

**Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
Programa de Pós Graduação
Biologia de Água Doce e Pesca Interior**

**Efeitos histopatológicos dos agrotóxicos deltametrina, imidacloprido, glifosato
e diuron nas brânquias de quatro
espécies de peixes amazônicos**

Leonardo da S. Valente Ferreira

**Manaus, Amazonas
Agosto, 2016**

Leonardo da Silva Valente Ferreira

Efeitos histopatológicos dos agrotóxicos deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos

Orientadora(s): Fabiola Xochilt Valdez Domingos/ Cláudia Pereira de Deus

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

**Manaus, Amazonas
Agosto, 2016**

**ATA DA DEFESA PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E PESCA INTERIOR**

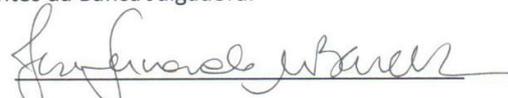
No dia 03 de Agosto de 2016, às 08:30 horas, no Auditório do PPG BADPI, Campus Aleixo II – INPA, reuniu-se a Banca Julgadora da **DEFESA PÚBLICA de Mestrado**, composta pelos seguintes membros titulares: Dr(a)s. José Fernando Marques Barcellos, Wallice Luiz Paxiúba Duncan e Andrea Viviana Waichman; tendo como membros suplentes: Dra. Lucia Helena Rapp Py-Daniel e o Dr. Edinaldo Nelson dos Santos Silva, a fim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO** do discente **LEONARDO DA SILVA VALENTE FERREIRA**, intitulada: **“Efeitos histopatológicos de agrotóxicos em quatro espécies de peixes Amazônicos”**. O estudo foi conduzido sob a orientação das Dras. Fabíola Xochilt Valdez Domingos e Claudia Pereira de Deus, ambas do INPA.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, (o)a discente foi arguido(a) oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

- Aprovada(o) por maioria
 - Aprovada(o) por unanimidade
 - Reprovada
- MENÇÃO: - Com “Distinção”
 - Com “Distinção e Louvor”

Foi lavrada a ata e assinada pelos membros presentes da Banca Julgadora.

Dr. José Fernando Marques Barcellos - UFAM



Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan - UFAM



Dra. Andrea Viviana Waichman - UFAM



Dra. Lucia Helena Rapp Py-Daniel - INPA



Dr. Edinaldo Nelson dos Santos Silva - INPA



Dra. Claudia Pereira de Deus
Coordenadora do PPG BADPI
PO. 244/2016 – INPA/MCT-PR

Esta Ata é um documento de comprovação único e exclusivo da Defesa Pública, não podendo ser usado para outro fim. O ÚNICO documento que comprova a titulação de MESTRE e DOUTOR é o respectivo DIPLOMA. O Regulamento do BADPI estabelece no seu Artigo 71 que, “Ao discente que houver completado todos os requisitos contidos nos Regulamentos Geral dos PPGs do INPA e do BADPI será conferido o título de Mestre ou Doutor, qualificado pela denominação do programa aprovado na CAPES completado com indicação, no diploma, da área de concentração, quando for o caso.” Para obtenção do título o estudante deve cumprir ainda, o exigido nos Arts. 72, 73 e 74 do Regulamento do BADPI.

Ficha catalográfica

F383 Ferreira, Leonardo da Silva Valente

Efeitos histopatológicos dos agrotóxicos deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron em quatro espécies de peixes amazônicos / Leonardo da Silva Valente Ferreira . --- Manaus: [s.n.], 2016.

42 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2016.

Orientador: Fabiola Xochilt Valdez Domingos

Sinopse:

Estudou-se os efeitos histopatológicos de quatro agrotóxicos mais comercializados em Manaus nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos, lesões de gravidade leve a moderadas foram observadas.

Palavras- chave: Poluentes, histopatologias branquiais, efeitos subletais

Agradecimentos

A minha orientadora Dra. Fabiola Xochilt Valdez Domingos que ao longo desse tempo me orientou sempre com paciência e dedicação e mesmo a distância nos últimos meses por conta de seu pós doutorado, esteve sempre presente e envolvida com o trabalho contribuindo muito para minha evolução profissional.

A minha orientadora substituta Dra. Cláudia Pereira de Deus que aceitou esta responsabilidade de substituir na orientação e sempre disposta a ajudar contribuiu muito para o andamento e finalização do trabalho.

Ao Laboratório Temático de Microscopia do INPA e o auxílio técnico recebido em especial ao Sr. Wilson responsável técnico do laboratório que foi imprescindível para a conclusão das análises de microscopia eletrônica de transmissão e ao Lucas por sua ajuda e dedicação principalmente durante as análises de microscopia ótica.

A turma do BADPI 2014 pelo companheirismo e ajuda ao longo desses anos, sem dúvida evoluímos muito de lá para cá.

A minha família e amigos que compreenderam minha ausência, estresse em alguns momentos, incertezas e reclamações, acreditaram em mim e me apoiaram até aqui.

Ao INPA e todos os professores que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

A UFAM, em especial a Dra. Andrea Waichman e a MSc. Thayana Cruz pela disponibilização das amostras para as análises.

A FAPEAM pela concessão da bolsa de estudo.

Resumo

Introdução: Nos últimos anos a atividade de agricultura na Amazônia intensificou-se para suprir a demanda de alimento na região. Contudo, esse crescimento levou ao uso intensivo de agrotóxicos. Além dos riscos diretos para a saúde humana é possível que esteja acontecendo a contaminação dos peixes pelos agrotóxicos que atingem os ambientes aquáticos. Análises histológicas tem se revelado uma importante ferramenta para compreender e identificar os efeitos subtletais de poluentes aquáticos. Neste estudo avaliamos como os principais agrotóxicos comercializados em Manaus (deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron) alteram a morfologia das brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos após exposição subletal. **Material e Métodos:** As espécies *Carnegiella strigata*, *Paracheirodon axelrodi*, *Hemigrammus rhodostomus* e *Colossoma macropomum* foram expostas à concentrações subletais de deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron por 96 horas. Foram realizadas análises histopatológicas semi-quantitativas em microscopia ótica (MO) e qualitativas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para identificar se houve diferença nos índices de lesão entre os grupos tratados e controle de cada espécie e o pós teste de Dunn para identificar quais grupos foram diferentes do controle. **Resultado e discussão.** As lesões observadas foram comuns em todos os tratamentos e espécies. Em MO foram observadas elevação do epitélio, hipertrofia e hiperplasia e fusões lamelares. Em MEV, perda das interdigitações nos filamentos e fusões lamelares. Em MET, descolamento do epitélio, espaços intercelulares dilatados, hiperplasia de células ricas em mitocôndrias e vacuolização intracelular. Estas lesões foram comuns às quatro espécies e funcionam como barreiras à entrada do agrotóxico e mecanismo compensatório para reestabelecer a função branquial, no entanto podem comprometer a saúde dos peixes. Alguns estudos relatam os mesmos efeitos histopatológicos em outras espécies de peixes causados por glifosato e deltametrina em concentrações similares. O índice de lesão branquial foi significativamente maior em *Hemigrammus rhodostomus* expostos ao imidacloprido e glifosato e em *Colossoma macropomum* expostos ao imidacloprido, deltametrina e diuron ($p < 0,05$). *Paracheirodon axelrodi* e *Carnegiella strigata* apresentaram efeito sugestivo após exposição ao glifosato (ambos) e deltametrina (somente, *Carnegiella strigata*) ($0,05 < p < 0,1$). *Colossoma macropomum* apresentou lesões mediante exposição de três dos quatro agrotóxicos avaliados sendo considerada a espécie mais sensível se comparada às demais. Esta maior vulnerabilidade pode estar relacionada com o estágio de vida da espécie, já que foram utilizados alevinos enquanto que para as demais espécies foram utilizados adultos nos experimentos. A espécie mais resistente foi *Paracheirodon axelrodi*, alguns trabalhos mostram que este gênero possui características fisiológicas e comportamentais que poderiam favorecê-lo a resistir diante da exposição aos agrotóxicos. O glifosato foi considerado mais tóxico causando histopatologias em 3 das 4 espécies avaliadas. **Conclusão:** O agrotóxico glifosato induziu lesões em mais espécies sendo considerado mais tóxico que os demais. A espécie *Paracheirodon axelrodi* foi a mais resistente e *Colossoma macropomum* a mais sensível à exposição aos 4 agrotóxicos. As lesões branquiais observadas são consideradas de leves a moderadas e apresentam potencial de serem reversíveis na ausência dos agrotóxicos.

Abstract

Histopathologic effects of agrochemicals in four fish species from Amazon

Introduction: Agricultural activity in the Amazon has been intensified to meet food demand in the region. This intensification has led to heavy and widespread pesticide use. In addition to the direct risks to human health, it is possible that fish are being contaminated by pesticides that reach aquatic environments. Histological analysis has been shown to be an important tool in understanding and identifying the sublethal effects of water pollutants. Here we evaluated how sub-lethal exposure to the principal agrochemicals sold in Manaus (deltamethrin, imidacloprid, glyphosate and diuron) alter the gill morphology of four species of Amazonian fish. **Methods:** The species *Carnegiella strigata*, *Paracheirodon axelrodi*, *Rhodostomus hemigrammus* and *Colossoma macropomum* were exposed to sub-lethal concentrations of deltamethrin, imidacloprid, glyphosate and diuron for 96 h. Histopathological semi-quantitative analyses, by optical microscopy (OM), and qualitative analyses, as scanning electron microscopy were performed (SEM) and transmission (TEM), were performed. The Kruskal-Wallis test was used to identify whether there were differences in the injury indexes between treated and control groups for each species, Dunn's test was used to identify which groups differed from the control. **Results and discussion:** In general, the observed lesions were common in all treatments and species. Through MO, we observed epithelium lifting, hypertrophy, hyperplasia, and lamellar fusion. Loss of microridges in the filaments and lamellar fusion were observed by SEM. The presence of epithelium lifting, dilation of intercellular spaces, hyperplasia on mitochondria rich cells and intracellular vacuolization. These injuries were observed in all four studied species. They can act as barriers to avoid the entry of pesticides as a compensatory mechanism intending to restore gill function, but may compromise fish health. Previous studies have reported similar histopathologic effects by glyphosate and deltamethrin in other fish species. The gill lesion index was significantly higher in *H. rhodostomus* after imidacloprid and glyphosate exposure and in *C. macropomum* exposed to imidacloprid, deltamethrin and diuron ($p < 0.05$). *P. axelrodi* and *C. strigata* showed suggestive effects after exposure to glyphosate and *C. strigata* after exposure to deltamethrin ($0.05 < p < 0.1$). *C. macropomum* presented injuries following exposure to three of the four pesticides tested and is thus considered the most of the sensitive species investigated here. The higher vulnerability of *C. macropomum* may be related to the life stage, since they were fingerlings, whereas the other fish species were adults. *P. axelrodi* was the most resistant species to the tested pesticides. Previous studies have shown that this genus has physiological and behavioural characteristics that may help to be resistant to the exposure to pesticides. The most toxic of the tested pesticides was Glyphosate, causing injury in three of the four species evaluated. **Conclusion:** Glyphosate was the most toxic of the agrochemicals tested here. *P. axelrodi* was most resistant and *C. macropomum* most sensitive to the tested pesticides. The gill lesions we observed were mild to moderate and could potential recover in the absence of pesticides.

1	Sumário	
	Introdução	1
1.1.	Hipóteses	6
1.2.	Objetivos	6
1.3.	Objetivos específicos	7
	Material e Métodos	7
1.4.	Modelos biológicos.....	7
1.5.	Experimentos.....	8
1.6.	Análises - Microscopia Óptica (MO)	10
1.7.	Análises - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	11
1.8.	Análises - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	11
1.9.	Análise estatística	11
	Resultados	12
1.10.	Efeitos estruturais dos agrotóxicos em MO	12
1.11.	Efeitos ultraestruturais dos agrotóxicos observados em MEV	16
1.12.	Efeitos ultraestruturais dos agrotóxicos observados em MET.....	21
	Discussão	25
1.13.	Efeitos estruturais dos agrotóxicos observados em MO.....	25
1.14.	Efeitos ultraestruturais dos agrotóxicos observados em MEV	29
1.15.	Efeitos ultraestruturais dos agrotóxicos observados em MET.....	30
	Conclusões.....	34
	Referências Bibliográficas.....	35

Introdução

Nos últimos anos a atividade de agricultura na Amazônia intensificou-se para suprir a demanda de alimento na região (WAICHMAN, 2008) e há expectativa de crescimento ainda maior devido à expansão e aumento da produção no Brasil, sendo considerada a última fronteira agrícola do país (PERES; SCHNEIDER, 2012). Contudo as culturas não são adaptadas aos solos e clima regional, aumentando a sua suscetibilidade ao ataque de pragas e desvantagens na competição com plantas nativas o que leva ao uso intensivo de agrotóxicos para combater estas pragas (WAICHMAN, 2008). Só no estado do Amazonas entre os anos de 1997 e 2012 o uso dessas substâncias passou de 3 para 1592 toneladas por ano segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola.

No entanto, o desconhecimento dos agricultores, associado ao uso indiscriminado com pouco ou nenhum acompanhamento técnico e ausência de fiscalização resulta em uso excessivo desses compostos químicos. O descarte inapropriado de suas embalagens e resíduos também contribuem para aumentar o risco de poluição no ambiente e também pode gerar consequências tanto para a saúde do agricultor quanto do consumidor de frutas e hortaliças que contenham resíduos de agrotóxicos (WAICHMAN *et al.*, 2002; 2003). Além dos riscos diretos para a saúde humana é possível que esteja acontecendo a contaminação dos peixes pelos agrotóxicos que atingem os ambientes aquáticos o que pode representar um risco adicional para os consumidores deste alimento (WAICHMAN, 2008).

Um levantamento de monitoramentos ecotoxicológicos em águas doces foi realizado pelos órgãos ambientais das unidades federativas brasileiras, conforme preconizado nos artigos 8º e 9º da Resolução CONAMA 357/2005, e constatou que somente quatro estados brasileiros (Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco) apresentam regulamentação estadual para o controle ecotoxicológico de efluentes (BERTOLETTI, 2012). Mas o que se observa é que mesmo nesses estados já se verificam efeitos tóxicos de poluentes em águas superficiais (BRITO, 2010; CAMARGO; MARTINEZ, 2007; SILVA, 2004; VALDEZ DOMINGOS *et al.*, 2007).

Na região amazônica o cultivo de hortaliças é desenvolvido em áreas de várzea ou terra firme próxima a corpos d'água (WAICHMAN *et al.*, 2002; 2003). Essas áreas propiciam solos mais férteis, facilitam a irrigação do cultivo e escoamento da produção, porém aumentam o risco dos agrotóxicos chegarem ao ambiente aquático. Um levantamento realizado em estabelecimentos que comercializam agrotóxicos em Manaus detectou que os agrotóxicos mais utilizados no ano de 2014 foram deltametrina, glifosato, imidacloprido e diuron (SOUZA, 2014).

A deltametrina é um pesticida piretróide que foi desenvolvido a partir de modificações químicas na estrutura das piretrinas naturais encontradas nos extratos das flores secas do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium* e *C. cocineum*) (CASARETT; DOULL, 2008). Este composto atua sobre os canais de sódio, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons Na⁺ para o interior da célula o que promove a despolarização da membrana e inibe o potencial de ação causando a paralisia e morte do inseto e em concentrações elevadas age sobre o ácido γ -aminobutírico (GABA) inibindo os canais de cloreto (PALMQUIST; SALATAS; FAIRBROTHER, 2012; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Seu mecanismo de ação é o mesmo para insetos e mamíferos embora seja considerado menos tóxico para este último (CASARETT; DOULL, 2008; PALMQUIST; SALATAS; FAIRBROTHER, 2012). Em experimentos realizados em ratos foi considerada hepatotóxica e nefrotóxica além de causar danos no DNA (CHARGUI *et al.*, 2013). A deltametrina é considerada muito tóxica para peixes, na espécie *Carassius carassius* que além da neurotoxicidade conhecida dos piretróides também pode ser cardiotoxicidade alterando os canais de Na⁺ (HAVERINEN; VORNANEN, 2014):

O imidacloprido é um inseticida neonicotinóide sintetizado a partir da nicotina natural (CASARETT; DOULL, 2008). Apresenta alto poder de lixiviação e transporte em água e difícil biodegradação (MARTINI *et al.*, 2012; TISLER *et al.*, 2009). É classificado como inseticida sistêmico (BAYER CROPS SCIENCE, 2014) que quando aplicado nas folhas, ramos e raízes das plantas, é rapidamente absorvido e translocado com a seiva para todo o sistema da planta em quantidades letais para os insetos que se alimentam dela. Ele atua como um agonista nos receptores de acetilcolina nicotínicos pós-sinápticos dos neurônios motores dos

insetos causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos (TOMIZAWA; CASIDA, 2003). O imidacloprido causou redução na atividade de acetilcolinesterase no cérebro e plasma em ratas tratadas com 10mg/kg ao dia (VOHRA; KHERA; SANGHA, 2014) e aumento nos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina na dose de 9,45 mg/kg (TOOR; SANGHA; KHERA, 2013), também ocasionou inibição da atividade de acetilcolinesterase em larvas de *Chironomus riparius* comprometendo seu processo fisiológico de ventilação (AZEVEDO-PEREIRA; LEMOS; SOARES, 2011). No entanto, em dafínideos expostos à concentração de 40 mg/l, as atividades da colinesterase, catalase e glutathione S-transferase não foram alteradas após exposição ao imidacloprido (TISLER *et al.*, 2009). O imidacloprido apresenta baixa toxicidade para mamíferos (BAYER CROPSCIENCE, 2014; TOMIZAWA; CASIDA, 2003) e o conhecimento de seus efeitos em peixes necessita ser ampliado. Em peixes amazônicos o imidacloprido apresentou menor toxicidade que outros agrotóxicos com valores de CL₅₀ variando entre 145,63 µg/l para *Carnegiella strigata* e 302,13 µg/l para *Hemigrammus rhodostomus* (SOUZA, 2014). Em campos de arroz tratados com esse agrotóxico peixes da espécie *Oryzias latipes* tiveram maior incidência parasitária quando comparados com outros tratamentos, muito provavelmente devido a depressão do sistema imune causado pelo poluente (SÁNCHEZ-BAYO; GOKA, 2005).

O glifosato é um herbicida pertencente à classe das glicinas e é considerado de baixa toxicidade pela sua modalidade bioquímica de ação. Ele atua sobre a atividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs) inibindo a rota de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina, tirosina e triptofano os quais são precursores de outros produtos, como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzoicos (AMARANTE JR; SANTOS, 2002). Em solos é considerado de baixa mobilidade, mas em ambientes aquáticos é bastante solúvel (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001) podendo trazer riscos para os organismos aquáticos. Peixes da espécie *Leporinus macrocephalus* apresentaram diversas doenças associadas ao fígado quando expostos a concentrações de 6,67 e 13,3 ml/l deste agrotóxico (ALBINATI *et al.*, 2007). Exemplares de jundiá (*Rhamdia quelen*) expostos a 1,21 mg/l tiveram redução da atividade da enzima

catalase e apresentaram maiores concentrações de glutathione reduzida - GSH e ácido ascórbico do que o peixes do grupo controle (FERREIRA, D. *et al.*, 2010).

O diuron é um herbicida pertencente ao grupo químico da ureia, apresentando-se sobre a forma de suspensão concentrada com eficiência no controle de plantas daninhas. Sua ação ocorre na cadeia de transporte de elétrons causando inibição da fotossíntese (FERREIRA, F. A.; ALBERTO; FERREIRA, 2005). Em doses de 125 mg/kg administradas diariamente em ratos machos houve redução da prole (FERNANDES *et al.*, 2007). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ele é considerado altamente tóxico para os organismos aquáticos, é solúvel em água e altamente persistente no meio ambiente. Este herbicida tem potencial de causar deformidade na coluna vertebral durante o desenvolvimento de embriões de peixes da espécie *Pagrus auratus* quando expostos a concentrações superiores a 50µg/l (GAGNON e RAWSON, 2009).

A exposição aos agrotóxicos pode causar diversos distúrbios em organismos vivos não alvo conforme relatado acima. A toxicidade dos agrotóxicos e de poluentes em geral pode ser influenciada por diversos fatores como as propriedades físico-químicas do poluente, dos produtos resultantes de sua biotransformação, sua concentração, tipo de descarga (intermitente ou contínua) e persistência no meio (ADEDEJI; OKOCHA, 2012; CASARETT; DOULL, 2008; COSTA *et al.*, 2008; HOFFMAN; RATTNER; BURTON, 2002; POSTHUMA; SUNTERII; P.TRAAS, 2002). A sensibilidade aos poluentes varia de acordo com a espécie, algumas espécies podem apresentar maior sensibilidade que outras em relação a uma mesma substância e isso está relacionado com a sua morfologia, fisiologia, história de vida e comportamento (POSTHUMA *et al.*, 2002).

Para determinar quais concentrações são mais adequadas para a proteção dos ecossistemas são realizados experimentos para gerar uma distribuição da sensibilidade das espécies a um poluente, dentre eles estão os experimentos de toxicidade aguda que determinam a concentração de uma substância em que uma espécie suporta sobreviver (SPRAGUE, 1969). Estes experimentos mostram quais concentrações são letais para o organismo em estudo, determinando a concentração letal que causa mortalidade de 50% dos indivíduos expostos (CL₅₀).

No entanto, mesmo que a concentração não seja alta o suficiente para causar mortalidade ela pode estar associada a efeitos subletais que podem envolver mudanças sutis no comportamento, morfologia e fisiologia e interferir tanto na sobrevivência quanto na reprodução destes organismos (LAWRENCE; HEMINGWAY, 2003).

Análises histológicas tem se revelado como uma importante ferramenta para compreender e identificar os efeitos subtletais de poluentes aquáticos (CAMARGO; MARTINEZ, 2007; CASARETT; DOULL, 2008; DYK; COCHRANE; WAGENAAR, 2012). Geralmente os órgãos mais vulneráveis de peixes expostos a poluentes são o fígado, os rins, o cérebro e as brânquias (BERNET *et al.*, 1999). Estes órgãos tendem a apresentar alterações após exposição a poluentes sendo bastante utilizados para avaliar os efeitos da poluição aquática (SCHWAIGER *et al.*, 1997; CAMARGO; MARTINEZ, 2007; CANTANHÊDE *et al.*, 2014). As brânquias estão entre os primeiros órgãos a apresentarem alterações histológicas, pois possui contato direto com o meio externo onde se encontra o poluente (LAWRENCE & HEMINGWAY, 2003). As análises histopatológicas também têm sido utilizadas para identificar os efeitos dos agrotóxicos sobre os peixes. O herbicida Reward® em concentrações de 0,31 e 0,35ml/l tem capacidade para induzir lesões como hiperplasia nas células de revestimento e fusão apical das lamelas secundárias nas brânquias de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e em concentrações de 0,39 e 0,43 ml/l, induzir lesões mais severas como necrose dos hepatócitos (HENARES *et al.*, 2008). O glifosato em concentrações de 6,67 e 13,3 ml/l desencadeou alterações no tecido hepático de *Leporinus macrocephalus* (ALBINATI *et al.*, 2007). Exemplares de *Gambusia affinis* e *Cyprinus carpio* expostos a deltametrina nas concentrações de 0,25 a 0,50 µg/l e 0,029 a 0,041 mg/l, respectivamente, também apresentaram diversas lesões, sendo as mais comuns descolamento do epitélio e necrose das brânquias (CENGIZ; UNLU, 2006; CENGIZ, 2006).

Uma revisão recente demonstrou que a maioria dos trabalhos com ensaios toxicológicos no Brasil tem sido realizados com espécies exóticas de regiões temperadas (KRULL; BARROS, 2012) sendo necessário ampliar os estudos para conhecer os efeitos dos poluentes em espécies nativas mais relevantes para a região tropical e assim definir limiares de substâncias tóxicas permissíveis que

possam ser utilizados como referência para as entidades reguladoras para a tomada de decisões. Portanto, é de suma importância o conhecimento dos efeitos de poluentes sobre a biodiversidade Amazônica para a definição de padrões de qualidade ambiental. Neste contexto o estudo dos efeitos de agrotóxicos em peixes amazônicos contribuirá com a ampliação do conhecimento de espécies tropicais.

Na Amazônia diversas espécies se destacam pelo seu potencial econômico, tanto para alimentação como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) peixe muito apreciado na região, quanto para aquariofilia como as espécies *Carnegiella strigata*, *Paracheirodon axelrodi* e *Hemigrammus rhodostomus*. Estas espécies foram selecionadas para o estudo, pois são comumente encontradas nos ecossistemas amazônicos. A seleção foi feita com base em critérios que consideraram as informações disponíveis sobre a taxonomia, biologia das espécies, abundância, acessibilidade e a facilidade de captura.

A sensibilidade (CL₅₀) aos agrotóxicos mais utilizados na região foram recentemente determinada para essas quatro espécies amazônicas (SOUZA, 2014), contudo, ainda é necessário estudar quais os efeitos subletais que estas espécies podem apresentar quando sobrevivem a presença destes agrotóxicos.

Neste estudo avaliamos como os principais agrotóxicos comercializados em Manaus (deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron) alteram a morfologia das brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos após exposição subletal.

Hipóteses

- Peixes Amazônicos expostos a concentrações subletais de agrotóxicos apresentarão alterações histopatológicas nas brânquias.
- Peixes de uma mesma espécie expostos a diferentes agrotóxicos apresentarão graus de lesão tecidual diferente.
- Peixes de diferentes espécies expostos a um mesmo agrotóxico apresentarão diferentes graus de lesões teciduais.

Objetivos

Identificar se os quatro agrotóxicos mais comercializados em Manaus causam alterações histopatológicas nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos em concentrações subletais.

Objetivos específicos

- Identificar as lesões no tecido branquial das espécies *Colossoma macropomum*, *Carnegiella strigata*, *Paracheirodon axelrodi* e *Hemigrammus rhodostomus* após exposição aguda aos agrotóxicos deltametrina, diuron, imidacloprido e glifosato de forma qualitativa e semi-quantitativa.
- Identificar qual agrotóxico induz alterações branquiais em maior número de espécies.
- Identificar qual ou quais espécies são mais sensíveis e mais resistentes à presença de agrotóxicos do ponto de vista histopatológico.

Material e Métodos

Modelos biológicos

Paracheirodon axelrodi (Characiformes: Characidae) conhecido popularmente como cardinal é encontrado principalmente na bacia do Rio Negro, e se alimenta essencialmente predando organismos da mesofauna associada a vegetação aquática (WALKER, 2004). A espécie possui desova parcelada com ovos adesivos (ANJOS, 2006) e possui grande importância econômica no mercado de aquarofilia, sendo a principal espécie no comércio de exportação deste gênero (ANJOS, H. D. DOS *et al.*, 2009), (Figura 1).

O gênero *Hemigrammus* (Characiformes: Characidae) ao qual pertence a espécie *Hemigrammus rhodostomus*, apresenta grande distribuição na bacia amazônica, ocorrendo em rios de águas claras e negras (CARVALHO; BERTACO; JEREP, 2010; JEREP; CARVALHO; BERTACO, 2011; MANCERA-RODRÍGUEZ; ÁLVAREZ-LEÓN, 2008). Essa espécie é originária do rio Orinoco (MANCERA-RODRÍGUEZ; ÁLVAREZ-LEÓN, 2008). O gênero apresenta peixes onívoros e de grande importância no comércio de peixes ornamentais (Figura 1).

Carnegiella strigata (Characiformes: Gasteropelecidae) é uma espécie que ocorre nas regiões baixa e média do rio Amazonas (WEITZMAN; PALMER, 2003) e é abundante em águas claras e pretas de regiões alagadas da Amazônia (MENDONÇA, 2002). Esta espécie possui hábito alimentar generalista sendo

fortemente insetívora (SANTOS, S. M. DOS, 2005) e é bastante apreciada na aquariofilia (Figura 1).

Colossoma macropomum (Characiformes: Characidae) é um peixe muito apreciado para alimentação, habita as planícies de inundação sendo encontrado em toda bacia amazônica (FARIAS *et al.*, 2010). Seu alimento principal são os frutos que caem da floresta (LOWE-MCCONNELL, 1999), (Figura 1).

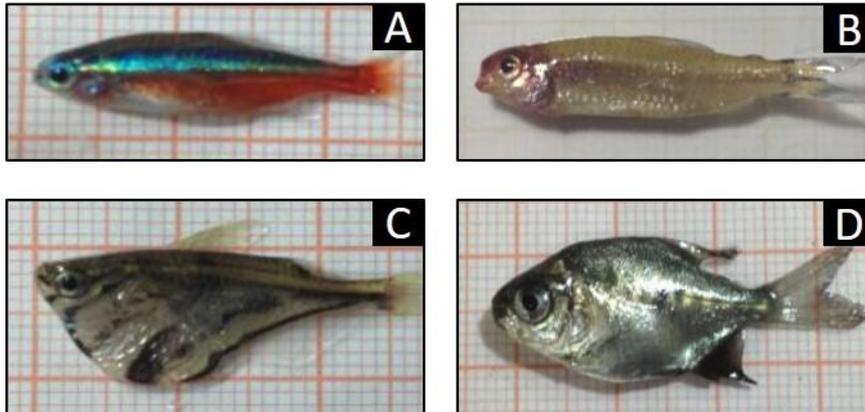


Figura 1: A. *Paracheirodon axelrodi*. B. *Hemigrammus rhodostomus*. C. *Carnegiella strigata*. D. *Colossoma macropomum* (SOUZA, 2014).

Experimentos

Este estudo foi realizado em colaboração com a Dra. Andrea Waichman, Laboratório de fisiologia animal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os experimentos agudos para determinar a concentração letal (CL_{50}) dos agrotóxicos foram realizados por Souza (2014) utilizando os agrotóxicos: Deltametrina (Poison 10g/L), Diuron (Diuron Nortox 500g/L), Imidacloprido (Provado 200g/L) e Glifosato (Gliz 480g/L) e as espécies de peixes amazônicos: *Carnegiella strigata* ($3,3 \pm 0,3$ cm), *Paracheirodon axelrodi* ($2,4 \pm 0,2$ cm), *Hemigrammus rhodostomus* ($3,7 \pm 0,3$ cm) e *Colossoma macropomum* ($3,6 \pm 0,3$ cm). As espécies foram obtidas na fase sub-adulto, com exceção de *Colossoma macropomum* obtido na fase de alevino. Os peixes foram aclimatados em condições laboratoriais em aquários de 100 L e tanques de 500 L contendo água de poço da UFAM (temperatura 26°C ; pH = 6,8; oxigênio dissolvido $> 4\text{mg/L}$; condutividade $14,52 \mu\text{S/cm}$; dureza $0,89 \text{mg CaCO}_3/\text{L}$; $\text{Na}^+ = 1,90 \text{mg/L}$; $\text{NH}_4 = 0,084 \text{mg/L}$; $\text{K}^+ = 3,28 \text{mg/L}$) durante, no mínimo, sete dias

antes do início dos testes agudos. Ao longo desse período, os peixes foram alimentados com ração comercial (Sera Discus Color Red – Proteína Bruta: 53%) de duas a quatro vezes por dia. Durante a aclimação houve renovação de água a cada 24h.

Os experimentos tiveram duração de 96 horas e consistiram de um grupo controle (20 animais) e mais 5 tratamentos correspondentes a 5 diferentes concentrações (20 animais em cada tratamento) de cada um dos agrotóxicos citados para cada espécie de peixe. A realização dos testes de toxicidade aguda com os peixes foi autorizada pelo Comitê de Ética Animal -UFAM conforme o protocolo 016.

Para a realização deste estudo foram coletados peixes apenas na maior concentração que não causou mortalidade a fim de possibilitar a avaliação dos efeitos subletais dos agrotóxicos. Além disso foram coletados peixes do grupo controle para comparação dos resultados (tabela 1).

Tabela 1: Concentrações nominais dos agrotóxicos utilizadas nos experimentos (mg/L).

Concentração subletal (mg/l)/ Espécie	<i>Carnegiella strigata</i>	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	<i>Hemigrammus rhodostomus</i>	<i>Colossoma macropomum</i>
Controle	0	0	0	0
Diuron	NC	NC	13,5	16,5
Deltametrina	0,0035	0,003	0,004	0,002
Imidacloprido	134,0	177,0	149,6	116,0
Glifosato	3,5	4,0	5,0	2,0

NC: amostras não coletadas

Após anestesia com benzocaína (100mg/l) os peixes foram submetidos ao processo de fixação química. Para microscopia ótica a fixação dos peixes foi realizada em ALFAC (álcool, formol e ácido acético). Após 16 horas o fixador foi substituído por etanol 70%.

Para a microscopia eletrônica a fixação dos arcos branquiais de todas as espécies foi realizada com glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M.

Todas as amostras foram armazenadas no Laboratório de Microscopia Ótica e Eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia onde foram processadas e analisadas.

Análises - Microscopia Óptica (MO)

Foi coletado o segundo arco branquial esquerdo de cada exemplar para as análises em MO, onde de modo geral, um total de 80 exemplares por espécie foram analisados, sendo 10 analisados para os tratamentos com deltametrina, 10 para imidacloprido, 10 para diuron, 10 para glifosato e 10 para seus respectivos controles. Para alguns tratamentos não foi possível realizar coleta dos espécimes, como consta na Tabela 1.

Antes de realizar os processos de emblocagem, exemplares de todas as espécies passaram por processo de descalcificação em EDTA 10% a fim de possibilitar a realização dos cortes e preparação das lâminas. Em seguida as amostras foram desidratadas em uma bateria crescente de etanol e inclusão em Paraplast (processador de tecidos Leica TP 102). Foram obtidos cortes de 5µm (Micrótomo RM2245 Leica) e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina para análise em microscópio ótico (ZEISS Axiophot 2).

A frequência das lesões histopatológicas observadas na extensão do arco branquial foram analisadas de forma semi-quantitativa segundo o protocolo proposto por Bernet *et al.* (1999). Em resumo, as alterações histológicas observadas foram identificadas e em seguida um fator de importância foi atribuído para cada alteração de acordo com seu grau de agressividade e reversibilidade proposto pelo autor (1,2,3) e um valor de ocorrência/frequência foi atribuído de acordo com a abrangência da alteração ao longo do tecido observado sendo considerado: 0 (ausente, 0 a 10% do tecido), 2 (ocorrência leve, 11 a 30% do tecido), 4 (ocorrência moderada 31 a 70% do tecido) e 6 (ocorrência extensa 71 a 100% do tecido). O índice de lesão foi calculado da seguinte forma:

$$IL = \sum FI * O$$

Onde: IL = índice de lesão, FI = fator de importância, O = ocorrência no tecido.

Os valores do fator de importância e da ocorrência foram multiplicados para cada alteração e os resultados de todas as alterações identificadas foram somados para gerar um índice de lesão branquial para cada peixe analisado.

Análises - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Em microscopia eletrônica de varredura foi analisado o segundo arco branquial direito de cada exemplar. Um total de 40 exemplares por espécie foram analisados sendo 5 peixes analisados por tratamento com deltametrina, 5 por imidacloprido 5 por diuron, 5 por glifosato e 5 peixes correspondentes à cada um de seus respectivos controles. Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, submetidos ao ponto crítico (Baltec CPD 030) e metalização em ouro (Baltec SCD 050) para análise em microscópio eletrônico de varredura (Leo 435 VP). Os espécimes que apresentaram alguma alteração ou variação anatômica foram avaliados de forma qualitativa, ou seja, foram registrados e fotografados os tipos de lesões observadas.

Análises - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para as análises em MET foram utilizados o terceiro arco branquial direito. O número e distribuição de exemplares para análise qualitativa em microscopia eletrônica de transmissão foi igual ao descrito no item anterior. Os tecidos passaram por um processo de pós-fixação em tetróxido de ósmio e pré-contrastação em acetato de uranila, em seguida foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e emblocados em resina Ducurpan. Foram obtidos cortes ultrafinos de 10nm (Ultramicrotomo Reichert OMU3) e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo para análise em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada somente com os dados semi-quantitativos obtidos em microscopia ótica. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para identificar se houve diferença nos índices de lesão entre os grupos tratados e controle de cada espécie e o pós teste de Dunn para identificar quais grupos foram diferentes do controle. Consideramos como diferença significativa $p \leq 0,05$ e valores de p entre 0,05 e 0,10 como efeito sugestivo segundo Murtagh (2014) e Ramsey; Schafer (2002).

Resultados

Efeitos estruturais dos agrotóxicos em MO

As brânquias dos peixes analisados neste estudo apresentaram morfologia similar à maioria dos teleósteos nos quais observam-se inúmeras lamelas que estão ancoradas nos filamentos branquiais e apresentam-se paralelas entre si. As lamelas apresentam espaços interlamelares bem definidos, sendo a camada de células do epitélio intimamente ligadas às demais células das lamelas conferindo um aspecto uniforme e contínuo. Essas estruturas podem ser observadas nas figuras 1 A para *Carnegiella strigata*, 1 B para *Hemigrammus rhodostomus*, 1 C para *Paracheirodon axelrodi*, e 1 D para *Colossoma macropomum*.

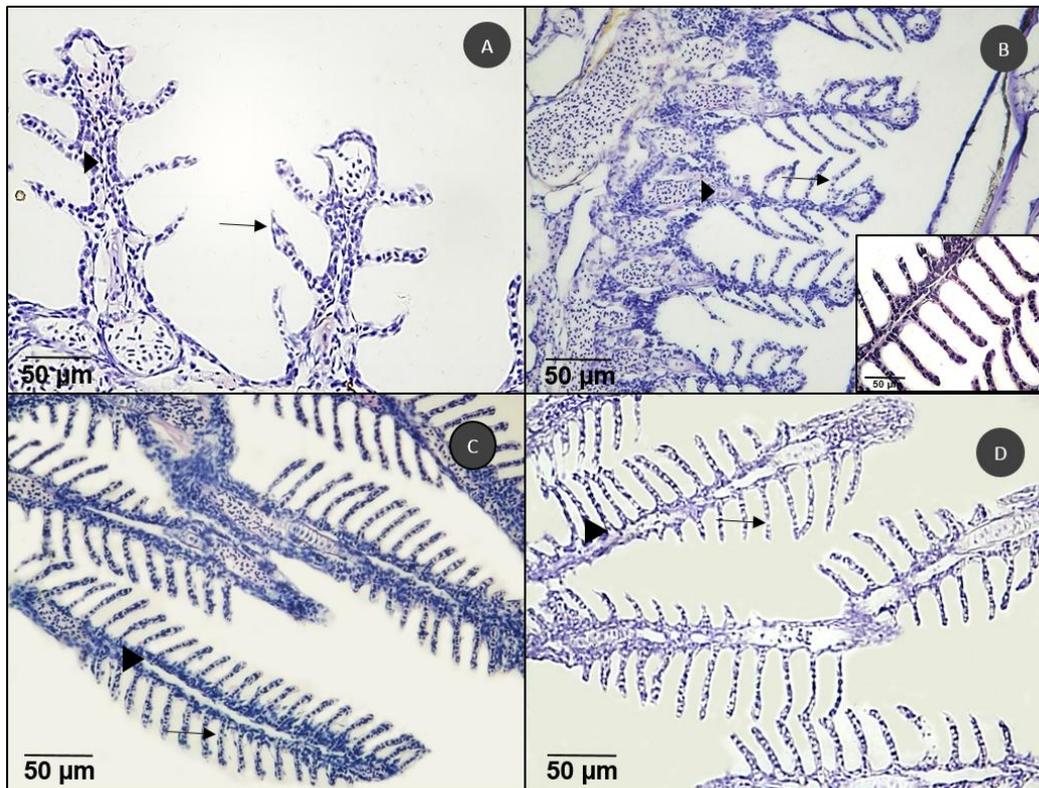


Figura 1: Estrutura branquial de quatro espécies de peixes amazônicos. Brânquia controle de: A. *Carnegiella strigata*. B. *Hemigrammus rhodostomus*. C. *Paracheirodon axelrodi*. D. *Colossoma macropomum*. Filamento branquial (cabeça de seta), lamelas (setas). HE.

As principais lesões branquiais observadas nas quatro espécies foram consideradas de leves a moderadas segundo sua capacidade de afetar a função das brânquias de acordo com a caracterização realizada por Bernet *et al.*, (1999). As lesões leves foram: elevação ou descamação do epitélio das lamelas secundárias, caracterizado pelo surgimento de espaço entre as células epiteliais e as células pilares (Figuras 2: A, B, C) e hiperplasia das células epiteliais, representada pela proliferação das células na região interlamelar com aumento da espessura do epitélio (Figuras 2: A, B, C, D). A lesão de gravidade moderada observada foi a fusão das lamelas secundárias adjacentes com redução de superfície em contato com o meio externo (Figuras 2: B, D).

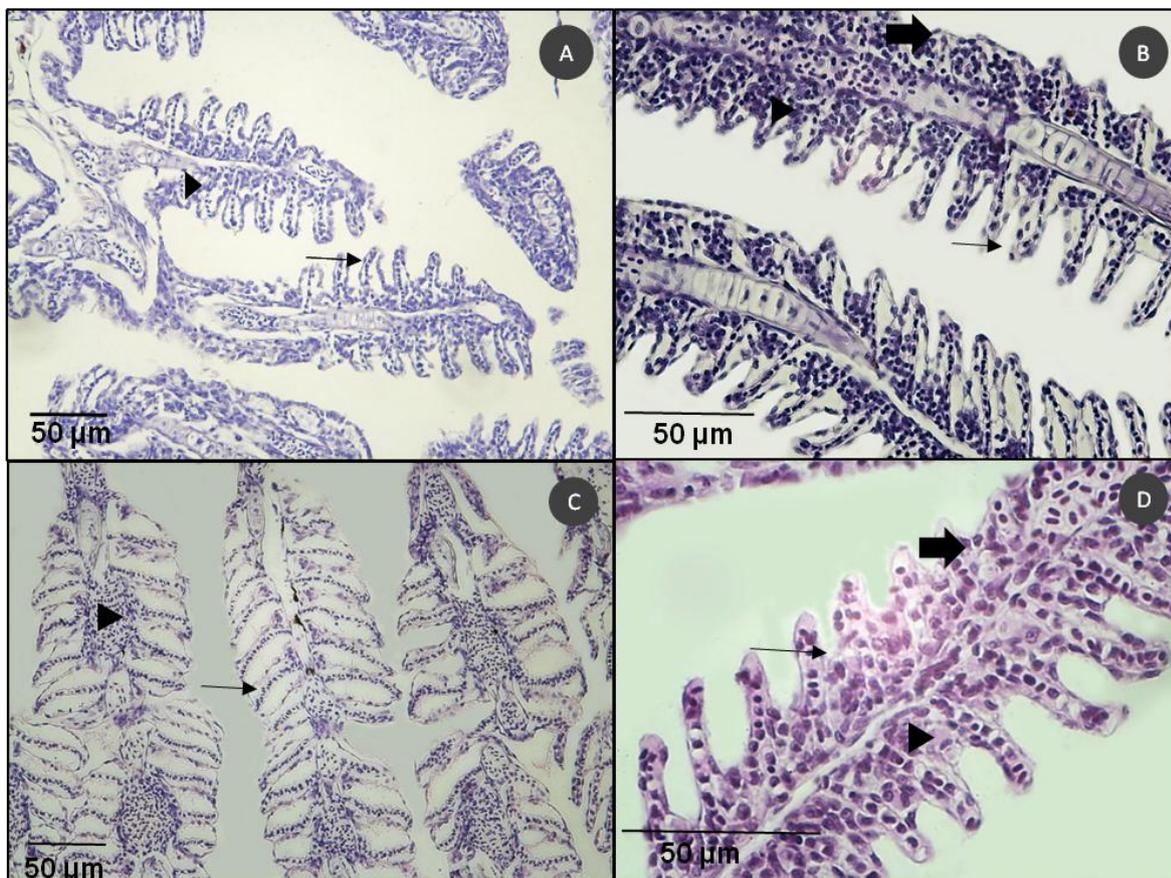


Figura 2: Efeito dos pesticidas glifosato, imidacloprido, deltametrina e diuron nas brânquias de quatro espécies de peixes amazônicos: A. *Carnegiella strigata* exposta ao glifosato. B. *Hemigrammus rhodostomus* exposto à deltametrina. C. *Colossoma macropomum* exposto ao diuron D. *Paracheirodon axelrodi* exposto ao glifosato: Mostrando descamação do epitélio lamelar (seta), hiperplasia das células epiteliais (cabeça de seta) e fusão lamelar (seta preta) HE.

As alterações na estrutura branquial observadas foram frequentes em todas as espécies e em todos os tratamentos, no entanto foram menos frequentes nos grupos controle de cada espécie. Lesões específicas causadas por um determinado agrotóxico não foram observadas. Elevação do epitélio e hiperplasia das células epiteliais foram as lesões branquiais mais prevalentes em todas as espécies. A ocorrência de fusões lamelares foi observada com maior frequência em *Paracheirodon axelrodi* e em *Hemigrammus rhodostomus*.

Em *Paracheirodon axelrodi* o glifosato apresentou efeito sugestivo ($p=0,069$) em causar lesões branquiais apresentando índice de lesão maior que o controle (Figura 3: A). Nos demais tratamentos, não foi observada nenhuma diferença significativa ou sugestiva.

Em *Carnegiella strigata*, os pesticidas deltametrina e glifosato apresentaram efeito sugestivo nos índices de lesão em relação ao controle ($p= 0,0889$; $0,0573$ respectivamente; Figura 3: B).

Em *Colossoma macropomum*, a deltametrina, o diuron e o imidacloprido foram os agrotóxicos que apresentaram índices de lesão superiores aos do controle sendo potenciais causadores de lesões braquiais ($p= 0,028$; $0,004$; $0,001$ respectivamente) (Figura 3: C).

Em *Hemigrammus rhodostomus*, o glifosato e imidacloprido induziram índices de lesão significativamente superior ao controle ($p= 0,002$ e $0,042$ respectivamente), e ao do agrotóxico diuron ($p= 0,004$ e $0,046$ respectivamente), mostrando serem mais lesivos que este (Figura 3: D).

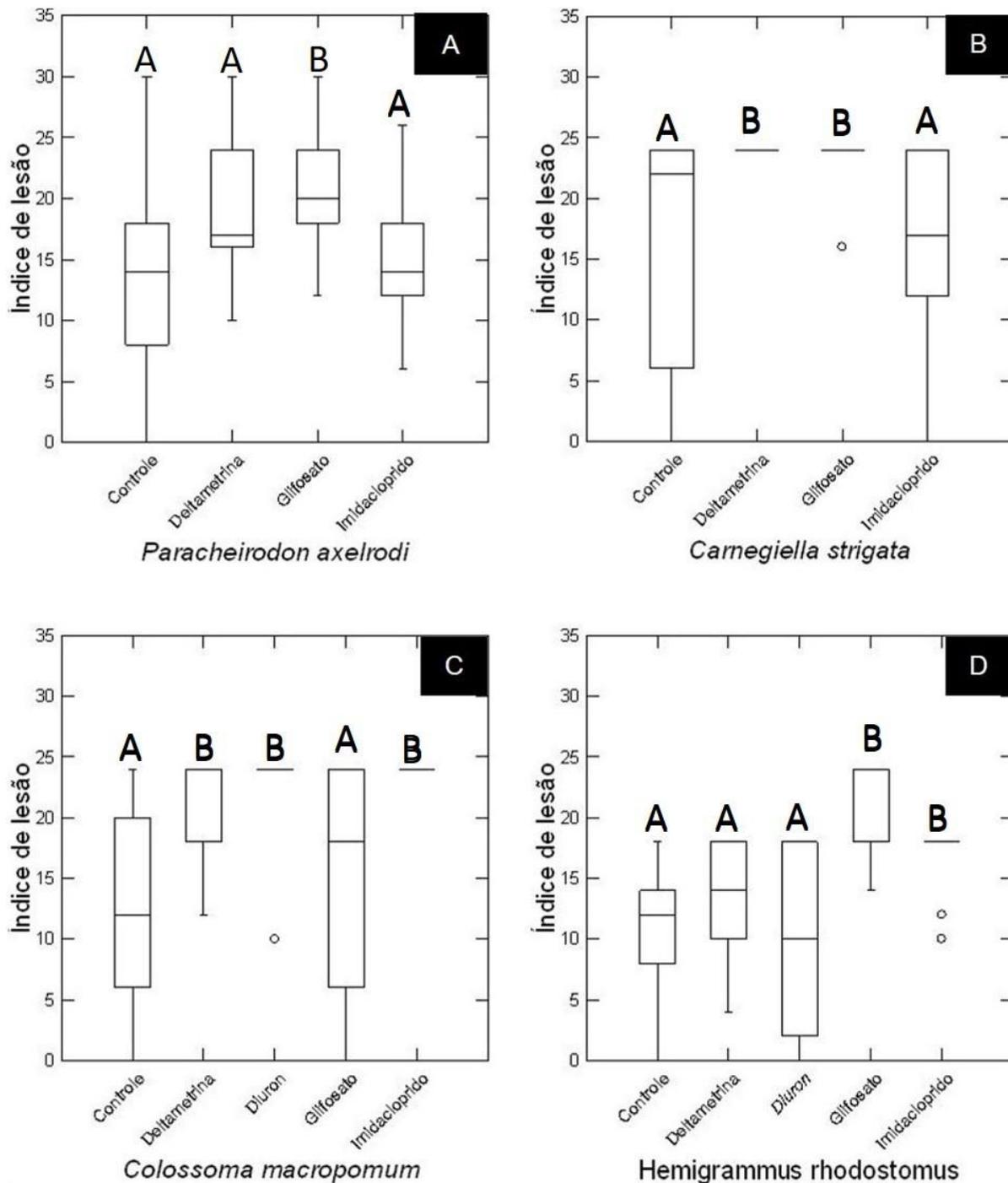


Figura 3: Índice de lesão branquial de peixes expostos a pesticidas. A. *Paracheirodon axelrodi*, B. *Carnegiella strigata*, C. *Colossoma macropomum*. D. *Hemigrammus rhodostomus*. Letras: A = tratamentos significativamente iguais ao controle; B = tratamentos significativamente diferentes do controle. Linhas horizontais = Médias dos tratamentos; Retângulos = Medidas de dispersão; Linhas verticais = Medidas de distribuição da amostra; ° = outliers (observações atípicas).

Efeitos ultraestruturais dos agrotóxicos observados em MEV

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar com detalhes as estruturas normais da superfície branquial, bem como suas alterações nas espécies de peixes avaliadas. A estrutura branquial típica de cada espécie está representada pelos seus respectivos grupos controle e apresentam a estrutura dos filamentos e lamelas bem definidas (*Carnegiella strigata*, Figuras 4: A, B), (*Paracheirodon axelrodi*, Figuras 5: A, B), (*Hemigrammus rhodostomus*, Figuras 6: A, B) e (*Colossoma macropomum*, Figuras 7: A, B). Do arco branquial projetam-se os filamentos branquiais que estão dispostos colateralmente um do outro, de cada filamento projetam-se inúmeras lamelas paralelas entre si (Figuras 4:6:7: A, B; 5: A). A superfície filamentar apresenta muitas microcristas ou microdigitações que são projeções das células pavimentosas que revestem o filamento branquial dando a ele um aspecto pregueado (Figuras 4:5:6:7: B). Já a superfície das lamelas é mais lisa com poucas ou nenhuma microdigitação (Figuras 4:6:7: B).

As alterações mais comuns foram alterações (Figura 4: C, D) e redução nas interdigitações na superfície dos filamentos branquiais, presente em todos os grupos analisados (Figuras 5:6:7: C; 7: D) e fusões lamelares observadas em *Paracheirodon axelrodi* (Figura 5: E) e *Hemigrammus rhodostomus* (Figura 6: D). Foram observadas lesões menos comuns como hipertrofia das células do pavimento filamentar em *Paracheirodon axelrodi* (Figura 5: D) e alteração da superfície filamentar como surgimento de fissuras centrais nos filamentos de *Hemigrammus rhodostomus* (Figura 6: E) e superfície filamentar irregular em *Colossoma macropomum* (Figura 7: E).

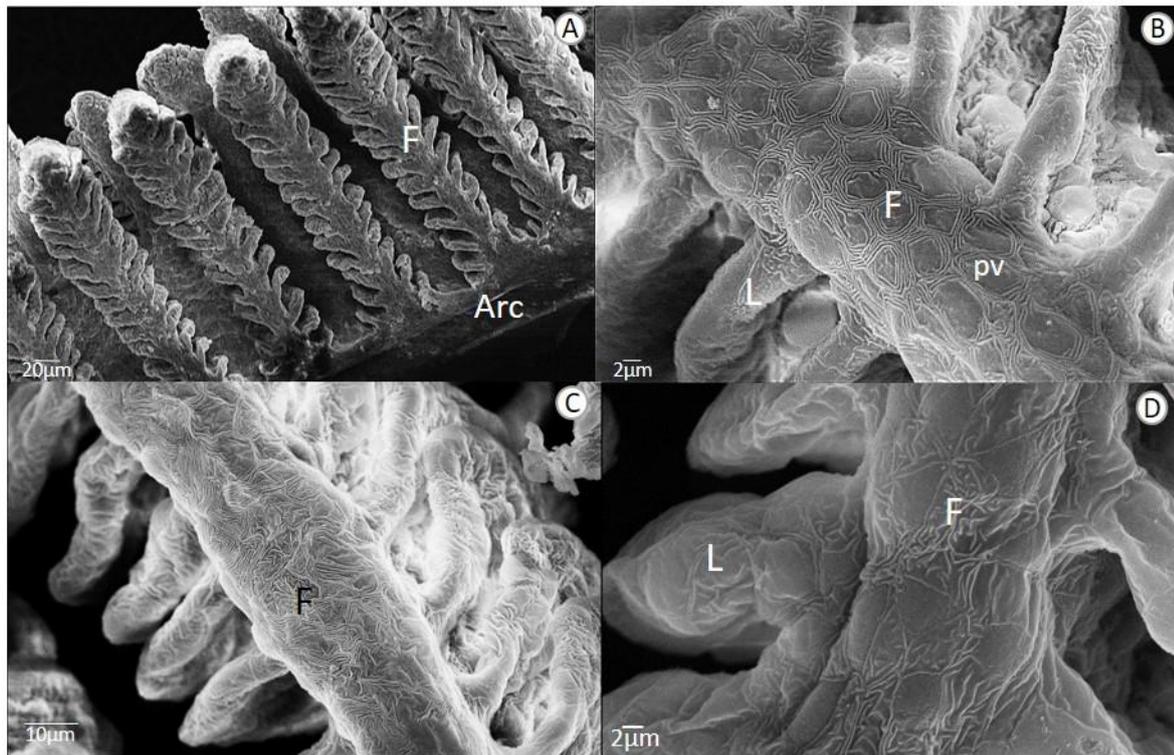


Figura 4: Brânquias de *Carnegiella strigata*. A-B. Observe os filamentos (F), lamelas branquiais (L) e detalhes dos filamentos, lamelas e interdigitações na superfície filamental de peixes do grupo controle. C-D. Observe: alteração nas interdigitações da superfície filamental após exposição ao glifosato. Arc = Arco branquial. pv = célula pavimentosa.

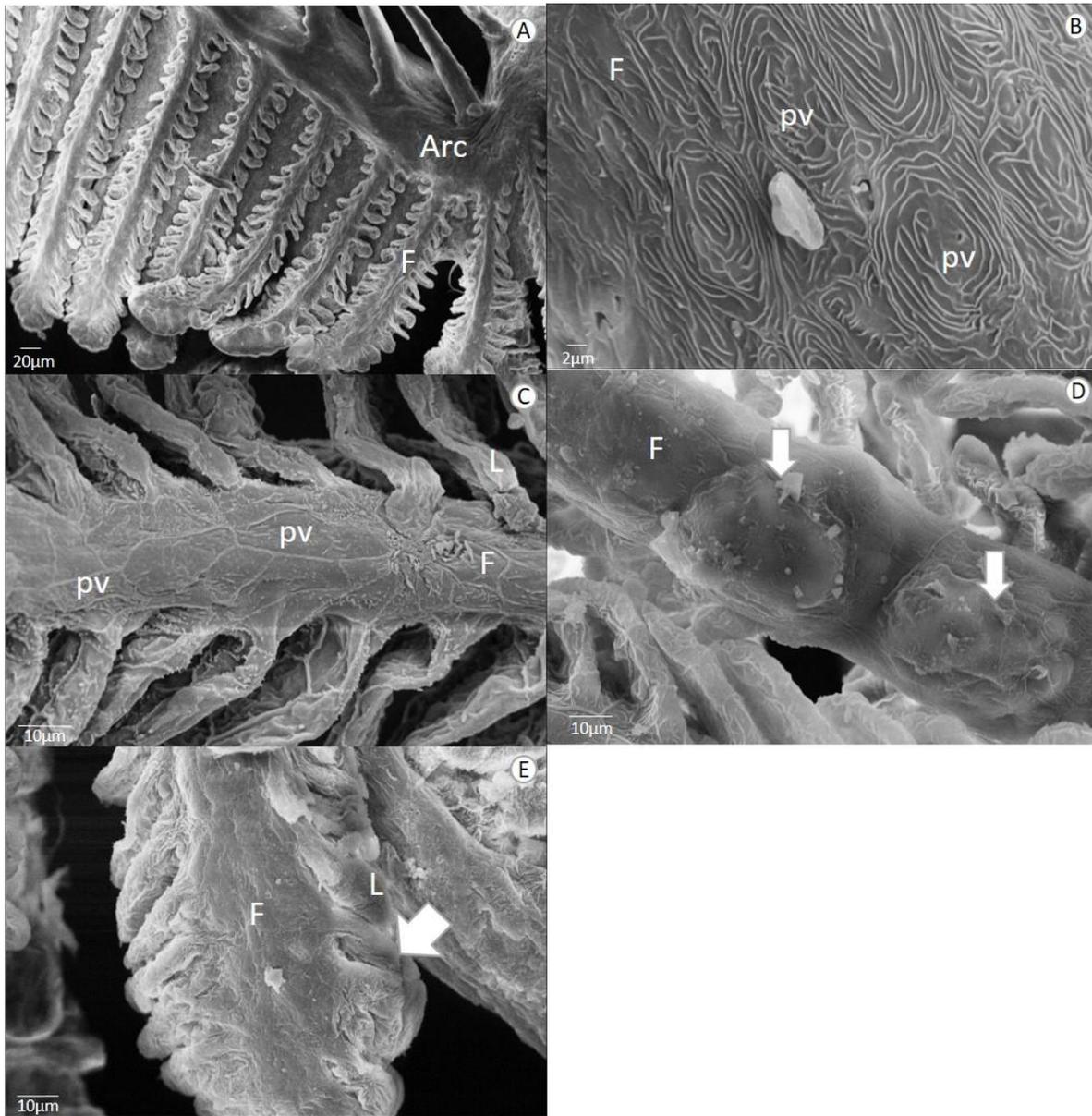


Figura 5: Brânquias de *Paracheirodon axelrodi*. A-B. Observe os filamentos (F), lamelas branquiais (L) e interdigitações na superfície filamental de peixes do grupo controle. Observe: C. perda das interdigitações na superfície filamental em exemplares expostos ao imidacloprido. D. hipertrofia das células pavimentosas (setas) e em E. fusão parcial (seta) em exemplares expostos ao glifosato. Arc = Arco branquial. pv = célula pavimentosa.

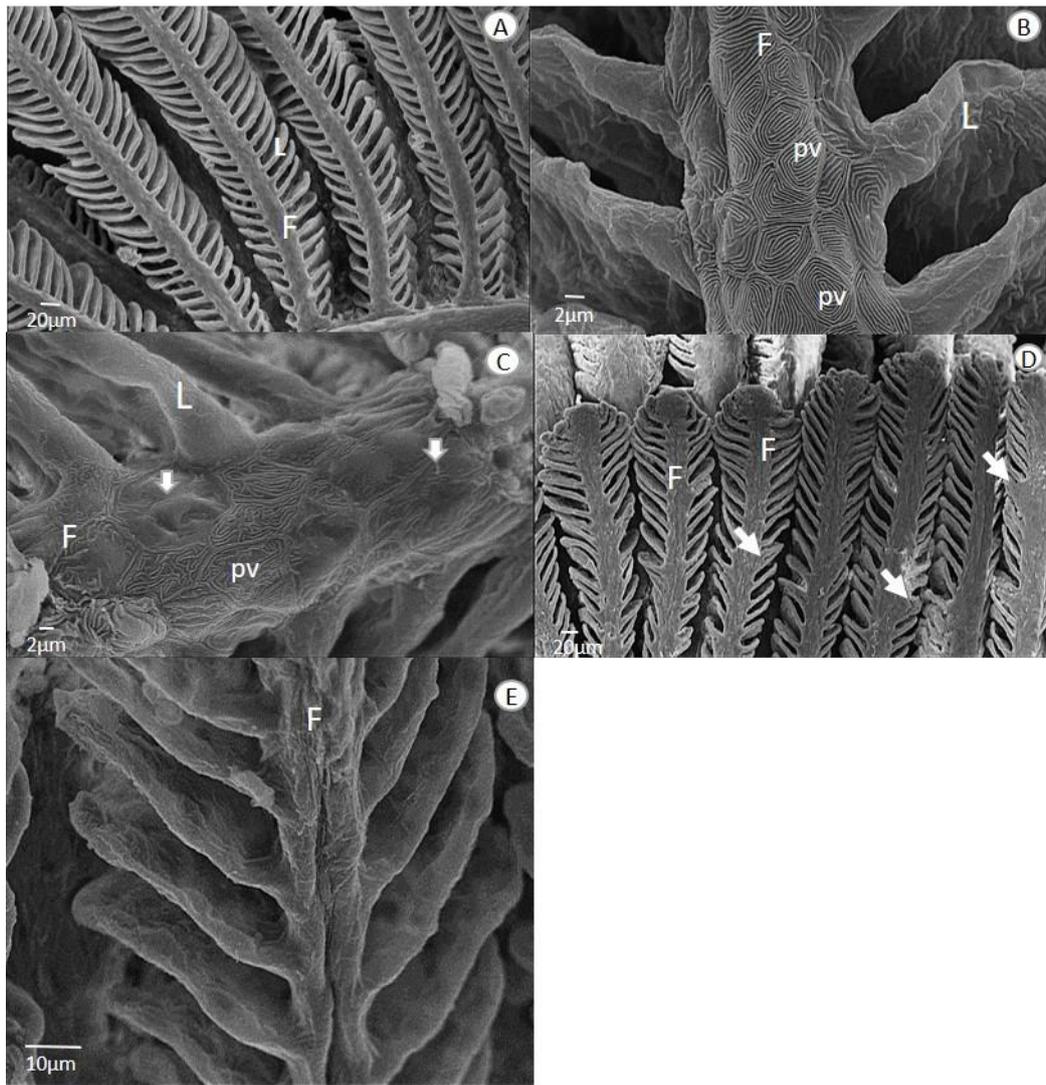


Figura 6: Brânquias de *Hemigrammus rhodostomus*. A-B. Observe os filamentos (F), lamelas branquiais (L) e detalhes dos filamentos, lamelas e interdigitações na superfície filamentar de peixes do grupo controle. Observe: C. perda das interdigitações na superfície filamentar nas brânquias expostas à deltametrina. D fusões lamelares nas brânquias expostas ao glifosato e em E. alterações na superfície com surgimento de fissura central no filamento nas brânquias expostas ao diuron. pv = célula pavimentosa.

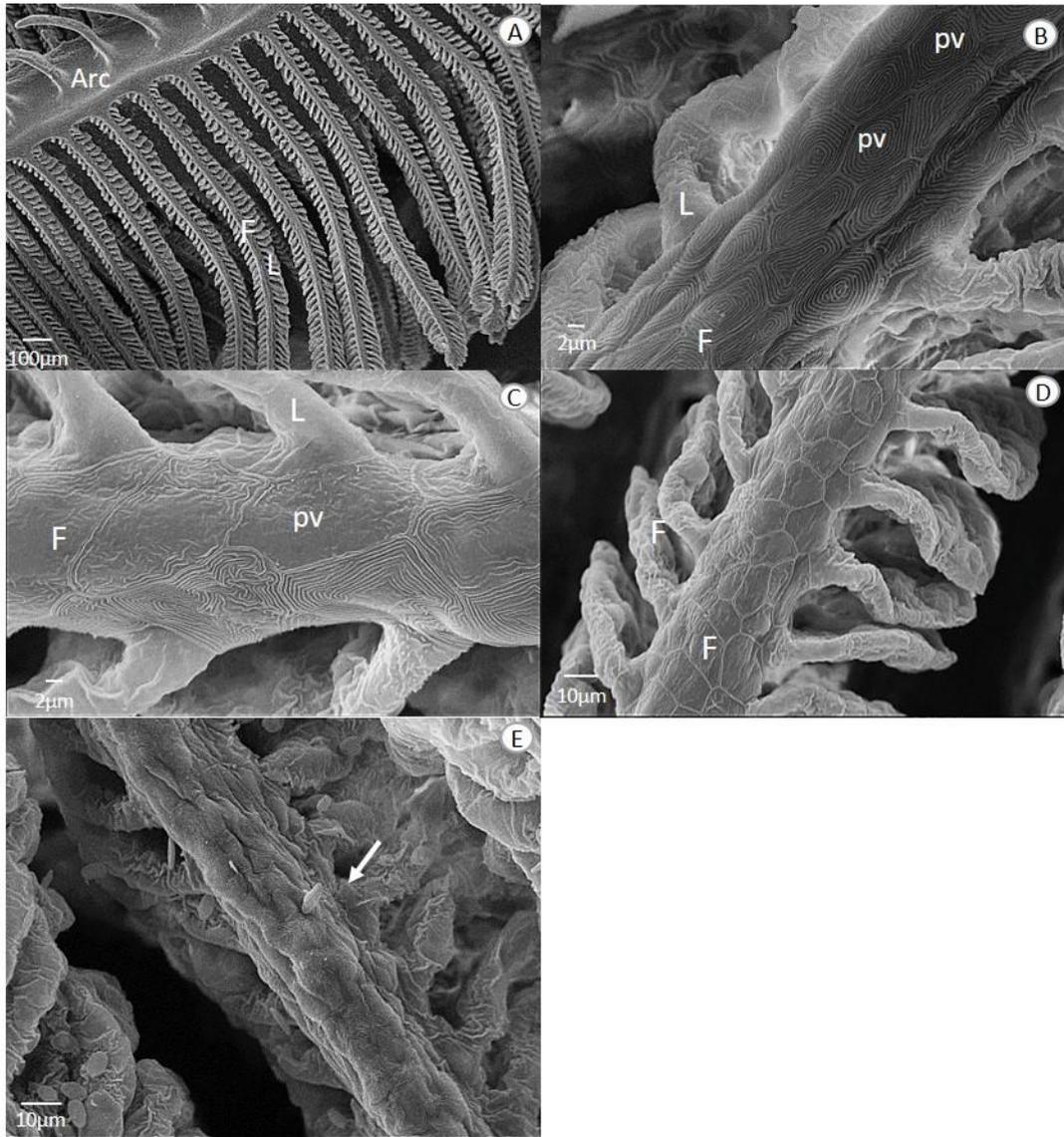


Figura 7: Brânquias de *Colossoma macropomum*. A-B. Observe os filamentos (F), lamelas branquiais (L) e detalhes dos filamentos, lamelas e interdigitações na superfície filamental de peixes do grupo controle. Observe: C. perda das interdigitações na superfície filamental nas brânquias expostas à deltametrina e em D. expostas ao imidacloprido. E. alterações na superfície filamental em brânquias expostas ao diuron. Arc = Arco branquial. pv = célula pavimentosa.

Efeitos ultraestruturais dos agrotóxicos observados em MET

A análise da ultraestrutura das brânquias das quatro espécies estudadas revelaram lamelas semelhantes aos demais teleósteos, compostas por células pilares enfileiradas na região central, envoltas por uma camada fina de células do epitélio pavimentoso e de células ricas em mitocôndrias e em menor quantidade por células mucosas localizadas na base da lamela na região interlamelar (Figuras 8:9:10: A; 8:D).

As principais alterações observadas foram comuns à todos os tratamentos sendo observado descolamento do epitélio lamelar (Figuras 9:10 B), formação de espaços intercelulares dilatados (Figuras 8:9: B; 8: C; 10: E), proliferação de células ricas em mitocôndrias ao longo das lamelas (Figuras 8: E,F; 9:10: C,D) e vacuolização intracelular (Figuras 8: D; 9: B; 8:9: E; 10: A). As alterações observadas ocorreram nas três espécies analisadas: *Paracheirodon axelrodi*, *Hemigrammus rhodostomus* e *Colossoma macropomum*.

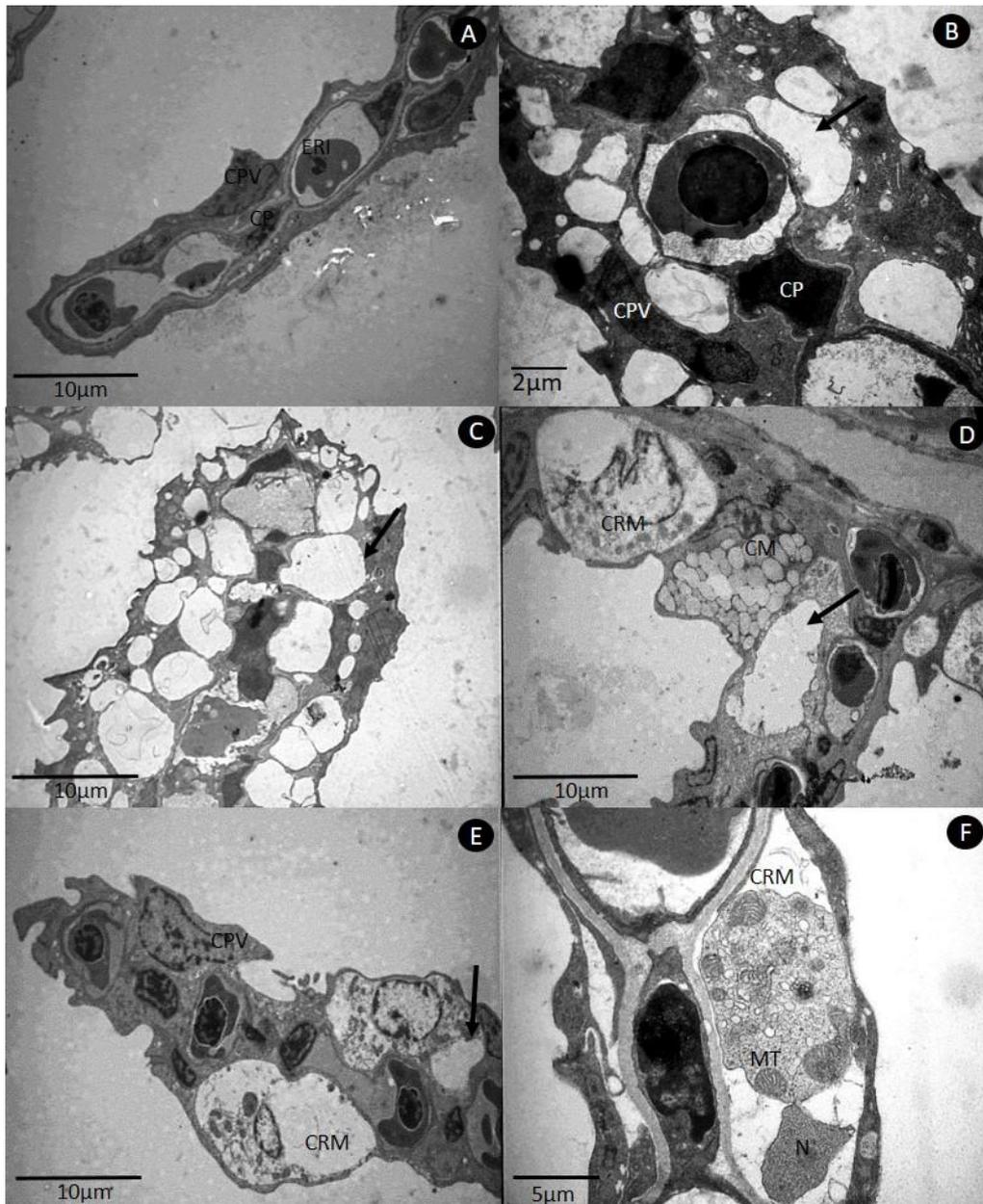


Figura 8: Brânquias de *Paracheirodon axelrodi*. A. Lamela branquial de exemplar do grupo controle formada por células pavimentosas (CPV), células pilares (CP) e eritrócitos (ERI). B-C. Lamela com aumento dos espaços intercelulares (seta) de exemplares expostos ao glifosato. D. Base lamelar mostrando célula rica em mitocôndrias (CRM), célula mucosa (CM) e célula pavimentosa com grande vacúolo (seta) e E-F. Célula rica em mitocôndrias (CRM) ao longo da lamela com vacúolo (seta) nos exemplares expostos ao imidacloprido. Mitocôndrias (MT), núcleo (N).

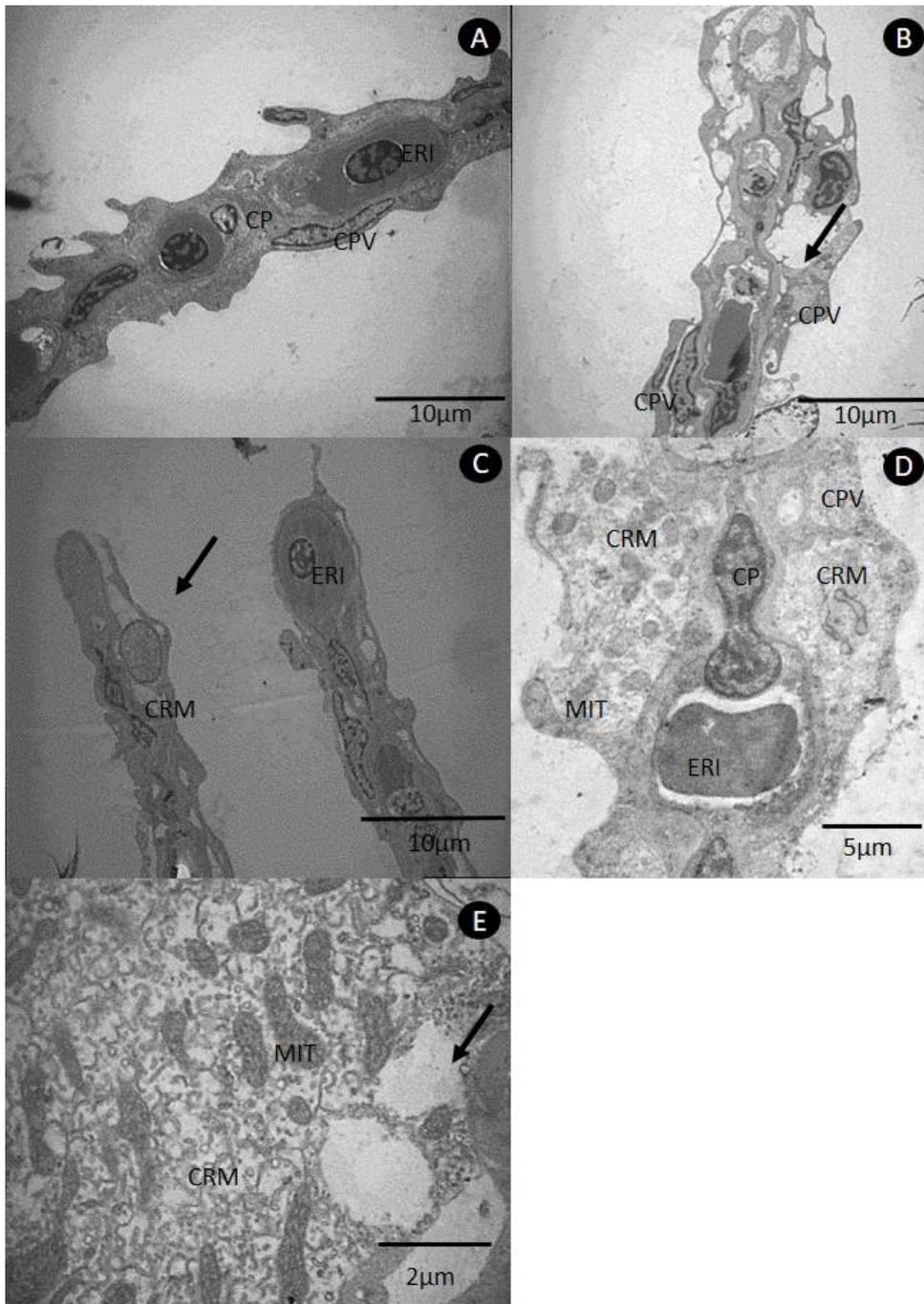


Figura 9: Brânquias de *Hemigrammus rhodostomus*. A. Lamela branquial de exemplar do grupo controle formada por células pavimentosas (CPV), células pilares (CP) e eritrócitos (ERI). B. Espaços intercelulares dilatados com elevação do epitélio lamelar e célula pavimentosa com vacúolo (seta) em exemplar exposto ao glifosato. C-D. Célula ricas em mitocôndrias (CRM) ao longo da lamela em exemplares expostos ao imidacloprido. E. Detalhes do citoplasma celular das CRM mostrando mitocôndrias MIT e vacúolos intracelulares (seta) em exemplar exposto a deltametrina.

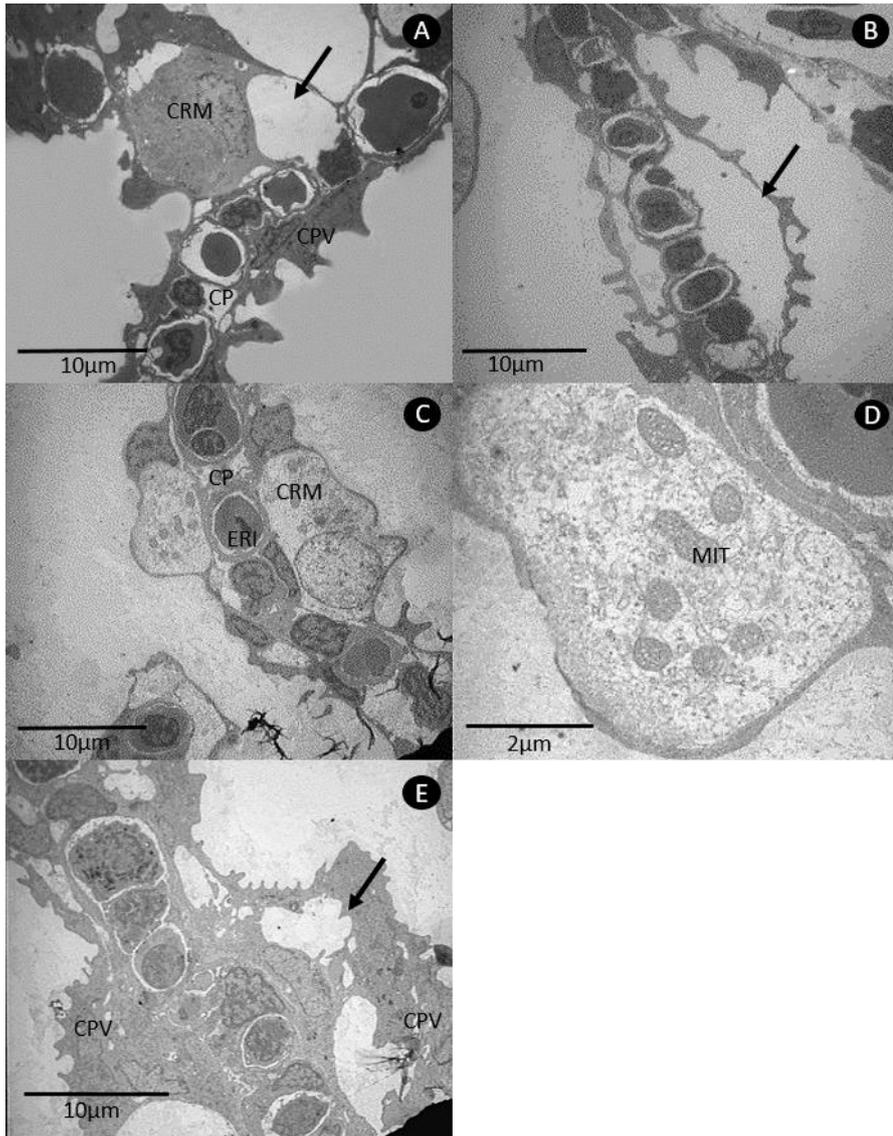


Figura 10: Brânquias de *Colossoma macropomum*. A. Lamela branquial de exemplar do grupo controle formada por células pavimentosas (CPV), células pilares (CP), eritrócitos (ERI) e célula ricas em mitocôndrias (CRM) na base lamelar apresentando vacúolos intracelulares (seta). B. Elevação do epitélio lamelar (seta) e C-D. Células ricas em mitocôndrias ao longo da lamela com detalhe do citoplasma celular e em evidencia em D. Ampliação de uma CRM mostrando as mitocôndrias (MIT) em exemplares expostos ao diuron. E. Espaços intercelulares (seta) e elevação do epitélio em exemplar exposto ao imidacloprido.

Discussão

Efeitos estruturais dos agrotóxicos observados em MO

As lesões branquiais observadas foram comuns a todas as espécies e tratamentos e foram consideradas em sua maioria de gravidade leve. Estas lesões têm sido relatadas em diversas espécies, induzidas por diferentes agentes mostrando que são as primeiras a surgirem quando há interação com poluentes aquáticos (SCHWAIGER *et al.*, 1997; CENGIZ; UNLU, 2006; CENGIZ, 2006; CAMARGO; MARTINEZ, 2007; HENARES *et al.*, 2008; CANTANHÊDE *et al.*, 2014).

A elevação ou descamação do epitélio das lamelas secundárias é uma das primeiras respostas dos peixes para impedir a intoxicação por um agente externo, pois aumenta a barreira entre o meio externo e a corrente sanguínea e assim dificulta a chegada do poluente aos capilares (THOPHON *et al.*, 2003; CANTANHÊDE *et al.*, 2014). Outras lesões encontradas com frequência foram hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais, cujo aumento do volume assim como a proliferação celular aumentam as funções fisiológicas, atuando como barreira ao agente tóxico (SCHWAIGER *et al.*, 1997; WOLF *et al.*, 2014; CANTANHÊDE *et al.*, 2014). Fusões lamelares também foram observadas, estas geralmente decorrem de um estágio avançado de hiperplasia das células epiteliais nas lamelas adjacentes, diminuindo a área exposta ao ambiente externo e assim reduzindo o contato com o poluente. Estas lesões são consideradas barreiras à entrada do contaminante e mecanismos compensatórios pra restabelecer a homeostase, porém podem comprometer outras funções braquiais como a respiração (SCHWAIGER *et al.*, 1997; CAMARGO; MARTINEZ, 2007; WOLF *et al.*, 2014; CANTANHÊDE *et al.*, 2014). Mazon *et al.*, (2002), observaram que peixes da espécie *Prochilodus scrofa* que apresentavam essas alterações histopatológicas também apresentaram mudanças nos processos hematológicos, o que sugere que esses processos sejam usados para compensar a perda de área para as trocas gasosas. Perry (1998), também descreve a hiperventilação, aumento na afinidade de ligação entre a hemoglobina e o oxigênio e início mais precoce da liberação de catecolaminas durante a hipóxia aguda, como mecanismos compensatórios ao aumento da barreira de difusão entre o sangue e a água em peixes.

Algumas espécies podem apresentar maior sensibilidade que outras em relação a uma mesma substância e isso está relacionado com a sua morfologia, fisiologia, história de vida e comportamento (POSTHUMA *et al.*, 2002). Dentre as espécies expostas aos quatro agrotóxicos, a espécie *Paracheiroidon axelrodi* apresentou maior resistência a exposição, sendo detectado somente efeitos sugestivos do agrotóxico glifosato em causar lesões branquiais.

Outra espécie pertencente ao mesmo gênero que *Paracheiroidon axelrodi*, *Paracheiroidon innesi* foi descrita como tendo reduzida agressividade e bem estar melhorado em grupos maiores (SAXBY *et al.*, 2010), esses atributos podem ser considerados como um dos fatores que favorecem o gênero para relações em grupo diminuindo o estresse natural do confinamento, nesse contexto animais menos estressados teriam vantagens em resistir aos efeitos dos agrotóxicos, no entanto não há na literatura estudos comportamentais que demonstrem essa relação. Os peixes desenvolvem mecanismos compensatórios que demandam energia em respostas a exposição de um agente tóxico podendo comprometer outras funções como crescimento e reprodução (GIULIO; HINTON, 2008). O baixo nível de energia de manutenção por dia, 0,068 kJ, encontrado no gênero *Paracheiroidon* (PANNEVIS; EARLE, 1994a, 1994b; SALES; JANSSENS, 2003), poderia favorecer a alocação de energia excedente nos mecanismos compensatórios sem prejudicar as demais funções e assim tornando-os mais resistentes aos efeitos do pesticida.

Colossoma macropomum foi a espécie mais sensível apresentando lesões induzidas por três dos quatro agrotóxicos avaliados. Fato importante a ser considerado já que esta espécie representa um dos principais peixes comercializados na região com finalidade alimentar (FARIAS *et al.*, 2010). Esta maior vulnerabilidade pode estar relacionada com o estágio de vida da espécie, já que foram utilizados alevinos enquanto que para as demais espécies foram utilizados espécimes adultos para a realização dos experimentos. Graves *et al.*, (1981), demonstraram que alevinos de *Cyprinodon variegatus* tendem a ser mais vulneráveis que adultos e atribuiu isso ao estágio de vida. Para Barry *et al.*, (1995) a maior resistência encontrada em adultos que alevinos de *Melanotaenia fluviatilis* é devida ao aumento de peso. A maior suscetibilidade observada em alevinos de

peixes reforça a importância do estudo de efeitos de poluentes neste estágio de vida.

O agrotóxico glifosato induziu lesões em mais espécies sendo considerado mais tóxico que imidacloprido, deltametrina e diuron. A ausência de efeito significativo do glifosato sobre o tabaqui pode estar associada às menores concentrações de exposição utilizadas nesta espécie (que foram de 2 mg/L, comparado às concentrações de 3,5 a 5 mg/L para as demais espécies). Embora o glifosato seja enquadrado na categoria de baixa toxicidade aguda de acordo com a Organização Mundial de Saúde uma vez que seu mecanismo de ação atua sobre rota metabólica presente somente nas plantas, muitas formulações encontradas no mercado possuem surfactantes que podem ser tóxicos para peixes (AMARANTE JR; SANTOS, 2002). Todavia, a bula do composto Gliz 480g/L, utilizado como fonte de glifosato, neste trabalho não informa claramente se contém substâncias surfactantes em sua composição.

Embora os agrotóxicos tenham seu mecanismo de ação descrito para agir em rotas metabólicas específicas como, por exemplo, deltametrina atua como um desregulador iônico (CASARETT; DOULL, 2008), imidacloprido causa efeitos neurotóxicos (TOMIZAWA; CASIDA, 2003), glifosato e diuron agem sobre rotas específicas de vegetais (AMARANTE JR; SANTOS, 2002; FERREIRA, F. A.; ALBERTO; FERREIRA, 2005), pode-se observar seu potencial em causar efeitos em nível branquial em peixes.

Shiogiri *et al.*, (2012) demonstraram que um herbicida a base de glifosato com concentrações de 3 a 4,5 mg/l, desencadeou hipertrofia e hiperplasia nas células branquiais de *Piaractus mesopotamicus*. Estas concentrações são similares às que causaram lesões em *Hemigrammus rhodostomus* e em *Paracheirodon axelrodi*. Em exemplares de *Cyprinus carpio* após exposição aguda à deltametrina nas concentrações 0,029 a 0,041 mg/l também apresentaram diversas lesões no tecido branquial, sendo as mais comuns descamação e necrose das brânquias além de hiperplasia e fusões lamelares (CENGIZ, 2006).

Observamos efeito lesivo da deltametrina em *Carnegiella strigata* (0,0035 mg/l) e *Colossoma macropomum* (0,002 mg/l) após exposição aguda de 96h, porém a ausência de lesões mais graves como necroses e baixa frequência de

fusões lamelares sugere que o tempo de exposição assim como a concentração pode ter limitado o surgimento de lesões mais severas.

Outro agrotóxico piretróide da mesma família que a deltametrina, o lambda-cialotrina em concentrações de 0,0003 e 0,0006 mg/l provocou alterações histopatológicas como hiperplasia epitelial, aneurisma, necrose epitelial, descamação, elevação epitelial, edema, encurtando de lamelas secundárias e promoveu fusão lamelar após por 96h de exposição em *Cirrhinus Mrigala* (VELMURUGAN *et al.*, 2007). Outros compostos tóxicos tais como derivados de petróleo, metais pesados e outros pesticidas são descritos como causadores das lesões branquiais similares às descritas neste estudo demonstrando que essas lesões podem ser consideradas como indicadores de efeitos branquiais de poluentes (AHMED *et al.*, 2013; AKAISHI *et al.*, 2004; BA-OMAR; AL-JARDANI; VICTOR, 2011; HENARES *et al.*, 2008).

Diversos efeitos tóxicos também são descritos em peixes quando em contato com esses agrotóxicos. Em *Poecilia reticulata*, um herbicida a base de glifosato (GBH) pode modificar a expressão de proteínas e promover mudanças na estrutura das células branquiais em resposta a hipoxia induzida (ROCHA *et al.*, 2015). Em *Cyprinus carpio* o glifosato causou danos no sistema imunológico alterando a transcrição de IgM, complexo C3 e lisozina além de outras alterações histopatológicas renais como vacuolização do parênquima renal e intumescência do túbulo renal (MA *et al.*, 2015). Já o Roundup, outro herbicida a base de glifosato nas concentrações de 10 -15 mg/L causou alterações no epitélio branquial de juvenis de *Colossoma macropomum* acompanhadas por alterações nos parâmetros hematológicos, como a concentração de hemoglobina além de efeitos genotóxicos e neurológicos (BRAZ-MOTA *et al.*, 2015).

Para peixes, o Imidacloprido nas concentrações de 0,73 mg/L para *Oreochromis mossambicus* e 0,84 mg/L para *Labeo rohita* indicou aumento da atividades de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, glutamato desidrogenase indicando danos no tecido hepático (BHAVIKA *et al.*, 2013). Ele também provocou efeito depressivo na saúde de peixes da espécie *Oryzias latipes* (SÁNCHEZ-BAYO; GOKA, 2005) e alterações neurocomportamentais durante o desenvolvimento de peixes zebra que persistiram

até a fase adulta (CROSBY *et al.*, 2015). Scheil *et al.*, (2009), observaram que até a concentração de 50 mg/L de imidacloprido não se observou impacto significativo no desenvolvimento inicial de peixe zebra.

Já o diuron, causou danos na fertilidade de ratos diminuindo o número de filhotes na prole (FERNANDES *et al.*, 2007) e em peixes da espécie *Pagrus auratus* foi capaz de causar deformidade na coluna vertebral durante o desenvolvimento dos embriões (GAGNON e RAWSON, 2009). Em *Carassius auratus* induziu diversas alterações comportamentais como diminuição do comportamento de agrupamento após exposição por 24h em concentrações a partir de 5 µg/L (SAGLIO e TRIJASSE, 1998). Nessa mesma espécie, Bretaud *et al.*, (2000), observaram inibições significativas 9-12% da acetilcolinesterase cerebral após exposição a 500 µg/ L de Diuron a partir de 24h de exposição.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo demonstraram pela primeira vez o potencial tóxico do imidacloprido e diuron em causar lesões histopatológicas em peixes.

Efeitos ultraestruturais dos agrotóxicos observados em MEV

As análises da ultraestrutura branquial das quatro espécies mostraram que as brânquias possuem organização típica, similar à de outros teleósteos (WILSON; LAURENT, 2002), sendo a perda das microdigitações na superfície filamentar a principal alteração morfológica observada. Essa alteração foi comum tanto nos indivíduos tratados como nos controles. As alterações nas microdigitações se mostram como uma das principais respostas das brânquias quando em contato com um agente estressor. Elas foram observadas em peixes da espécie *Aphanius díspar* expostos a 3 µg/l de deltametrina (AL-GHANBOUSI; BA-OMAR; VICTOR, 2012), *Channa punctata* exposta a metais traço (PANDEY *et al.*, 2008), *Oreochromis sp.* exposta a íons de chumbo (ALDOGHACHI *et al.*, 2015). A perda das microdigitações é causada pela alteração das microcristas nas células pavimentosas, essas microcristas aumentam a área superficial das células em contato com o meio externo e servem também como estruturas de retenção de muco protegendo toda estrutura branquial (BA-OMAR; AL-JARDANI; VICTOR, 2011; WILSON; LAURENT, 2002).

As fusões lamelares vistas nesse trabalho, parecem estar relacionadas com a hiperplasia celular encontrada na região interlamelar nas análises de microscopia ótica, uma vez que foi possível observar a redução dos espaços interlamelares e aproximação das lamelas adjacentes. Al-ghanbousi; Ba-Omar; Victor (2012) e Babu *et al.*, (2014), descreveram fusões lamelares associadas a hiperplasia das células do pavimento em *Aphanius díspar* e *Anabas testudineus* respectivamente. Outros poluentes têm sido mencionados como causadores dessas lesões. Pandey *et al.*, (2008) e Aldoghachi *et al.*, (2015) também observaram fusões lamelares em *Channa punctata* exposta a metais traço e em *Oreochromis* sp. exposta ao chumbo.

Também na superfície filamentar foram observadas outras alterações tais como fissuras nos filamentos em *Hemigrammus rhodostomus* e deformidades em *Colossoma macropomum*. Danos na superfície filamentar foram descritos para *Astyanax* sp. sendo a gravidade desses danos proporcionais ao aumento das concentrações da fração solúvel do petróleo (AKAISHI *et al.*, 2004). Brânquias de *Aphanius díspar* apresentaram deformidades na superfície filamentar, depressões e saliências, quando expostos ao pesticida temefos (BA-OMAR; AL-JARDANI; VICTOR, 2011). Porém a baixa frequência de ocorrência dessas lesões observadas neste trabalho não nos permite concluir se elas representam variações naturais dentro de um grupo ou foram induzidas pelos agrotóxicos.

Efeitos ultraestruturais dos agrotóxicos observados em MET

As principais lesões encontradas nas análises de microscopia eletrônica de transmissão corroboraram as alterações observadas na microscopia de luz. A dilatação dos espaços intercelulares nas lamelas parece ser o estágio que precede o descolamento do epitélio pavimentoso, assim como o aumento dos vacúolos celulares e a proliferação e deslocamento das células ricas em mitocôndrias da região interlamelar para ao longo das lamelas estão relacionadas com as hipertrofias e hiperplasias lamelares observadas nas análises realizadas em microscopia ótica.

Alguns agentes tóxicos podem alterar a regulação iônica tornando deficiente a troca de íons entre o meio e as brânquias (BOELSTERLI, 2003; EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; EVANS, 1987; PELGROM *et al.*, 1995;

PRATAP; BONGA, 1993). Por exemplo, a deltametrina foi desenvolvida para atuar nos canais de sódio de insetos, sendo um potencial desregulador iônico em organismos não alvo (PALMQUIST; SALATAS; FAIRBROTHER, 2012; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). As células ricas em mitocôndrias são consideradas as principais responsáveis pela atividade iônica nas brânquias (WILSON; LAURENT, 2002) e sua proliferação pode ser considerada como um mecanismo compensatório para reestabelecer a homeostase nesses casos (JAGOE; HAINES, 1997; PELGROM *et al.*, 1995; PERRY, 1998). A proliferação das células ricas em mitocôndrias observadas em todos os tratamentos indica que o glifosato, deltametrina, imidacloprido e diuron apresentam potencial em causar alterações na regulação iônica das espécies de peixes amazônicos avaliadas neste estudo.

Jagoe e Haines (1997), associaram a proliferação de células ricas em mitocôndrias em *Salmo salar* à exposição a águas ácidas. Em pH ácido as brânquias tendem a perder íons de sódio e o aumento na quantidade de células atua como um mecanismo compensatório aumentando a capacidade de captura desses íons. Pelgrom *et al.*, (1995), também associou a proliferação celular em *Oreochromis mossambicus* como uma resposta compensatória da exposição ao chumbo, todavia isso não implicou no aumento da capacidade de transporte de íons, provavelmente por que as novas células ricas em mitocôndrias ainda imaturas não desempenham as mesmas funções das maduras (PRATAP; BONGA, 1993). Além de desempenhar as trocas iônicas, as células ricas em mitocôndrias tem função de excreção (EVANS, 1987; PAWERT; MULLER; TRIEBSKORN, 1998). Embora a proliferação das células ricas em mitocôndrias possa ser benéfica para regulação iônica e excreção de produtos nitrogenados pode afetar as trocas gasosas devido ao aumento da barreira de difusão entre a água e o sangue (PERRY, 1998).

Em *Aphanius díspar* exposto a 0,002 e 0,003 mg/l de deltametrina por um período de 96h, foi notada a presença de vacúolos com diferentes tamanhos nas células ricas em mitocôndrias e espaços dilatados entre as células lamelares branquiais semelhantes aos encontrados nesse trabalho (AL-GHANBOUSI; BA-OMAR; VICTOR, 2012). Também foram observadas lesões mais graves como degeneração celular e necrose das células pilares. Estas concentrações e tempo de exposição são similares as de *Colossoma macropomum* (0,002 mg/l) e

Carnegiella strigata (0,0035 mg/l) o que sugere que estas espécies por não apresentarem lesões de gravidade maior são mais resistentes que *Aphanius dispar* a este agrotóxico.

Ba-omar *et al.*, (2011) e Samanta *et al.*, (2015) também descrevem vacúolos anormais nas células ricas em mitocôndrias além de outras lesões de maior gravidade em *Aphanius dispar* e *Anabas testudineus* expostos ao agrotóxico temefos e ao herbicida Almix (*Metsulfuron Metil* 10.1% + *Chlorimuron Etil* 10.1%) respectivamente, nestes estudos o surgimento de vacúolos pareceu estar associado ao início da degeneração celular. As concentrações desses agrotóxicos que causaram lesões mais graves como degeneração e necrose estavam entre 10 a 25 mg/l (temefos) e 66 mg/l (Almix), concentrações inferiores às concentrações de imidacloprido (116 -149,6 mg/l), similares no caso de temefos ao diuron (13,5 – 16,5 mg/l) e superiores às demais concentrações de deltametrina (0,0035 – 0,004), glifosato (2 – 5 mg/l) e diuron (13,5 – 16,5 mg/l) utilizadas no nosso estudo. Ainda, vale ressaltar que temefos pertence à classe dos organofosforados, considerado a classe mais tóxica dentre os agrotóxicos (FARIA, 2009) e também que Almix foi usado em experimentos crônicos de 30 dias já que o tempo de exposição também influencia no agravamento da lesão (Brunelli *et al.*, 2011).

Pawert; Muller; Triebkorn, (1998), observaram pequenos espaços entre as células epiteliais e ricas em mitocôndrias de *Salmo trutta f. fario* e *Barbatula barbatula* expostos à águas pouco contaminadas, em espécimes expostos a águas mais poluídas essas lesões foram mais extensas com formação de edemas. Giari *et al.*, (2007), observaram deslocamento do epitélio lamelar, hiperplasia, surgimento de vesículas dilatadas nas células ricas em mitocôndrias na região interlamelar assim como edemas que ocasionaram dilatação dos espaços intercelulares entre o epitélio e as células pilares nas brânquias de *Dicentrarchus labrax* exposta a diferentes concentrações de cádmio. O edema é caracterizado por um acúmulo de líquidos que pode ser causado por uma regulação osmótica deficiente (BERNET *et al.*, 1999) o que sugere que os espaços intercelulares dilatados observados neste trabalho sejam formados por edemas resultantes dessa deficiência.

De modo geral, as alterações observadas neste estudo enquadraram-se nos fatores de importância 1 e 2 portanto podem ser consideradas de leves a moderadas sendo reversíveis caso os peixes voltem a condições ambientais adequadas (Bernet *et al.*, 1999). As concentrações dos agrotóxicos utilizadas nesse trabalho foram as maiores concentrações subletais para cada espécie, ou seja, as maiores concentrações em que todos os animais sobreviveram ao período de exposição de 96h aos agrotóxicos (Tabela 1). As concentrações reais que ocorrem no ambiente podem variar dependendo do método de aplicação do agrotóxico e fatores ambientais tais como: tipo de solo, pH, turbulência da água e sazonalidade que interferem na disponibilidade do poluente no meio aquático podendo sua concentração ser maior ou menor em um determinado momento (DAAM *et al.*, 2013). Esses fatores dificultam determinar os efeitos reais desses agrotóxicos em ambientes naturais. Na Amazônia torna-se ainda mais difícil prever quais são as concentrações reais no meio, uma vez que não há padronização de aplicação de agrotóxicos pelos agricultores e nem estudos do comportamento desses agroquímicos nesse ecossistema (WAICHMAN 2008). Neste trabalho avaliamos os efeitos subletais e diante do potencial risco em afetar à saúde dos peixes é necessário investigar como estes agrotóxicos são manuseados e descartados na região afim de propor melhor utilização, controle e melhoramento da qualidade ambiental.

As concentrações encontradas nos ambientes naturais reais que têm sido relatadas na literatura estão abaixo dos valores utilizados neste estudo, com exceção aos valores de deltametrina (Tabela 3). É possível observar que para deltametrina e glifosato há uma grande variação nas concentrações encontradas em diferentes ambientes o que torna difícil estimar essas concentrações em outros ambientes. A inexistência de dados referentes a esses agrotóxicos no Brasil e na Amazônia indica a necessidade de avaliar as concentrações destes compostos *in situ* próximo às áreas agrícolas. Estes dados poderiam fornecer indicativos de exposição e balizar futuros estudos relacionados à saúde de organismos aquáticos.

Tabela 3: Comparação das concentrações dos agrotóxicos relatadas em ambientes naturais e neste estudo.

Local do estudo	Concentrações encontradas	Referência	Concentrações no estudo
Deltametrina			
Laguna Luban, Filipinas	4,52 µg/l	(BAJET <i>et al.</i> , 2012)	
Rio São Francisco, Filipinas	0,043 µg/l	(ELFMAN <i>et al.</i> , 2011)	2 - 4 µg/l
Canadá	0,04 - 24,0 µg/l	(PAWLISZ <i>et al.</i> , 1998)	
Imidacloprido			
EUA (estimativa)	0,017 - 0,035 mg/l	Agência de Proteção Ambiental (EUA)/ (FOSSEN, 2006)	116 – 177mg/l
Campos de arroz. Alcácer do Sal, Portugal	0,052 mg/l	(DAAM <i>et al.</i> , 2013)	
Diuron			
Austrália	0,000001 mg/l	(CAMENZULI <i>et al.</i> , 2012)	
Malásia	0,000285 mg/l	(ALI <i>et al.</i> , 2014)	13,5 – 16,5 mg/l
Itália	0,000042 mg/l	(GENNARO <i>et al.</i> , 1995)	
Holanda	0,00013 mg/l	(LAMOREE <i>et al.</i> , 2002)	
Glifosato			
Argentina	0,1 – 0,7 mg/l	(PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008)	2 – 4 mg/l
Hungria/ Rio Danule – lago Valencei	0,000001mg/l	(MÖRTL <i>et al.</i> , 2013)	

Conclusões

Os agrotóxicos glifosato, imidacloprido, deltametrina e diuron causaram lesões branquiais em pelo menos uma das quatro espécies de peixes avaliadas. Nossos resultados demonstram que o agrotóxico glifosato induziu lesões em mais espécies sendo considerado mais tóxico que imidacloprido, deltametrina e diuron. Embora o diuron tenha sido avaliado apenas nas espécies *Colossoma macropomum* e *Hemigrammus rhodostomus*, este composto foi capaz de induzir lesões em tambaqui e a avaliação de seus efeitos merece ser investigada em outras espécies de peixes amazônicos. A espécie *Paracheirodon axelrodi* foi mais resistente que *Carnegiella strigata*, *Hemigrammus rhodostomus* e *Colossoma macropomum* à exposição dos agrotóxicos. *Colossoma macropomum* por sua vez foi a espécie mais sensível apresentando lesões induzidas por três dos quatro agrotóxicos avaliados. As lesões branquiais observadas foram comuns às quatro espécies e são consideradas de leves a moderadas apresentando potencial de

serem reversíveis na ausência dos agrotóxicos, portanto nossos resultados sugerem que ações de gerenciamento podem ser implementadas em áreas agrícolas da Amazônia para melhoria da qualidade ambiental.

Referências Bibliográficas

- ADEDEJI, O. B.; OKOCHA, R. O. Overview of Pesticide Toxicity in Fish. *Advances in Environmental Biology*, v. 6, n. 8, p. 2344–2351, 2012.
- AHMED, M. K. *et al.* Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 65, n. 6, p. 903–909, 2013.
- AKAISHI, F. M. *et al.* Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 46, n. 2, p. 244–253, 2004.
- ALBINATI, A. C. L. *et al.* Toxicidade aguda do herbicida roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Rev. Bras. Saúde Prod.*, v. 8, n. 3, p. 184–192, 2007.
- ALDOGHACHI, M. A. *et al.* Ultrastructural effects on gill tissues induced in red tilapia *Oreochromis* sp. by a waterborne lead exposure. *Saudi Journal of Biological Sciences.*, 2015.
- AL-GHANBOUSI, R.; BA-OMAR, T.; VICTOR, R. Effect of deltamethrin on the gills of *Aphanius dispar*. A microscopic study. *Tissue and Cell*, v. 23, n. 1 A, p. 190–198, 2012.
- ALI, H. R. *et al.* Contamination of diuron in coastal waters around Malaysian Peninsular. *Marine Pollution Bulletin*, v. 85, n. 1, p. 287–291, 2014.
- AMARANTE JR, O. P. DE; SANTOS, T. C. R. DOS. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e legislação. *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.
- ANJOS, H. D. DOS *et al.* Exportação de Peixes Ornamentais do estado do Amazonas, Bacia Amazônica, Brasil. *B. Inst. Pesca*, v. 35, n. 2, p. 259–274, 2009.
- ANJOS, H. D. B. DOS; ANJOS, C. R. DOS. Biologia reprodutiva e desenvolvimento embrionário e larval do cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* Schultz, (Characiformes: Characidae), em laboratório. *Acta Amazônica*, v. 1956, p. 1–19, 2006.
- AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: linking acetylcholinesterase activity to behaviour. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 74, n. 5, p. 1210–5, jul. 2011.
- BABU, V. *et al.* Surface structures of gill, scale and erythrocyte of *Anabas testudineus* exposed to sublethal concentration of cypermethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 37, n. 3, p. 1109–1115, 2014.

BA-OMAR, T. A.; AL-JARDANI, S.; VICTOR, R. Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). *Tissue and Cell*, v. 43, n. 1, p. 29–38, 2011.

BARRY, M. J. *et al.* Effect of age and weight-specific respiration rate on toxicity of esfenvalerate pulse-exposure to the Australian crimson-spotted rainbow fish (*Aelanotaenia Juviatilis*). *Aquatic toxicology*, v. 32, p. 115–126, 1995.

BAYER CROPSCIENCE LTDA. CONFIDOR SUPRA® - [Inseticida]. Disponível em: <<http://www.bayercropsience.com.br/site/nossosprodutos/protecaodecultivosebiotecnologia/DetailDoProduto.fss?Produto=203>>. Acesso em: 19 ago. 2014.

BERNET, D. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, v. 22, n. 1, p. 25–34, 1999.

BERTOLETTI, E. A Presunção Ambiental e a Ecotoxicologia Aquática. *Revista das Águas*, n. 12, 2012.

BHAVIKA, D. PARIKH. PRAGNA. Biochemical Alterations on Exposure of Imidacloprid and Curzate on Fresh Water Fish *Oreochromis Mossambicus* and *Labeo Rohita*. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*. New Delhi. v. 7, p. 87-91, 2013.

BOELSTERLI, U. A. Mechanistic Toxicology The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. *New Fetter Lane, Lodon: Taylor & Francis Group*, 2003.

BRAZ-MOTA, S. *et al.* Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemospher*, v.135 p. 53–60, 2015.

BRETAUD, S. TOUTANT, J.P. SAGLIO, P. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 47, Issue 2, p. 117-124, 2000.

BRITO, I. A. Avaliação da qualidade da água de três reservatórios do rio paraíba do sul através de biomarcadores em *Pimelodus maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae) E *Oligosarcus hepsetus* (Characiformes, Characidae). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BRUNELLI, E. *et al.* Ultrastructural and immunohistochemical investigation on the gills of the teleost, *Thalassoma pavo* L., exposed to cadmium. *Acta Histochemica*, v. 113, n. 2, p. 201–213, 2011.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills , kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, v. 5, n. 3, p. 327–336, 2007.

CAMENZULI, L. *et al.* Describing the environmental fate of diuron in a tropical river catchment. *The Science of the total environment*, v. 440, p. 178–85, 1 dez. 2012.

CANTANHÊDE, S. M. *et al.* Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís - MA. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 66, n. 2, p. 593–601, 2014.

- CARVALHO, F. R.; BERTACO, V. A.; JEREP, F. C. *Hemigrammus tocantinsi*: a new species from the upper rio Tocantins basin , Central Brazil (Characiformes : Characidae). *Neotropical Ichthyology*, v. 8, n. 2, p. 247–254, 2010.
- CASARETT, L. J.; DOULL, J. CASARETT AND DOULL ' S TOXICOLOGY *The Basic Science of Poisons. Seventh ed. Kansas: [s.n.], 2008.*
- CENGIZ, E. I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 22, n. 2, p. 200–4. 2006.
- CENGIZ, E. I.; UNLU, E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 21, n. 3, p. 246–53, maio 2006.
- CHARGUI, I. *et al.* Oxidative Stress, Biochemical and Histopathological Alterations in the Liver and Kidney of Female Rats Exposed to Low Doses of Deltamethrin (DM): A Molecular Assessment. *Biomedical and environmental sciences : BES*, v. 26, n. 1, p. 23–31, 2013.
- COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.
- CROSBY, E. B. BAILEY, J. M. OLIVERI, A. N. LEVIN, E. D. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*. v. 49, p. 81–90, 2015.
- DAAM, M. A. *et al.* Preliminary aquatic risk assessment of imidacloprid after application in an experimental rice plot. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 97, p. 78–85, 2013.
- DORES, E. F. DE C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do leste, Mato Grosso - Análise preliminar. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 27–36, 2001.
- DYK, J. C. VAN; COCHRANE, M. J.; WAGENAAR, G. M. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*, v. 87, p. 301–311, 2012.
- EVANS, D. H. The Fish Gill:Site of Action and Model for Toxic Effects of Environmental Pollutants. *Environmental Health Perspectives*, v. 71, n. 8, p. 47–58, 1987.
- EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The Multifunctional Fish Gill : Dominant Site of Gas Exchange , Osmoregulation , Acid-Base Regulation , and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol*, v. 85, p. 97–177, 2005.
- FARIA, A. B. DE C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. *Ambiência*, v. 5, n. 2, p. 345–357, 2009.
- FARIAS, I. P. *et al.* Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 56, n. 3, p. 1129–35, 2010.

- FERNANDES, G. S. A. *et al.* Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive toxicology*, v. 23, n. 1, p. 106–12, 2007.
- FERREIRA, D. *et al.* Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*, v. 79, n. 9, p. 914–21, 2010.
- FERREIRA, F. A.; ALBERTO, A.; FERREIRA, L. R. *Mecanismos de ação de herbicidas*. Minas Gerais: [s.n.], 2005.
- FIGUEIREDO, A. C. P. *Piretróides : Uma nova geração de insecticidas*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.
- FOSSEN, M. *Environmental Fate of Imidacloprid. Regulation*. Sacramento: [s.n.], 2006.
- GAGNON, M. M.; RAWSON, C. A. Diuron increases spinal deformity in early-life-stage pink snapper *Pagrus auratus*. *Marine pollution bulletin*, v. 58, n. 7, p. 1083–5, 2009.
- GENNARO, M. C. *et al.* Separation of phenylurea pesticides by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography Diuron determination in lagoon water. *Journal of Chromatography A*, v. 718, n. 1, p. 81–88, 1995.
- GIARI, L. *et al.* Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* exposed to cadmium. *Chemosphere*, v. 67, p. 1171–1181, 2007.
- GIULIO, R. T. DI; HINTON, D. E. *The Toxicology of Fishes*. Taylor & F ed. Broken Sound Parkway. v. 29, 2008.
- GRAVES, W. C. *et al.* The interaction of treated bleached kraft mill effluent and dissolved oxygen concentration on the survival of the developmental stages of the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Water Research*, v. 15, n. 8, p. 1005–1011, 1981.
- HAVERINEN, J.; VORNANEN, M. Deltamethrin is toxic to the fish (crucian carp, *Carassius carassius*) heart. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 129, p. 36–42, 2014.
- HENARES, M. N. P. *et al.* Toxicidade Aguda e Histopatologia do Herbicida Reward® na Brânquia e no Fígado do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 3, n. 1, p. 41–45, 2008.
- HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. *Handbook of ecotoxicology, 2nd edition*. [S.l.]: Lewis Publishers, 2002.
- JAGOE, C. H.; HAINES, T. A. Changes in morphology of atlantic Salmon (*Salmo Salar*) smolts due to addition of acid and aluminium to stream water. *Environmental Pollution*, v. 97, n. 1, p. 137–146, 1997.
- JEREP, F. C.; CARVALHO, F. R.; BERTACO, V. A. Geographic distribution of *Hemigrammus ora* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) in the Amazon basin, Brazil. *Zoologia*, v. 28, n. 4, p. 545–550, 2011.
- KRULL, M.; BARROS, F. Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 7, n. 2, p. 57–66, 2012.

- LAMOREE, M. H. *et al.* Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters. *Journal of Chromatography A*, v. 970, n. 1-2, p. 183–190, 2002.
- LAWRENCE, A.; HEMINGWAY, K. *Effects of Pollution on Fish Molecular Effects and Population Responses*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 2003.
- LOWE-MCCONNELL, R. . *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. edUSP ed. São Paulo: [s.n.], 1999.
- MA, J. B, Y. LI, X. Immunological and histopathological responses of the kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sublethally exposed to glyphosate. *Environmental toxicology and pharmacology*. v. 39, 2015.
- MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *UNOPAR Cientia Ciências Biologia da Saúde*, v. 1, n. 1, p. 63–76, 1999.
- MANCERA-RODRÍGUEZ, N. J.; ÁLVAREZ-LEÓN, R. Comercio de peces ornamentales en Colombia: The Trade Of Ornamental Fishes In Colombia. *Acta Biol. Colomb*, v. 13, n. 1, p. 23–52, 2008.
- MARTINI, L. F. D. *et al.* Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. *Ciencia Rural*, v. 42, n. 10, p. 1715–1721, 2012.
- MAZON, A. F., MONTEIRO, E. A. S., PINHEIRO, G. H. D. AND FERNANDES, M. N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biological Research*, v. 62, p. 621–631, 2002.
- MENDONÇA, F. P. DE. *Ictiofauna de igarapés de terra firme : estrutura das comunidades de duas bacias hidrográficas , Reserva Florestal Adolfo Ducke , Amazônia Central*. 2002. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2002.
- MÖRTL, M. *et al.* Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchemical Journal*, v. 107, p. 143–151, 2013.
- MURTAGH, P. A. In defense of p values. *Ecology* 95:611–617. 2014.
- PALMQUIST, K.; SALATAS, J.; FAIRBROTHER, A. Pyrethroid Insecticides : Use , Environmental Fate , and Ecotoxicology. *Insectides - Advances in Integrated Pest Management*. Dr. Farzan ed. United States: InTech, 2012. .
- PANDEY, S. *et al.* Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-Biological Interactions*, v. 174, n. 3, p. 183–192, 2008.
- PANNEVIS, M.C., EARLE, K.E. Nutrition of ornamental fish: water soluble vitamin leaching and growth of *Paracheirodon innesi*. *J. Nutr.* 124 (Suppl), p. 2633–2635. 1994a.
- PANNEVIS, M.C., EARLE, K.E. Maintenance energy requirement of five popular species of ornamental fish. *J. Nutr.* 124 (Suppl). p. 2616–2618 1994b.
- PARVEZA, S. RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 20, p. 112–117, 2005.

PAWERT, M.; MULLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. *Tissue and Cell*, v. 30, n. 6, p. 617–626, 1998.

PELGROM, S. M. G. J. *et al.* Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquatic toxicology*, v. 32, p. 303–320, 1995.

PERES, C. A.; SCHNEIDER, M. Subsidized agricultural resettlements as drivers of tropical deforestation. *Biological Conservation*, v. 151, n. 1, p. 65–68, 2012.

PERRY, S. F. Relationships Between Branchial Chloride Cells and Gas Transfer in Freshwater Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 119, n. 1, p. 9–16, 1998.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, v. 156, n. 1, p. 61–66, 2008.

POSTHUMA, L.; SUNTERII, G. W.; P.TRAAS, T. *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publ ed. Virginia: Coastal and Estuarine Risk Assessment, 2002.

PRATAP, H. B.; BONGA, S. E. W. Effect of Ambient and Dietary-Cadmium on Pavement Cells, Chloride Cells, and Na⁺/K⁺-Atpase Activity in the Gills of the Fresh Water Teleost *Oreochromis Mossambicus* At Normal and High Calcium Levels in the Ambient Water. *Aquatic Toxicology*, v. 26, n. 1-2, p. 133–149, 1993.

RAMOS, C. I. *Teratogênese e histopatologia em larvas de tilápia (Oreochromis niloticus) exposta à aflatoxina bi, microcistina e glifosato*. 2010. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RUBINGER, C. F. *Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

RAMSEY, F.; SCHAFER D. *The statistical sleuth: a course in methods of data analysis*. Second edition. Duxbury Press, Belmont, California, USA. 2002.

ROCHA T. L *et al.* Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environmental toxicology and pharmacology*. v. 40, p. 175–186, 2015.

SALES, J.; JANSSENS, G. P. J. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources*, v. 16, p. 533–540, 2003.

SAMANTA, P. *et al.* Histopathological and ultramicroscopical changes in gill, liver and kidney of *Anabas testudineus* (Bloch) after chronic intoxication of almix. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 122, p. 360–367, 2015.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Unexpected effects of zinc pyrithione and imidacloprid on Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquatic toxicology*, v. 74, n. 4, p. 285–93, 2005.

- SAGLIO, P. TRIJASSE, S. Behavioral Responses to Atrazine and Diuron in Goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 35, p. 484–491, 1998.
- SANTOS, M. A. T. DOS; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides - uma visão geral. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*, v. 18, p. 339–349, 2007.
- SANTOS, S. M. DOS. *Relações Tróficas entre Carnegiella marthae Myers, 1927, C. strigata (Gunther, 1864) e Gnathocharax steindachneri Fowler, 1913 (Ostheichthyes: Characiformes) Em igaraés próximos ao lago Amanã - Amazonas - Brasil*. 2005. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2005.
- SAXBY, A. *et al.* The effect of group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 125, p. 195–205, 2010.
- SCHEIL, V. HEINZ-R. KOHLER. Influence of nickel chloride, chlorpyrifos, and imidacloprid in combination with different temperatures on the embryogenesis of the zebrafish and *Danio rerio*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. v. 56, Ed. 2, p. 238-243, 2009.
- SCHWAIGER, J. *et al.* The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, v. 6, p. 75–86, 1997.
- SHIOGIRI, N. S. *et al.* Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 34, n. 2, p. 388–396, 2012.
- SILVA, A. DAS G. *Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática*. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- SOUZA, T. C. DE. *Toxicidade aguda de agrotóxicos e Curva de Sensibilidade de Espécies para peixes amazônicos*. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.
- SPRAGUE, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Research Pergamon*, v. 3, p. 793–821, 1969.
- TERENCIO, M. L. *et al.* Comparative cytogenetics of *Carnegiella marthae* and *Carnegiella strigata* (Characiformes , Gasteropelecidae) and description of a ZZ / ZW sex chromosome system. *Genetics and Molecular Biology*, v. 1, p. 231–234, 2008.
- THOPHON, S. *et al.* Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, v. 121, n. 3, p. 307–320, 2003.
- TISLER, T. *et al.* Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, v. 76, n. 7, p. 907–14, 2009.
- TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*, v. 48, p. 339–364, 2003.

TOOR, H. K.; SANGHA, G. K.; KHERA, K. S. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 105, n. 1, p. 1–4, 2013.

VALDEZ DOMINGOS, F. X. *Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

VALDEZ DOMINGOS, F. X. *et al.* Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. *Environmental research*, v. 105, n. 3, p. 350–63, 2007.

VELMURUGAN, B. *et al.* Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 24, n. 3, p. 286–291, 2007.

VOHRA, P.; KHERA, K. S.; SANGHA, G. K. Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 110, p. 50–6, 2014.

WAICHMAN, A.V.; RÖMBKE, J.; RIBEIRO, M.O.A.; NINA, N.C.S. Pesticide use in the Amazon State, Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v.9, n. 6, p. 423-428, 2002.

WAICHMAN, A. V.; RÖMBKE, J.; NINA, N.C.S. Agrotóxicos: elemento novo na Amazônia. *Ciência Hoje*, v. 32, n. 190, p. 70-73, 2003.

WAICHMAN, A.V. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, v. 38, n.4, p. 45 – 50, 2008.

WALKER, I. The food spectrum of the cardinal - tetra (*Paracheirodon axelrodi* , Characidae) in its natural habitat. *Acta Amazonica*, v. 34, n. 1, p. 69–73, 2004.

WEITZMAN, S.H.; PALMER, L. Family Gasteropelecidae (Freshwater hatchet fishes). p. 101-103. In R. E. Reis; S. O. Kullander; C. J. Ferraris, Jr. (eds), *Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, 2003.

WESTER, P. W. *et al.* Aquatic toxicology: Opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 11, n. 3-4, p. 289–295, 2002.

WILSON, J. M.; LAURENT, P. Fish gill morphology: Inside out. *Journal of Experimental Zoology*, v. 293, n. 3, p. 192–213, 2002.

WOLF, J. C. *et al.* Nonlesions, Misdiagnoses, Missed Diagnoses, and Other Interpretive Challenges in Fish Histopathology Studies: A Guide for Investigators, Authors, Reviewers, and Readers. *Toxicologic pathology*, p. 1–29, 2014.