

Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfluramida[§]

Histological changes in gills of *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia-of-Nile) exposed the Acephate, Difenconazole and Sulfluramide

Adriana C Virgens^{1,2}, Rodrigo L Castro² e Zilma Maria A Cruz^{1,2*}

§Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora; 1. Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas – PPEE. Universidade Vila Velha – UVV. 2. Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental e Genotoxicidade; Rua Comissário José Dantas de Melo 21, Boa Vista, Vila Velha, ES. 29102-920, Brasil.

Autor para correspondência: zilma.cruz@uvv.br

Resumo A crescente utilização de agroquímicos e sua decomposição nos ecossistemas aquáticos têm despertado interesse na comunidade científica, em compreender e avaliar os efeitos biológicos dessas substâncias nos vários organismos. Esse trabalho avaliou a ação dos agroquímicos Acefato, difenoconazol e sulfluramida, em concentrações utilizadas pelos integrantes de agricultura familiar, sobre as brânquias de *Oreochromis niloticus*. As várias alterações observadas nos filamentos branquiais nas células de cloreto, aumento volumétrico das células mucosas, desestruturação e apoptose lamelar, perda de filamentos e presença de báculos, seguido de zonas de enfartamentos, interferem sobremaneira na fisiologia do organismo. Os resultados foram importantes para caracterização dos efeitos adversos desses produtos químicos além da intensidade de cada um sobre a tilápia-do-Nilo, utilizada como bioindicador.

Palavras-chaves: histologia, brânquias, agroquímicos, *Oreochromis niloticus*.

Abstract The increasing use of pesticides and their decomposition in aquatic ecosystems have aroused interest in the scientific community to understand and evaluate the biological effects of these substances in various organisms. This study evaluated the action of Acephate, difenoconazole and sulfluramide agrochemicals, at concentrations used by family farms, on the gills of *Oreochromis niloticus*. The various changes observed in gill filaments in chloride cell, volumetric increase mucosal cells, disruption and lamellar apoptosis, loss of filaments and presence of staffs; followed by infarcted areas, greatly interfere in the body physiology. The results were important to characterize the adverse effects of these chemicals beyond the intensity of each one on the Nile tilapia, used as bioindicator.

Keywords: histology, gills, agrochemicals, *Oreochromis niloticus*.

Introdução

Nos últimos anos, a utilização de extensas áreas próxima aos grandes centros urbanos para produção agrícola, tem crescido consideravelmente, principalmente pela agricultura familiar. Diversos fatores como as pragas, interferem na produtividade das lavouras e como forma de combate os agricultores fazem uso de quantidades consideráveis dos produtos químicos (Gentz *et al.* 2009; Castle *et al.* 2009). Apesar muitos terem seu uso e comercialização proibidos por órgãos federais, ainda na atualidade é possível observar seus efeitos residuais, como no caso do DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) (Norheim 1992, Yogui 2002).

Estas substâncias, acrescidas dos descartes domésticos e industriais, geram uma pressão antrópica nos ecossistemas aquáticos, desencadeando diferentes mecanismos de toxicidade nos organismos que habitam este ambiente (Rabouille *et al.* 2006).

Du *et al.* (2007) consideram importante o desenvolvimento de novos pesticidas sob o aspecto da elevada eficiência e baixo teor residual, como substitutos para os atuais. A utilização dos agroquímicos no meio rural brasileiro tem resultado em conseqüências danosas, tanto para o ambiente como para a saúde da população rural e estão relacionados a vários fatores, entre os quais, seu uso indiscriminado, elevada toxicidade, ausência de informações sobre a saúde, precariedade da vigilância etc., agravados ainda por determinantes de ordens cultural, social e econômica (Peres *et al.* 2005, Rabouille *et al.* 2006).

Somente no ano de 2013, foram expostos ou intoxicados com agroquímicos 274 trabalhadores rurais. Este valor representa 28% do total de 971 casos registrados no Centro de Atendimento Toxicológico do Espírito Santo. O maior problema está nos minifúndios, que representa a agricultura familiar.

O acefato (O, S-dimetil acetilfosforamidotoato) é o princípio ativo pertencente à classe inseticida acaricida sistêmico de contato e ingestão, que integra o grupo químico dos organofosforados. A aplicação da substância é realizada nas partes aéreas das culturas de algodão, amendoim, batata, brócolis, citros, couve, fumo, pimentão, rosa, soja e tomate, e, entre outros, é também empregado no controle de pragas de plantas ornamentais em vasos e jardins residenciais não comerciais (Campos 2003).

Os Triazóis são fungicidas empregados no controle de doenças causadas por fungos, bactérias ou algas, porém alguns desses compostos inibem, temporariamente, o crescimento dos fungos. O uso de fungicidas vem sendo intensificado, principalmente em culturas de soja, algodão e milho (Konwick *et al.* 2006). Os triazóis são inibidores da demetilação, etapa na síntese do ergosterol, um dos principais componentes da parede celular de fungos pertencentes ao grupo dos ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos.

O fungicida difenoconazol (cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil 4-clorofenil éter) é o princípio ativo da classe fungicida e recomendado para controle de doenças em culturas de alface (Septoriose), banana (Sigatoka-amarela e negra), morango (Mancha-de-Mycosphaerella), etc. O composto integra o grupo químico triazol e provoca o rompimento da parede celular, controlando dessa forma, o crescimento de diferentes classes de fungos (Syngeny, 2007).

Os peixes são organismos com elevada capacidade de bioacumulação, biotransformação, compensação morfofisiológica e é muito utilizado como modelo preditivo de mutação e teratogênese (Klaassen 2001, De Azevedo e Chasin 2004). As principais vias de contaminação nos peixes são: alimentação, brânquias, ingestão de água e através da pele (Heath 1997).

As brânquias, órgãos responsáveis pelo processo respiratório dos peixes, estão localizadas na cavidade opercular e são divididas em arcos de onde saem os filamentos branquiais com suas fileiras de lamelas secundárias (Fergusson 1989). Estas lamelas são muito vascularizadas e sua estrutura histológica apresenta-se revestido por epitélio pavimentoso simples e amparado por células pilares, formadoras de lacunas contendo os capilares sanguíneos, que são responsáveis pelas trocas gasosas. Além disso, outros tipos celulares como as células de cloreto, células mucosas, melanócitos, macrófagos e os linfócitos, podem estar presentes na estrutura (Hibiya 1982, Santos Filho *et al.* 2014).

No processo respiratório, quando ocorrem interferências no ambiente, os peixes desempenham ajustes para obtenção de oxigênio. Um desses processos é a mudança de fluxo de água e de sangue, ambos nas brânquias. Recentemente, foi observada uma terceira opção pelos teleosteos caracterizada pela remodelação da

morfologia branquial (Nillsoon 2007). Desta forma, a determinação das mudanças morfológicas das brânquias é importante ferramenta no diagnóstico e nas consequências fisiológicas do organismo quando expostos a ambientes contaminados (Romão *et al.* 2006). Quando expostos ao inseticida Dimilin, peixes da espécie *Prochilodus lineatus* apresentaram uma série de alterações branquiais, caracterizadas por elevação epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais, fusão lamelar e aneurisma (Maduenho *et al.* 2007).

No Brasil, *Oreochromis niloticus* (tilápiá-do-nylo) é o peixe de água doce mais cultivado em pisciculturas e muito utilizado como bioindicador de poluição aquática. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade dos agroquímicos Glifosato, Difenconazol e sulfluramina utilizados na agricultura familiar, no órgão respiratório da espécie *Oreochromis niloticus* por meio de alterações histológicas em brânquias após a exposição aos agroquímicos. Este estudo foi pioneiro na região e poderá contribuir para a conservação do ambiente aquático e dos cuidados na manipulação de agroquímicos.

Métodos

Desenho Experimental

Organismo teste - *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Osteichthyes: Cichlidae), foram adquiridos de uma aquicultura comercial, selecionado pelo peso e comprimento (153 ± 10 g; $20,83 \pm 1$ cm) e mantidos em um aquário de capacidade de 250 Litros contendo água declorinada. Durante o período de climatização, a temperatura ambiente foi mantida a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. Os peixes foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial (34% proteína). O oxigênio dissolvido na água foi mantido a 6 mg L^{-1} por aeração contínua e o pH monitorado e mantido a 7.2 ± 0.2 . As características físico-químicas (temperatura, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido) do período de aclimatização e do bioensaio foram analisadas por meio de multi-parâmetro YSI 85 e o pH determinado com aparelho Li-300.

Bioensaio – O teste de toxicidade foi desenvolvido com 72 peixes, distribuídos aleatoriamente em 12 aquários de capacidade de 30L (6 peixes/aquário). Quatro dos aquários serviram de controle, com água declorinada. Os outros aquários receberam Acefato (Orthene® 750 BR), Difenconazol (Score®) e Sulfluramida, para as concentrações finais de 1 mg/L, 3.7 mg/L e 0.3 mg/L, respectivamente. Os experimentos foram desenvolvidos em sistema semi-estático, com renovação total das soluções a cada 24h. Os peixes foram mantidos por 96h a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ com aeração e sem alimentação. A qualidade da água foi monitorada durante o período experimental com nenhuma mudança significativa observada. Os peixes foram anestesiados com solução de 10% benzocaína para coleta de sangue. Após este procedimento, os peixes foram eutanizados por decapitação e o

Tabela 1. Média dos parâmetros físico-químicos da água nos diferentes tratamentos do bioensaio. Valores são médias \pm SE

Parâmetros – físico químicos	Referência	Acefato 1 mg/L	Difenconazol 3.7 mg/L	Sulfluramida 0.3 g/L
Temperatura (°C)	22.58 \pm 0.07	22.45 \pm 0.07	22.35 \pm 0.11	22.35 \pm 0.05
pH	7.2 \pm 0.02	5.6 \pm 0.09	5.3 \pm 0.12	6.2 \pm 0.10
OD (mg L ⁻¹)	6.01 \pm 0.65	5.46 \pm 0.35	5.31 \pm 0.82	5.74 \pm 0.98
Saturação O ₂ (%)	68.73 \pm 8.39	61.25 \pm 4.54	62.97 \pm 9.92	64.95 \pm 12.26

segundo arco branquial do lado direito de cada peixe foi coletado (Bury *et al.*, 1998; van Heerden *et al.* 2004). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas de bem estar animal.

Preparação Histológica – Para os procedimentos histológicos, o segundo arco branquial direito foi retirado e imediatamente lavado em solução NaCl 0.9%. Os tecidos foram fixados durante 24h em solução de Bouin, seguido por descalcificação, desidratação em álcool, clareamento com xilol e, finalmente, embebida em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em série (3 μ m de espessura) com auxílio de micrótomo Leica RM 2125 RT, seguidas de secagem à 37°C, durante 24h. As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina, segundo método descrito por Martoja e Martoja-Pierson (1970).

Análises Estatísticas

Para integração planimétrica do tecido inter-lamelar nas brânquias do teleósteo *Oreochromis niloticus* foram contados os campos superpostos com um retículo composto por áreas (S=3L.r) hexagonais, tendo cada uma das áreas 1,82mm² (1820 μ m²), calculada para um conjunto óptico de 400X. Nesta planimetria, em cada integração de área do tecido inter-lamelar foram individualizadas as células cloreto, mucócitos e as células planas superficiais. Em complementação, os outros componentes teciduais presentes na área integrada foram calculados diferencialmente como resíduos na totalização. Assim temos o exemplo:

Na confrontação dos dados entre os conjuntos (grupos) de controle e experimental, para avaliar a existência de diferenças planimétricas das áreas (“S”) foram utilizados os valores expressos em percentual (%) e aplicado o cálculo matemático estatístico “ANOVA” (Snedecor 1956, Hoel 1961).

Resultados

Qualidade da água nos experimentos

Durante o bioensaio a temperatura da água nos aquários não sofreram variações significativas, com valores mantidos entre 22,2 e

22,7°C. O pH aferido em cada meio se manteve constante até o final das 96h, porém quando comparado ao controle, observou-se variações significativas para cada concentração utilizada dos agroquímicos. Por outro lado, a concentração de oxigênio dissolvido variou de 5.74 a 6.01 mg L⁻¹ e a saturação de O₂ foram todos superiores a 60% (Tabela 1).

Análise comportamental

Sinais de intoxicação, resultante da ação dos agroquímicos foram bem caracterizados pelo comportamento dos peixes durante o período experimental. Os peixes apresentaram perda de equilíbrio, movimento opercular rápido, natação errática e histérica, movimento circular e natação na superfície da água. Alguns indivíduos ficaram imóveis no fundo do aquário. Essas alterações comportamentais foram observadas após exposição aos três agroquímicos, variando somente na intensidade. Nenhuma mortalidade foi observada durante o experimento.

Alterações histológicas

A morfologia branquial dos indivíduos referência, de *Oreochromis niloticus*, é similar às outras espécies de telosteos (Wilson e Laurent 2002) e apresenta lamelas branquiais de onde saem os filamentos primários interligados por epitélio escamoso estratificado (tecido interfilamentar). Este epitélio é constituído por diferentes tipos celulares como: células de cloreto, células mucosas e células planas. As brânquias nos indivíduos controle seguiram a morfologia padrão descritas para a espécie, o que demonstra uso de indivíduos sadios e sem registro de qualquer alteração morfológica (Figura 1).

Entretanto, as análises histológicas dos indivíduos

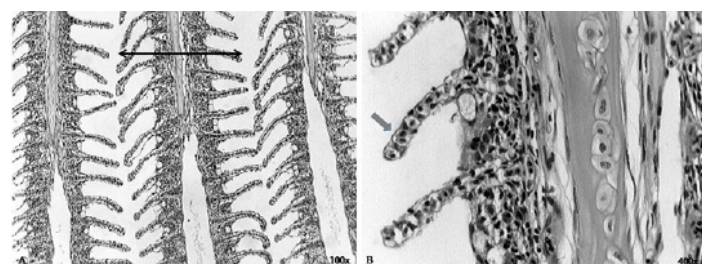


Figura 1 - Lamelas branquiais do controle de *O. niloticus* após 96 horas de bioensaio. A: boa conformação das lamelas e seus filamentos (\leftrightarrow) 100x; B maior aumento confirmando a morfologia do filamento (\rightarrow) 400x.

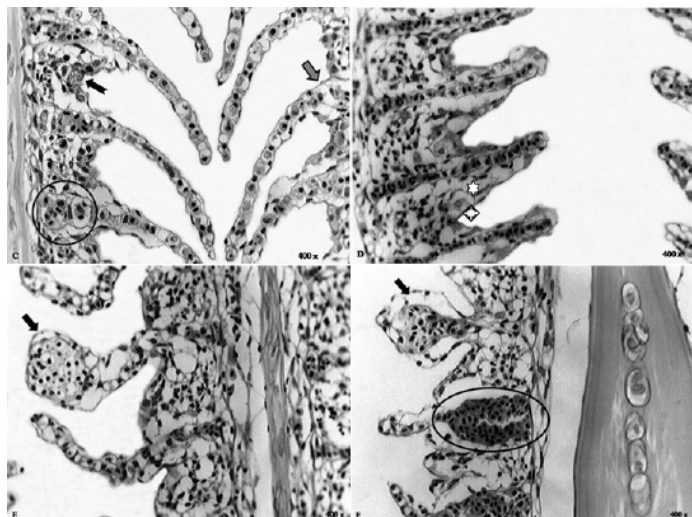


Figura 2 Lamelas branquiais de *O. niloticus* submetidas ao acefato durante 96 horas de bioensaio. C: estão indicadas: a perda de vascularização (→), a dilatação na iminência vascular (○) e a formação de clusters de células cloreto (→) 100x; D: registra a formação de edema (☆) e indicação de hidrólise nas células teciduais (★) 400x; E: observamos a formação de báculos na porção distal dos filamentos (→) 400x; F: acentuada dilatação da iminência vascular (○) 400x.

expostos aos tratamentos com os agroquímicos, permitem visualizar áreas do epitélio intactas em detrimento de outras, com importantes alterações como hiperplasia celular, seguida de preenchimento dos espaços interlamelares, além da elevada incidência de células excretoras de cloreto.

As alterações provocadas pelo acefato podem ser observadas na Figura 2, que expõe número considerável de células de cloreto com epitélio diferenciado na região basal. Nesta condição é observada elevada quantidade de hemossiderina e a ausência de filamentos na lateral das brânquias o que caracteriza a zona de “apagamento” dos filamentos. Outras alterações importantes, resultante da ação do acefato são: presença de edema a base do filamento e no espaço pericapilar, que no conjunto resulta no apoptose do filamento, enfartamento de capilares na porção distal dos filamentos com presença de báculos, filamentos atrofiados, presença de distrofias, vacuolização celular (hidrólise), colapso das veias, acentuando a presença de arteríola na porção média da lamela e na porção pré-capilar.

Quando analisados o tratamento com difenoconazol (Figura 3), é possível registrar alterações branquiais diferenciadas (qualitativamente), em relação ao controle e o acefato. As alterações mais representativas foram: alteração da célula de cloreto, aumento volumétrico das células mucosas, desestruturação e colabação lamelar, perda de filamentos e presença de báculos, seguido de zonas de enfartamentos.

No tratamento com sulfuramida (Figura 4) é possível observar o “apagamento” filamentos, porém menos intenso daquele registrado para tratamentos anteriores. Além disso, foi constatado ainda hipertrofia do epitélio interlamelar, perda de modelagem e muitas alterações profundas nas células de mucócitos, quando comparado ao difenoconazol. As alterações observadas, porém menos intensas, foram relacionadas ao desarranjo celular, desorganização dos filamentos, presença de báculos na porção distal dos filamentos e apoptose.

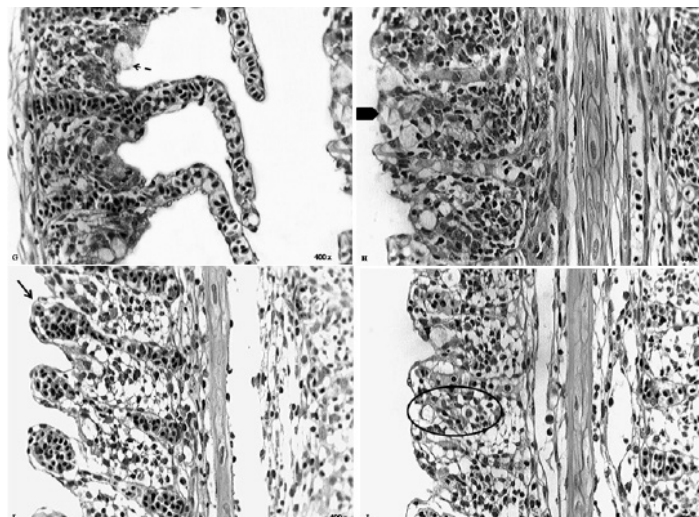


Figura 3 Lamelas branquiais de *O. niloticus* submetidas ao difenoconazol durante 96 horas de bioensaio. G: enfartamento vascular com a perda de conformação dos filamentos (→) 100x; H: ocorrência da proliferação do epitélio interfilamentar com predominância de mucócitos (▶) 400x; I: incidência de báculos na porção distal dos filamentos (→) 400x; J: apagamento vascular e a displasia dos filamentos (○) 400x.

Discussão

A exposição de peixes a agentes químicos perniciosos, presentes no ambiente, é registrada pelas alterações morfológicas observadas nas brânquias, que são essenciais para o desempenho de importantes processos fisiológicos como a respiração, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de resíduos nitrogenados. Alterações histológicas m brânquias têm sido descritas para vários teleósteos expostos a metais (Arellano *et al.* 1999, Boeck *et al.* 2001, Garcia-Santos *et al.* 2006) e outros poluentes (Van der Heuvel *et al.* 2000, Thophon *et al.* 2003, Pane *et al.* 2004).

No presente estudo, a prevalência foi relatar as alterações branquiais resultantes da exposição de *O. niloticus* aos três agroquímicos, e verificar a severidade de cada tratamento nas repostas histológicas. Quando comparados ao controle, os peixes expostos ao acefato apresentaram progressivas modificações no epitélio lamelar e nos filamentos. Essas alterações refletem na aparência do eixo capilar do filamento e no epitélio interfilamentar.

A perda da modelagem e conseqüente apoptose filamentar são constantes nas brânquias expostas ao organofosfato. A hipertrofia epitelial se caracteriza pelo aumento na sua espessura, com

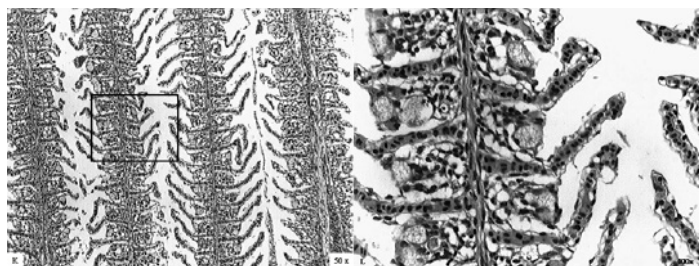


Figura 4 Lamelas branquiais de *O. niloticus* submetidas ao sulfuramida durante 96 horas de bioensaio. K: desestruturação dos filamentos com angulação desordenada 50x; L: maior aumento da área destacada na fotomicrografia 400x.

consequente obstrução da superfície de trocas gasosas nos filamentos.

Por outro lado, foi constatada maior frequência de células mucócitas em vários filamentos, demonstrando mudanças no padrão epitelial interlamelar. Resultados semelhantes foram descritos por Jiraungkoorskul *et al.* (2003), ao estudarem o efeito de glifosato em *O. niloticus*. Após o tempo regulamentar do bioensaio, o progressivo aumento na proliferação epitelial resultou na fusão lamelar.

Em relação ao tratamento com difenoconazol, a desestruturação das lamelas foi também seguida por colabação pareada, o que diminui o espaço para circulação de água e prejudica as trocas gasosas no processo respiratório. Outro episódio freqüente nessas brânquias foi a proliferação do tecido interfilamentar, recobrando o filamento no sentido vertical. Os mucócitos ocorrem raramente enquanto que as células secretoras de cloreto se organizam formando clusteres e na sequência, começam a sofrer processos de hidrólise. Bury *et al.* (1998) e Boeckel *et al.* (2001), atribuem para o afilamento da estrutura, a redução das células mucócitas e de cloreto, e o conseqüente deslocamento de macrófagos e outros leucócitos, em resposta à necrose celular.

Alguns estudos revelaram que o edema intersticial é lesão muito frequente em brânquias de peixes expostos a metais pesados (Mallatt 1985). O levantamento do epitélio lamelar é outra alteração histológica, provavelmente induzida pela incidência do edema (Arellano *et al.* 1999, Pane *et al.* 2004, Schwaiger *et al.* 2004).

Entretanto, edema como elevação epitelial e hiperplasia, pode ser considerado resposta adaptativa do indivíduo, já que aumentam a distância entre o meio externo e o sangue, funcionando assim como barreira protetora (Sepici-Dinçel *et al.* 2009), e estas alterações podem ser resultante da exposição a diferentes poluentes como endossulfan (Nowak *et al.* 1992), arsênico (Hwang e Tsai 1993), drogas (Schwaiger *et al.* 2004) e metais pesados (Karlssoon-Norggren *et al.* 1986, Reid e McDonald 1998, Pane *et al.* 2004).

Os aneurismas foram previamente observados com uso de outras substâncias intoxicantes, cuja severidade variou de acordo com o espécime químico e o tempo de exposição (Van der Heuvel *et al.* 2000, Thophon *et al.* 2003, Schwaiger *et al.* 2004). No presente estudo, os aneurismas foram observados nos peixes expostos aos três tratamentos.

Outra alteração observada é a dilatação da porção distal do filamento formando os báculos. O desenvolvimento dessa estrutura poderia estar relacionado às necessidades de maior aumento da superfície de trocas gasosas.

Finalmente, o tratamento com sulfluramida mostrou-se o mais degenerativo quando comparado ao acefato e difenoconazol. A desestruturação dos filamentos foi acentuada com apoptose, acompanhados de edema localizados. Outra característica que o diferenciou, em relação aos tratamentos anteriores, foi a ausência de células de cloreto e aumento do volume das células mucócitas.

Os agroquímicos acefato, difenoconazol e sulfluramida afetam o ambiente aquático e induzem o aparecimento de lesões nas brânquias de *Oreochromis niloticus* o que pode interferir na fisiologia

respiratória do organismo. As alterações histológicas constituem marcadores confiáveis na caracterização de alterações ambientais.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Vila Velha (UVV), FAPES (Grant #0021/2008) e a FUNADESP (Grant #07/09) pelo apoio dispensado..

Referências

- Arellano JM, Storch V, Sarasquete C (1999) Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology Environmental Safety** 44: 62-72.
- Bury, NR, Jie L, Flick G, Lock RAC, Wendelaar-Bonga SE (1998) Cortisol protects against copper-induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. **Aquatic Toxicology** 40: 193-202.
- Campos S (2003) **Tóxicos/intoxicações – Acefato organofosforado**. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/8685>> Acesso em 14 jul. 2009.
- Castle S, Palumbo J, Prabhaker N (2009) Newer insecticides for plant virus disease management. **Virus Research** 141: 131-139.
- De Azevedo FA, Chasin AAM. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos, RiMa, São Paulo: Intertox, 2004.
- De Boeck G, Grossell M, Wood C (2001) Sensitivity of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) to water-borne silver exposure. **Aquatic Toxicology** 54: 261-275.
- Du A, Chen S, Song D, Li H, Chen Y (2007) Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor. **Biosensors and Bioelectronics** 23: 285-289.
- Ferguson HW (1989) **Systemic Pathology of Fish**, a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Ames, Iowa State University Press.
- Garcia-Santos S, Fontainhas-Fernandes A.; Wilson JM (2006) Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. **Environmental Toxicology** 21:33-46..
- Gentz MC, Murdoch G, King GF (2009) Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. **Biological Control** 52: 208-215.
- Heath AG (1997) **Water Pollution and Fish Physiology**. 2 ed. Florida, Lewis Publishers.
- Hibiya T (1982) **An Atlas of Fish Histology**, normal and pathological features. New York, Gustav Fischer Verlag.
- Hoel PG (1961) **Elementary Statistics**. 3 prt. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Hwang PP, Tsai YN (1993) Effects of arsenic on osmoregulation in the tilapia *Oreochromis mossambicus* reared in seawater. **Marine Biology** 117: 551-558.
- Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachu M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P (2003) Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology** 18: 260-267.
- Karlssoon-Norggren L, Dickson W, Ljungberg O, Runn P (1986) Acid water and aluminium exposure: gill lesions and aluminium accumulation in farmed, brown trout, *Salmo trutta*. **Journal of Fish Diseases** 9: 1-9.
- Klaassen CD (2001) Metais pesados e antagonistas dos metais pesados. In: Goodman, Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, pp 1389-1407.
- Konowick BJ, Garrison AW, Avants JK, Fisk AT (2006) Bioaccumulation

- and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology** 80: 372-381.
- Lins JAPN, Kirschnik PG, Queiroz VS, Cirio SM (2010) Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista da Academia de Ciências Agrárias e Ambientais** 8: 469-484.
- Maduenho LP, Mendes JP, Martinez CBR (2007) Efeitos agudos do inseticida dimilin em parâmetros histológicos do peixe *Prochilodus lineatus*. In: **Anais do 8º Congresso de Ecologia do Brasil**, 2007 set 23-28; Caxambu, BR. Caxambu, Sociedade de Ecologia Do Brasil.
- Mallatt J (1985) Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal Fish Aquatic Science** 42: 630-648.
- Martoja R, Martoja-Pierson M (1970) **Técnicas em Histologia Animal**. Barcelona, Toray Masson.
- Nilsson GE. (2007) Gill remodeling in fish – a new fashion or an ancient secret?. **Journal Experimental Biology** 210: 2403-2409.
- Norheim G, Skaare J, Wiig Ø (1992) Some heavy metals, essential elements, and chlorinated hydrocarbons in polar bear (*Ursus maritimus*) at Svalbard. **Environmental Pollution** 77: 51-57.
- Nowak BF, Deavin JG, Sarjito BL, Munday B.L. 1992 Scanning electron microscopy in aquatic toxicology. **Journal Computer-Assisted Microscopy**. 4: 241-246.
- Pane EF, Haque A, Wood CM (2004) Mechanistic analysis of acute, Ni-induced respiratory toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an exclusively branchial phenomenon. **Aquatic Toxicology** 69: 11-24.
- Peres F, Oliveira-Silva JJ, Della-Rosa HV, Lucca SR (2005) Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva** 10: 27-37.
- Rabouille C, Amouroux D, Anschutz J, Jouanneaux, JM, Gilbert F, Cossa D, Prevot F (2006) Biogeochemical and contaminant cycling in sediments from a human-impacted coastal lagoon – Introduction and summary. **Estuarine Coastal Shelf Science** 72: 387-392.
- Reida SD, McDonald DG (1988) Effects of cadmium, copper and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Canadian Journal Fish Aquatic Science** 45:244-253.
- Romão S, Donatti L, Freitas MO, Teixeira J, Kusma J.(2006) Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives Biology Technology** 49:441-448.
- Santos Filho FM, Rezende KFO, Emerenciano AK, Moreira LM, Vila VB, Borges RM, Pressinotti LN (2014) Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **Atlas de Saúde Ambiental – ASA**, SP 2: 9-22.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD (2004) Toxic effects of the non ion-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic Toxicology** 68: 141-150.
- Sepici-Dinçel A, Calan KBA, Selvi M, Sarikaya R, Sahin D, Ayhan Ozkul I, Erkoç F (2009) Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. **Ecotoxicol Environmental Safety**. 72: 1433-1439.
- Syngenta, acesso em 12 jul. 2007 SYNGENTA. Score. Disponível em: <www.syngenta.com.br/website/...e.../fungicidas/>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- Snedecor WG (1956) **Statistical Methods**. Ames, Iowa State University Press.
- Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan S (2003) Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution** 121: 307-320.
- Van Den Heuvel MR, Power M, Richards J, MacKinnon M, Dixon DG (2000) Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated water. **Ecotoxicology Environmental Safety** 46: 334-341.
- Van Heerden D, Bolso A, Nikinmaa M 2004. Effects of short-term copper exposure on gill structure, methallothionein and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-11 α) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology** 69: 271-280.
- Wilson JM, Laurent P (2002) Fish Gill Morphology: Inside out. **Journal Experimental Zoology** 293: 192-213.
- Yogui GT, Santos MCO, Montone RC (2002) Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananéia estuary, southeastern Brazil. **The Science of the Total Environment** 312: 67-78.