AVALIAÇÃO DOS EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS DE CONTAMINANTES EMERGENTES COM POTENCIAL DE DISRUPÇÃO ENDÓCRINA EM *ASTYANAX LACUSTRIS*

Enzo Augusto Milaré Brina (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Grace Anne Vieira Magalhaes Ghiotto (Co-orientadora), Luciana Andreia Borin-Carvalho (Orientadora). E-mail: labcarvalho@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Genética/Genética Animal.

Palavras-chaves: Atrazina, Cafeina, Citotoxicidade.

RESUMO

A exposição simultânea a contaminantes pode produzir respostas distintas daquelas observadas para compostos isolados, porém seus efeitos sobre espécies nativas de peixes ainda são pouco explorados. Este estudo avaliou os efeitos subletais da atrazina e da cafeína, isoladamente e em combinação, em *Astyanax lacustris*, por meio da avaliação de alterações morfológicas eritrocitárias e frequência de micronúcleos. Após a exposição a concentrações ambientalmente relevantes, amostras de sangue foram coletadas para avaliação de alterações morfológicas em eritrócitos. Foram analisados 2.000 eritrócitos por indivíduo. A frequência de micronúcleos foi baixa e não diferiu significativamente entre os grupos, com médias de 0 a 1,60 micronúcleos por indivíduo. Em contraste, as alterações morfológicas apresentaram maior frequência nos grupos expostos à atrazina e à atrazina associada com cafeína, diferindo dos controles e do grupo exposto à cafeína. Os resultados indicam que a atrazina esteve associada principalmente a alterações morfológicas eritrocitárias, enquanto não foi observada indução significativa de micronúcleos. A exposição combinada não intensificou as alterações observadas com a atrazina isoladamente, indicando maior sensibilidade das alterações morfológicas eritrocitárias à exposição aos contaminantes, nas condições avaliadas.

INTRODUÇÃO

A contaminação dos ambientes aquáticos por compostos de origem antrópica constitui um importante problema ambiental, especialmente em regiões submetidas à intensa atividade agrícola e urbana. Embora frequentemente detectados em baixas concentrações, esses contaminantes podem provocar efeitos subletais em organismos aquáticos, comprometendo processos fisiológicos e celulares. A planície de inundação do Alto Rio Paraná, uma importante área úmida da bacia, apresenta crescente influência antrópica e está sujeita ao aporte de contaminantes

provenientes do escoamento agrícola e de efluentes urbanos, tornando relevante a avaliação de seus potenciais impactos sobre a biota aquática (Lee et al., 2018).

Entre os contaminantes de interesse, destaca-se a atrazina, herbicida amplamente utilizado e frequentemente detectado em ambientes aquáticos devido à sua mobilidade e persistência (LAZORKO-CONNON; ACHARI, 2009). A cafeína, por sua vez, é um marcador de contaminação por águas residuárias domésticas e de influência antrópica em águas superficiais (BUERGE et al., 2003). Entretanto, são limitados os estudos sobre os efeitos isolados e combinados desses contaminantes em peixes nativos.

Estudos com espécies nativas são essenciais para compreender os efeitos de contaminantes em condições ambientalmente relevantes. Nesse contexto, *Astyanax lacustris*, espécie amplamente distribuída em ambientes de água doce, apresenta potencial para estudos ecotoxicológicos. Alterações eritrocitárias e a frequência de micronúcleos são biomarcadores úteis para avaliar respostas celulares à exposição a contaminantes. Assim, este estudo avaliou os efeitos subletais da atrazina e da cafeína, isoladamente e em combinação, sobre *A. lacustris*, com foco nesses biomarcadores.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados indivíduos adultos, machos e fêmeas, de *Astyanax lacustris* (9,92 ± 2,69 g; 7,27 ± 0,91 cm), aclimatados por 10 dias no BIOPEMP/UEM. Os peixes foram mantidos em condições controladas, com água declorada, aeração constante, fotoperíodo 12:12 h e densidade de 1,5 g L^{-1}. O experimento compreendeu dois controles e três tratamentos, com cinco animais por grupo, expostos por 28 dias a atrazina (1,22 µg L^{-1}), cafeína (0,7 µg L^{-1}) ou à combinação dos contaminantes (1,22 + 0,7 µg L^{-1}). Ao final, foram confeccionadas duas lâminas de esfregaço sanguíneo por indivíduo, coradas por Panótico e analisadas em microscopia óptica (1000×). Foram avaliados 2.000 eritrócitos por indivíduo quanto à ocorrência de micronúcleos (MN) e alterações morfológicas celulares (AMC), conforme Hooftman e Raat (1982), com adaptações. Os dados foram analisados por estatística descritiva (média, mediana e desvio-padrão) e ANOVA de uma via, seguida de Tukey, com $p < 0,05$. O estudo foi aprovado pelo CEUA/UEM (protocolo nº 9190290525).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos eritrócitos demonstrou baixa frequência de micronúcleos (MN), sem diferenças significativas entre os grupos, com médias variando de 0 a 1,60 MN por indivíduo. Em contraste, as alterações morfológicas celulares (AMC) apresentaram diferenças significativas, com maiores frequências nos grupos atrazina (30,6 ± 6,35 AMC/indivíduo) e atrazina associada à cafeína (31,0 ± 7,81 AMC/indivíduo), que diferiram dos controles e da cafeína isoladamente (12,2 ± 1,79 AMC/indivíduo) (Tab. 1).

Tabela 1. Alterações em eritrócitos de *Astyanax lacustris*. MN = micronúcleos; AMC=alterações morfológicas celulares; X̄=média; DP=desvio-padrão. *Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA/Tukey; p < 0,05). [1]Água + etanol

Grupo Experimental	MN	% MN	MN (X̄ e DP)	AMC	% AMC	AMC (X̄ e DP)
Controle negativo	8	0,08%	1,60 e 0,894	38	0,39%	7,40 e 2,30
Controle de diluição[1]	0	0%	0 e 0	61	0,61%	12,20 e 5,07
G1 Atrazina	2	0,02%	0,4 e 0,548	153*	1,53%	30,6 e 6,35*
G2 Cafeína	4	0,04%	0,8 e 1,095	61	0,61%	12,20 e 1,79
G3 Atrazina + Cafeína	8	0,08%	1,6 e 2,191	155*	1,55%	31 e 7,81*
Total	22	0,22%	0,88 e 1,27	467	4,67%	18,7 e 11,3

O aumento de AMC associado à atrazina contrasta com os resultados de Botelho et al. (2015), que observaram aumento significativo de micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de *Danio rerio* expostos a concentrações ambientalmente relevantes de atrazina. Essa diferença pode estar relacionada às características específicas da espécie, às condições experimentais e à dinâmica temporal da resposta genotóxica. Para a cafeína, a baixa frequência de MN observada é consistente com os resultados de Muñoz-Peñuela, et al. (2022) em *Astyanax altiparanae*, nos quais a exposição à cafeína não aumentou significativamente a frequência de alterações nucleares. A frequência semelhante de AMC entre os grupos expostos à atrazina e à atrazina associada à cafeína sugere, preliminarmente, ausência de potencialização do efeito da atrazina pela cafeína. Considerando que os dados correspondem a uma primeira rodada experimental, novas exposições com réplicas independentes serão necessárias para confirmar essas respostas.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a atrazina esteve associada ao aumento das alterações morfológicas eritrocitárias, enquanto a cafeína isoladamente apresentou resposta semelhante aos controles. A exposição combinada não intensificou as alterações observadas para a atrazina. Esses achados reforçam a relevância de biomarcadores

hematológicos para o monitoramento dos efeitos de contaminantes de origem agrícola e urbana sobre a biota aquática, contribuindo para a avaliação da qualidade ambiental.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de iniciação científica, à Universidade Estadual de Maringá e ao Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular (DBC).

REFERÊNCIAS

BOTELHO, R. G.; MONTEIRO, S. H.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; MOURA-ANDRADE, G. C. R.; TORNISIELO, V. L. Environmentally relevant concentrations of atrazine and ametrine induce micronuclei formation and nuclear abnormalities in erythrocytes of fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 69, n. 4, p. 577–585, 2015. DOI: 10.1007/s00244-015-0171-6.

HOOFTMAN, R. N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research*, v. 104, n. 1–3, p. 147–152, 1982. DOI: 10.1016/0165-7992(82)90136-1.

LEE, E. et al. Land cover change explains the increasing discharge of the Paraná River. *Regional Environmental Change*, v. 18, p. 1871–1881, 2018.

MUÑOZ-PEÑUELA, M.; MOREIRA, R. G.; GOMES, A. D. O.; TOLUSSI, C. E.; BRANCO, G. S.; PINHEIRO, J. P. S.; ZAMPIERI, R. A.; LO NOSTRO, F. L. Neurotoxic, biotransformation, oxidative stress and genotoxic effects in *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characiformes) males exposed to environmentally relevant concentrations of diclofenac and/or caffeine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 91, 103821, 2022. DOI: 10.1016/j.etap.2022.103821.

LAZORKO-CONNON, S.; ACHARI, G. Atrazine: its occurrence and treatment in water. *Environmental Reviews*, v. 17, p. 199–214, 2009. DOI: https://doi.org/10.1139/A09-009.

BUERGE, I. J.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D.; BUSER, H. R. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental Science & Technology*, v. 37, n. 4, p. 691–700, 2003. DOI: 10.1021/es020125z.