas amostras, quando o intuito for a verificação dos precipitados de ferro aderidos as brânquias, pois, o processo de descalcificação, geralmente, envolve reagentes ácidos como ácido nítrico, fórmico ou clorídrico. Esses reagentes por conta do pH muito baixo podem dissolver os precipitados de ferro aderidos ao tecido e conseqüentemente atrapalhar na verificação e interpretação dos

precipitados de ferro na avaliação histológica. Afinal, pH abaixo de 5 podem promover as diluições dos hidróxidos de ferro formados (Teien et al., 2008). O protocolo de descalcificação utilizado no presente estudo, aplicando a imersão das amostras em ácido fórmico 24% (pH 1), por 48 horas, permitiu a visualização dos precipitados de ferro associados a lesão, muito embora ao se realizar o Azul da Prússia percebe-se uma marcação mais fraca quando comparadas a amostras não descalcificadas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O chumbo foi tóxico para o *zebrafish* nas doses avaliadas e provocou mortalidades que foram dose dependentes. O principal órgão acometido foi a brânquia, por ter contato direto com o chumbo dissolvido e por ser a responsável pela absorção do metal em peixes de água doce. As brânquias tiveram lesões necróticas hiperagudas e agudas que comprometeram a capacidade respiratória dos peixes e desencadearam sinais clínicos de alterações no comportamento de natação e alterações na função ventilatória. As lesões histológicas variaram entre os peixes que morreram espontaneamente e os que sobreviveram até o fim do experimento. Nos peixes com morte espontânea houve lesões hiperagudas de necrose acentuada de lamelas secundárias com acúmulo de restos celulares nos espaços interlamelares. Nos que sobreviveram até as 96 horas, observou-se hiperplasia epitelial, fusão de lamelas secundárias e fragmentação de células das lamelas secundárias. A fragmentação de células requer mais estudos para determinação de sua relação com a toxicidade do metal. Portanto, as lesões variam de acordo com o tempo de exposição e com a susceptibilidade individual, afinal, peixes do mesmo grupo experimental tiveram padrões de lesão diferentes. Como as lesões encontradas não são específicas para o chumbo, recomenda-se a histopatologia associada a análises toxicológicas da água ou dos tecidos do peixe, para a definição do diagnóstico. O presente estudo contribuiu para a caracterização anatomopatológica da toxicidade de chumbo em peixes. Outros estudos devem ser feitos avaliando a susceptibilidade em diferentes espécies, doses e tempos de exposição ao metal.

O ferro foi tóxico para o *zebrafish* nas doses avaliadas e provocou mortalidades e lesões histológicas. Houve mortalidade de 100% dos peixes em todos os grupos experimentais. O principal órgão acometido foi a brânquia, por ter contato direto com o metal e permitir a adesão de precipitados do ferro³⁺ e de hidróxidos de ferro na superfície do órgão. As brânquias tiveram lesões de desorganização das lamelas secundárias, associada à desprendimento, perda do epitélio de revestimento das lamelas secundárias e acúmulo de restos celulares e precipitados de ferro nos espaços interlamelares, cavidade oral, estômago e intestinos. Na reação de Azul da Prússia (Perls) houve identificação do precipitado de ferro nos diferentes órgãos. A quantidade de precipitado e intensidade das lesões variou de acordo as concentrações. As lesões nas brânquias comprometeram a capacidade respiratória dos peixes e desencadearam sinais clínicos de alterações no comportamento de natação e na função ventilatória. O nível de precipitação de ferro na água, influenciado pelo pH e oxigenação da solução, modifica a toxicidade da solução para os peixes. A análise histopatológica com cortes corados com Hematoxilina e Eosina somada à histoquímica especial de Azul da Prússia permitem eficácia no diagnóstico de mortalidades ligadas à intoxicação por ferro em peixes. O presente estudo contribuiu para a caracterização anatomopatológica da toxicidade de ferro em peixes. Outros estudos devem ser feitos avaliando a susceptibilidade em diferentes espécies, concentração, níveis de pH e tempos de exposição ao metal.

7. REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088- Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). 3ª ed. 2016.
- AHMED, M.; AHMAD, T.; LIAQUAT, M. et al. Tissue specific metal characterization of selected fish species in Pakistan. *Environ. Monit. Assess.*, 188(4), 212, 2016.
- AISEN, P.; ENNS, C.; WESSLING-RESNICK, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 940–959, 2001.
- AL-BALAWI, H. F. A.; AL-AKEL, A. S.; AL-MISNED, F. et al. 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.
- AL-SAWAFI, A. G. A.; WANG, L.; YAN, Y. Cadmium accumulation and its histological effect on brain and skeletal muscle of zebrafish. *J Heavy Metal Toxic Dis*, 2(1), 2, 2017.
- ANM. Agência Nacional de Mineração. Sumário Nacional 2018- Ferro. 2018. Disponível em < <http://www.anm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/sumario-mineral/sumario-mineral> > Acesso em 07 de fevereiro de 2020.
- ARONSON, A. L. Biologic effects of lead in fish. *J. Wash. Acad. Sci.*, 124-128, 1971.
- AVENANT-OLDEWAGE, A.; MARX, H.M. Bioaccumulation of chromium, copper and iron in the organs and tissues of *Clarias gariepinus* in the Olifants River, Kruger National Park. *Water South Afr.* 26 (4), 569–582, 2000.
- BURY, N. R.; GROSELL, M. Waterborne iron acquisition by a freshwater teleost fish, zebrafish *Danio rerio*. *J. Exp. Biol*, 206(19), 3529-3535, 2003.
- CADMUS, P.; BRINKMAN, S. F.; MAY, M. K. Chronic Toxicity of ferric iron for North American aquatic organisms: derivation of a chronic water quality criterion using single species and mesocosm data. *Arch Environ Con Tox*, 74(4), 605-615, 2018.
- CARRIQUIRIBORDE, P.; HANDY, R. D.; DAVIES, S. J. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *J Exp Biol*, v. 207, n. 1, p. 75-86, 2004.
- CHENG, H.; HU, Y. Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: a review. *Environ. Pollut.* 158, 1134–1146, 2010.
- CONCEA- Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Concea. 2015.
- CORDEIRO, M. C.; GARCIA, G. D.; ROCHA, A. M. et al. Insights on the freshwater microbiomes metabolic changes associated with the world's largest mining disaster. *Sci Total Environ*, 654, 1209-1217, 2019.

- DAI, W.; DU, H.; FU, L. et al. Effects of dietary Pb on accumulation, histopathology, and digestive enzyme activities in the digestive system of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biol. Trace Elem. Res.*, 127(2), 124-131, 2009.
- DALZELL, D. J. B.; MACFARLANE, N. A. A. The toxicity of iron to brown trout and effects on the gills: a comparison of two grades of iron sulphate. *J. Fish Biol*, 55(2), 301-315, 1999.
- DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R.; GAYA, C. et al., Zebrafish-Manual de criação em Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 20-1, 2011.
- DAVE, G., XIU, R. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch Environ Con Tox.*, 21(1), 126-134, 1991.
- DO, J. W.; SARAVANAN, M.; NAM, S. E. et al. Waterborne manganese modulates immunity, biochemical, and antioxidant parameters in the blood of red seabream and black rockfish. *Fish Shellfish Immun*, 88, 546-555, 2019.
- DOAA, M. M.; HANAN, H. A. Histological changes in selected organs of *Oreochromis niloticus* exposed to doses of lead acetate. *J Life Sci Biomed*, 3(3), 256-263, 2013.
- DOLCI, G. S.; DIAS, V. T.; ROVERSI, K. et al. Moderate hypoxia is able to minimize the manganese-induced toxicity in tissues of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotox Environ Safe*, 91, 103-109, 2013.
- FENTON, H.J.H. 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.* 65, 99–910.
- FERGUSON, H.W. *Systemic pathology of fish: A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease*. 2 ed. London: Scotian press. 2006. 367p.
- FONSECA, A. R.; FERNANDES, L. S.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. et al. From catchment to fish: Impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. *Sci Total Environ*, 550, 972-986, 2016.
- FONSECA, A. R.; FERNANDES, L. S.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. et al. The impact of freshwater metal concentrations on the severity of histopathological changes in fish gills: A statistical perspective. *Sci Total Environ*, 599, 217-226, 2017.
- FREITAS, C. M. D; BARCELLOS, C.; ASMUS, C. I. R. F. et al. Da Samarco em Mariana à Vale em Brumadinho: desastres em barragens de mineração e Saúde Coletiva. *C.S.P.* 35, 2019.
- GEMAQUE, T.; COSTA, D. P. D.; PEREIRA, L. V. Evaluation of Iron Toxicity in the Tropical Fish *Leporinus friderici*. *BJSTR*, 18(2), 13436-13441, 2019.

- HARANGI, S.; BARANYAI, E.; FEHÉR, M. et al. Accumulation of metals in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) exposed to sublethal levels of iron and manganese: survival, body weight and tissue. *Biol. Trace Elem. Res.*, 177(1), 187-195, 2017.
- HU, S., HAN, J., YANG, L., LI, S. et al. Impact of co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and Pb on zebrafish embryos. *Chemosphere*, 233, 579-589. 2019.
- HWANG, I. K.; KIM, K. W.; KIM, J. H.; KANG, J. C. Toxic effects and depuration after the dietary lead (II) exposure on the bioaccumulation and hematological parameters in starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Environ Toxicol Phar*, 45, 328-333, 2016.
- IGAM- Instituto Mineiro de Gestão de Águas. Avaliação da qualidade da águas e sedimentos do Rio Paraopeba: acompanhamento da qualidade das águas do Rio Paraopeba após 1 ano do rompimento da barragem da Mina Córrego Feijão da Mineradora Vale/SA – Brumadinho/MG. 2020. Disponível em <<http://www.meioambiente.mg.gov.br/component/content/article/13-informativo/3741-desastre-ambiental-barragem-B-I-mina-corrego-do-feijao>> Acesso em 07 de fevereiro de 2021.
- JABEEN, G.; MANZOOR, F.; JAVID, A. et al. Evaluation of fish health status and histopathology in gills and liver due to metal contaminated sediments exposure. *B Environ Contam Tox*, 100(4), 492-501, 2018.
- KIM, J. H.; KANG, J. C. The lead accumulation and hematological findings in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* exposed to the dietary lead (II) concentrations. *Ecotox Environ Safe*, 115, 33-39, 2015.
- LABROT, F.; NARBONNE, J. F.; VILLE, P. et al. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Arch Environ Con Tox*, 36(2), 167-178, 1999.
- LEE, J. W.; CHOI, H.; HWANG, U. K. et al. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. *Environ Toxicol Phar*. 2019.
- LEI, C.; SUN, X. Comparing lethal dose ratios using probit regression with arbitrary slopes. *BMC Pharmacol Toxicol*, 19(1), 61. 2018
- LI, H.; ZHOU, Q.; WU, Y. et al. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 684–692, 2009.
- LI, H.; ZHOU, Q.; WU, Y. et al. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. *Ecotoxicol Environ Saf*, 72(3), 684-692, 2009.

- LIU, J.; LIAO, G.; TU, H. et al. A protective role of autophagy in Pb-induced developmental neurotoxicity in zebrafish. *Chemosphere*, 235, 1050-1058, 2019.
- LIU, J.; LIAO, G.; TU, H., et al., A protective role of autophagy in Pb-induced developmental neurotoxicity in zebrafish. *Chemosphere*, 235, 1050-1058. 2019
- ŁUSZCZEK-TROJNAR, E.; DRAĞ-KOZAK, E.; POPEK, W. Lead accumulation and elimination in tissues of Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), after long-term dietary exposure, and depuration periods. *Environ Sci Pollut R*, 20(5), 3122-3132, 2013.
- MACIRELLA, R.; SESTI, S.; BERNABÒ, I. et al. Lead toxicity in seawater teleosts: A morphofunctional and ultrastructural study on the gills of the Ornate wrasse (*Thalassoma pavo* L.). *Aquat. Toxicol.* 211, 193-201, 2019.
- MARINS, K.; LAZZAROTTO, L. M. V.; BOSCHETTI, G. et al. Iron and manganese present in underground water promote biochemical, genotoxic, and behavioral alterations in zebrafish (*Danio rerio*). *ESPR*, 26(23), 23555-23570, 2019.
- MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B.V.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.*, 64(4), 797-807, 2004.
- MELETTI, P. *Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes*. 2003. 209p. Tese (Doutorado)-Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos.
- MENKE, A. L.; SPITSBERGEN, J. M.; WOLTERBEEK, A. P.; WOUTERSEN, R. A. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol. pathol.*, 39(5), 759-775, 2011.
- NASRALLAH, G. K.; YOUNES, N. N.; BAJI, M. H. et al. Zebrafish larvae as a model to demonstrate secondary iron overload. *Europ. J Haemat*, 100(6), 536-543, 2018.
- NOGA, E. J. *Fish disease: diagnosis and treatment*. 2ed. Mosby, 2014.
- OCDE. Organisation for Economic Cooperation and Development. Test Guideline No. 203-Fish, Acute Toxicity Testing. 2019. Disponível em < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en> Acesso em 07 de fevereiro de 2020.
- PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202 (2), 199–211, 2005.
- PAUL, N.; CHAKRABORTY, S.; SENGUPTA, M. Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*. *Aquat. Toxicol.* 152, 105-112, 2014.
- PLOETZ, M.; FITTS, B. E.; RICE, T. M. Differential accumulation of heavy metals in muscle and liver of a marine fish, (King Mackerel, *Scomberomorus cavalla* Cuvier) from the Northern Gulf of Mexico. USA. *B Environ Contam Tox*, 78, 124–127, 2007.

- POLAT, F.; AKIN, Ş.; YILDIRIM, A.; DAL, T. The effects of point pollutants-originated heavy metals (lead, copper, iron, and cadmium) on fish living in Yeşilırmak River, Turkey. *Toxicol Ind Health*, 32(8), 1438-1449, 2016.
- RABITTO, I. S.; COSTA, J. A.; ASSIS, H. S. et al. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 60(2), 147-156, 2005.
- RAJESHKUMAR, S.; LIU, Y.; MA, J. et al. Effects of exposure to multiple heavy metals on biochemical and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus carpio L.* *Fish Shellfish Immunol*, 70, 461-472, 2017.
- RENIERI, E. A.; SFAKIANAKIS, D. G.; ALEGAKIS, A. A. et. al. Nonlinear responses to waterborne cadmium exposure in zebrafish. An in vivo study. *Environ. Res.* 157, 173–181, 2017.
- RODRIGUES, P.N.S.; PEREIRA, F.A. A model for acute iron overload in sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Lab. Anim.* 38, 418–424, 2004.
- ROGERS, J. T.; RICHARDS, J. G.; Wood, C. M. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 64(2), 215-234, 2003.
- ROY, N. M.; DEWOLF, S.; CARNEIRO, B. Evaluation of the developmental toxicity of lead in the *Danio rerio* body. *Aquat. Toxicol.* 158, 138-148, 2015.
- SANT'ANNA, M. C. B.; MATAS SOARES, V.; SEIBT, K. J. et al. Iron exposure modifies acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) tissues: distinct susceptibility of tissues to iron overload. *Fish Physiol.*, 37(3), 573-581, 2011.
- SANTOS, D.; LUZIO, A.; COIMBRA, A. M. et al. A Gill Histopathology Study in two Native Fish Species from the Hydrographic Douro Basin. *Microsc. Microanal.* 25(1), 236-243, 2019.
- SAYADI, M.H.; MANSOURI, B.; SHAHRI, E. et al. Exposure effects of iron oxide nanoparticles and iron salts in blackfish (*Capoeta fusca*): Acute toxicity, bioaccumulation, depuration, and tissue histopathology. *Chemosphere*, 2020.
- SEMAD-MG. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável de Minas Gerais. Mortandade de peixes na Bacia do Rio Doce após rompimento da barragem da Samarco no distrito de Bento Rodrigues (Mariana/MG), em 05/11/2015. 2016. Disponível em <http://www.meioambiente.mg.gov.br/images/stories/2016/DESASTRE_MARIANA/Relat%C3%B3rios/Relat%C3%B3rio_T%C3%A9cnico_DEAMB-SEMAD-SISEMA_N%C2%BA_0112016.pdf> Acesso em 07 de fevereiro de 2021.

- SHANKAR, P.; DASHNER-TITUS, E. J.; TRUONG, L. et al. Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to uranium: A comparison with lead, cadmium, and iron. *Environ. Pollut*, 269, 116097, 2021.
- SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L.; MARTINEZ, C. B. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol Environ Saf*, 69(1), 112-120, 2008.
- SINGH, C. B.; ANSARI, B. A. Toxicity of two heavy metals lead and cobalt on zebrafish, *Danio rerio*. *Sch. Acad. J. Biosci*, 5(9), 682-687, 2017.
- SLANINOVA, A.; MACHOVA, J.; SVOBODOVA, Z. Fish kill caused by aluminium and iron contamination in a natural pond used for fish rearing: a case report. *Vet. Med.* 59 (11), 573–581, 2014.
- TAI, Z.; GUAN, P.; WANG, Z. et al. Common responses of fish embryos to metals: an integrated analysis of transcriptomes and methylomes in zebrafish embryos under the stress of copper ions or silver nanoparticles. *Metallomics*, 11(9), 1452-1464, 2019.
- TEIEN, H.C.; GARMO, O.A.; ATLAND, A. et al. Transformation of iron species in mixing zones and accumulation on fish gills. *Environ. Sci. Technol.* 42 (5), 2008.
- THOMPSON, F.; OLIVEIRA, B. C.; CORDEIRO, M. C. et al. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. *Sci Total Environ*, 705, 135914, 2020.
- TYE, M. T.; MONTGOMERY, J. E.; HOBBS, M. R. et al. An adult zebrafish diet contaminated with chromium reduces the viability of progeny. *Zebrafish*, 15(2), 179-187. 2018.
- VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12 (10), 2005.
- VERGILIO, C. S.; LACERDA, D.; OLIVEIRA, B. C. et al. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). *Sci. Rep.*, 10(1), 1-12, 2020.
- VERSTRAETEN, S. V.; AIMO, L.; OTEIZA, P. I. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch. Toxicol* 82(11), 789-802, 2008.
- WESTFALL, B. A. Coagulation film anoxia in fishes. *Ecology*, 26(3), 283-287, 1945.
- WOLF, J. C.; BAUMGARTNER, W. A.; BLAZER, V. S. et al. Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and readers. *Toxicol. Pathol.*, 43(3), 297-325, 2015.

WOLF, J. C.; WHEELER, J. R. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquat. Toxicol.*, 197, 60-78, 2018.

XIA, J.; LU, L.; JIN, C. et al. Effects of short term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 209, 1-8, 2018.

ZAHEDI, S.; VAEZZADE, H.; RAFATI, M. et al. Acute toxicity and accumulation of iron, manganese and, aluminum in Caspian Kutum fish (*Rutilus kutum*). *Iran. J. Toxicol.* 8 (24), 1028–1033, 2014.