

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS PRELIMINARES EM BRÂNQUIAS DE PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio* HAMILTON, 1822) EXPOSTOS A MICROPLÁSTICOS EM AMBIENTE CONTROLADO

(Preliminary histopathological alterations in gills of zebrafish (Danio rerio Hamilton, 1822) exposed to microplastics under controlled conditions.)

(Alteraciones histopatológicas preliminares en branquias de peces cebrá (Danio rerio Hamilton, 1822) expuestos a microplásticos en condiciones controladas.)

Victor Silva Lucino^{a†}, Victória Marcella Ferreira Almeida^{a†}, Amanda de Azevedo Valle^a, Fábio Kummrow^b, Bruno Fiorelini Pereira^{a,c}, Nuha Ahmad Dsouki^d, Flavio Kyoshi Tominaga^a

^a Biotério Experimental *Danio Rerio* (BEDAR), Universidade Federal de São Paulo - campus Diadema, Diadema, Brasil; ^b Departamento de Ciências Farmacêuticas - Campus Diadema, Universidade Federal de São Paulo, Brasil; ^c Departamento de Ciências Biológicas - Campus Diadema, Universidade Federal de São Paulo, Brasil; ^d Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina do ABC, Brasil; [†] Autores contribuíram igualmente.

A presença de microplásticos (MP) em ambientes aquáticos pode representar risco direto para a saúde humana, animal e o meio ambiente (Lucio et al., 2019). Essa ameaça afeta diretamente a fauna aquática, que está diariamente exposta a esses contaminantes, seja pela ingestão direta ou indireta. (Caron et al., 2018). Visto essa problemática, a utilização de organismos aquáticos configura-se como uma alternativa relevante de pesquisa (Rezania et al., 2018). O Zebrafish (*Danio rerio*), um teleósteo de água doce da família Cyprinidae (Hamilton, 1822), é um modelo vantajoso para pesquisas toxicológicas (Horzmann et al., 2018). Esse reconhecimento decorre de suas características genéticas bem estabelecidas, sua similaridade com a fisiologia humana e de sua elevada sensibilidade a contaminantes ambientais (Howe et al., 2013; Bhagat et al., 2020). Anormalidades morfológicas encontradas em brânquias podem ser indicadores de estresse (Dammski et al., 2013), tornando-as parâmetros úteis para a avaliação de efeitos de contaminantes ambientais. Nesse contexto, nosso objetivo foi realizar uma análise preliminar das brânquias de *D. rerio* adultos após a exposição subcrônica aos MP's. Peixes adultos de *D. rerio* (linhagem selvagem), sem distinção de sexo, foram submetidos à exposição subcrônica (14 dias) aos microplásticos de polietileno (Ref 434272, tamanho das partículas 34–50 µm). Para cada tratamento, foram utilizados 10 espécimes por concentração, distribuídos em um grupo controle e um grupo experimental, este último exposto a MP de polietileno na concentração de 100 ppm. Os testes foram do tipo semiestático com trocas parciais do meio

(meio aquoso + reposição parcial da concentração inicial de polietileno) a cada 72h. Os animais foram mantidos com temperatura (28°C), fotoperíodo (14h Luz:10h Escuro) e alimentação (1 vez ao dia, ração) constantes. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por imersão em uma solução de MS-222 (1 g/L) - anestésico aprovado para uso em peixes e amplamente empregado em estudos de ecotoxicologia (CONCEA, 2017; Teixeira, 2018), fixados em formaldeído 10% e submetidos ao processamento histológico padrão. Ao final, as amostras foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e escaneadas e analisadas via Aperio ImageScope 12.4.6 (20x). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA nº5220291122). Análises qualitativas foram realizadas de maneira manual, por meio de duplo-cego. Análises quantitativas foram realizadas utilizando GraphPad Prism versão 10.0.0. Os dados percentuais foram transformados pela função arcoseno-raiz quadrada para atender aos pressupostos de normalidade, posteriormente foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e ANOVA two-way. Em relação à lamela primária, as alterações histopatológicas encontradas foram proliferação epitelial e descolamento epitelial. Para as lamelas secundárias, foram encontradas alterações de curvatura, descolamento epitelial, dilatação do ápice lamelar, fusão parcial, fusão total, edema e aneurisma. Entretanto, apenas a alteração de curvatura apresentou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo exposto ao MP ($p < 0.001$). Dessa forma, demais lesões, apesar de detectadas, não podem ser atribuídas com segurança ao tratamento, podendo refletir variações individuais ou respostas inespecíficas. Esse achado reforça a relevância dos microplásticos como potenciais agentes de estresse para organismos aquáticos, mas deve ser interpretado como preliminar, visto que necessita de maior número de réplicas para ser plenamente corroborado. Neste sentido, reconhecer alterações precoces e específicas é importante, uma vez que essas mudanças podem servir como sinais de alerta sobre os efeitos dos poluentes, em especial da exposição ao polietileno.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, histologia, polietileno, poluição ambiental, patologia.

Keywords: Ecotoxicology, environmental pollution, histology, polyethylene, pathology.

Palabras clave: Ecotoxicología, histología, polietileno, contaminación ambiental, patología.

Referências Bibliográficas:

LUCIO, F. T., MAGNONI, D. M., VICENTINI, V. E. P., CONTE, H. Disponibilidade e influência dos microplásticos nos seres vivos e ambiente: uma revisão. **Conexão Ciência (Online)**, v. 14, n. 1, p. 47-55, 2019. DOI: <https://doi.org/10.24862/cco.v14i1.908>.

CARON, A. G., THOMAS, C. R., BERRY, K. L., MOTTI, C. A., ARIEL, E., & BRODIE, J. E. Ingestion of microplastic debris by green sea turtles (*Cheloniemydas*) in the Great Barrier Reef: Validation of a sequential extraction protocol. **Marine Pollution Bulletin**, v. 127, p. 743-751, 2018. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.12.062.

REZANIA S., PARK J., DIN M. M., TAIB S. M., TALAIEKHOZANI A., YADAV K. K., KAMYAB H. Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: a review of recent studies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, p. 191–208, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.022>.

HAMILTON, F. An account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Edinburgh: **Archibald Constable and Company**, 1822. DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.59540>.

HORZMANN, K. FREEMAN J L. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish, **Toxicological Sciences**, v. 163, n. 1, p. 5–12, 2018. DOI: 10.1093/toxsci/kfy044.

HOWE, K et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12111>.

BHAGAT, J *et al.* Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 728, p. 138707, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138707

DAMMSKI, A. P., MÜLLER, B. R., GAYA, C. **Zebrafish: Manual de Criação em Biotério**. v. 1. Curitiba: Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2011.

CONCEA. Anexo I — Peixes mantidos em instalações de ensino ou pesquisa. Resolução **Normativa CONCEA n.º 34, de 27 de julho de 2017**. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2017.

TEIXEIRA, N. S. Efeitos do anestésico tricaina metanosulfonato (MS-222) em peixes teleosteos: aspectos fisiológicos e comportamentais. **Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2018.