

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

IVELISE TERESA DE CASTRO SACHI

AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DE BRÂNQUIAS E FÍGADO DE
***Prochilodus lineatus* EXPOSTOS A UM NOVO METALO-INSETICIDA,**
COMPLEXO MAGNÉSIO-HESPERIDINA-FENANTROLINA

São Carlos, SP

2019

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

IVELISE TERESA DE CASTRO SACHI

AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DE BRÂNQUIAS E FÍGADO DE
Prochilodus lineatus **EXPOSTOS A UM NOVO METALO-INSETICIDA,**
COMPLEXO MAGNÉSIO-HESPERIDINA-FENANTROLINA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Área de Concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes.

São Carlos, SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ivelise Teresa de Castro Sachi, realizada em 11/10/2019:

Handwritten signature of Marisa Narciso Fernandes in blue ink, written over a horizontal line.

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
UFSCar

Handwritten signature of Francine Perri Venturini in blue ink, written over a horizontal line.

Profa. Dra. Francine Perri Venturini
USP

Handwritten signature of Marise Margareth Sakuragui in blue ink, written over a horizontal line.

Profa. Dra. Marise Margareth Sakuragui
UEMG

**A Deus, que me amparou em todos
os passos, mesmo quando as pedras
foram jogadas e com seu auxílio às
fiz de degraus.**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa N. Fernandes por estar sempre disposta a me orientar, mesmo que a distância, por toda colaboração com ideias, sugestões e correções, e pela confiança e compreensão principalmente por não deixar que desistisse de mim, mesmo nos momentos de aflição.

Agradeço a minha família, meu pai (in memória) que busquei amparo, minha mãe que me mostrou que eu consigo atingir meus objetivos, a minha irmã, irmão, sobrinha e cunhados por todo apoio dado e pela compreensão nos momentos onde mais houve dificuldade.

Aos professores que aceitaram ser indicados e fazer parte da banca examinadora.

Ao Programa De Pós-Graduação Em Ecologia E Recursos Naturais – PGERN pela oportunidade oferecida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2012 / 25299-6) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. 301615/2015-2) pelo suporte financeiro ao Dr. João Batista Fernandes e Dra. Marisa Narciso Fernandes, respectivamente, que possibilitou este estudo

À Nicole e ao Matheus, por entender que as vezes só a presença importa.

Ao João e ao Lucas, por me acompanharem nessa jornada, sendo de grande importância e me aparando todas as vezes que estiveram presentes, mas agradeço principalmente à Nádia, por entender que as vezes só a presença importa.

À Driele Tavares, ao Marcelo Gustavo Paulino, à Marina Marques Bonomo e à Priscila Siqueira por todo o aprendizado transmitido, pela paciência, pela convivência e pelo auxílio na realização deste projeto.

A todos os meus amigos da academia, pelos incentivos e risadas.

Agradeço a Deus, por me dar forças para não desistir, apesar de muitas vezes eu ter desistido de mim mesma, o que muitas vezes foi meu maior defeito neste percurso, porém minha fé e o apoio Dele me fizeram ter um último suspiro de esperança.

RESUMO

Agrotóxicos têm sido continuamente aplicados na agricultura no controle de insetos considerados pragas agrícolas, o que aumenta a probabilidade destes produtos atingirem o meio aquático e afetarem a biota, incluindo os peixes. O presente estudo é de grande importância ecológica, pois avaliou as lesões histopatológicas, nas brânquias e fígado de curimatã, *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) após 24 e 96 horas de exposição a concentrações crescentes (0, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) do novo metaloinseticida [Mg(hesp)₂(phen)], um complexo de Mg com hesperidina e a fenantrolina como um agente quelante, denominado MgHP. Nas brânquias, as alterações mais frequentes foram atrofia celular no epitélio do filamento e nas lamelas, constrição/ruptura/dilatação do canal marginal das células pilares e hiperplasia do epitélio lamelar, sendo que as mesmas ocorreram com maior frequência após exposição a 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP. O índice de alterações (I_{org}) das brânquias aumentou significativamente após 24 horas de exposição de 10 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP e após 96 horas de exposição a 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP. A proliferação das células de cloreto (CC) ocorreu após 96 horas de exposição a 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP, e foi mais frequente no epitélio do filamento. No fígado foram observadas mudanças na estrutura celular, como hipertrofia, degeneração citoplasmática e o aparecimento de substâncias citoplasmáticas intracelulares. Foram mais comuns e significativas nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP, em ambos períodos (24 e 96 horas) de exposição. O I_{org} do fígado aumentou significativamente após 24 horas de exposição nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP e após 96 horas de exposição nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP. Os dados obtidos sugerem que essas lesões podem afetar a estrutura dos órgãos alterando as funções fisiológicas do organismo exposto, e revelaram diferente sensibilidade das brânquias em relação ao fígado. As brânquias foram mais sensíveis nas primeiras horas de contato com o MgHP e mostraram recuperação do tecido branquial após 96 horas, enquanto o fígado apresentou maiores alterações após 96 horas de exposição. Em relação às CC, o MgHP afetou a densidade dessas células após 24 horas, já que uma redução foi observada, o que poderia causar um desequilíbrio eletrolítico transitório. Por outro lado, verificou-se um aumento na densidade de CC após 96 horas que sugere uma possível resposta compensatória de forma a manter o equilíbrio iônico do animal. De forma geral, o MgHP não é tóxico para *P. lineatus* em concentrações baixas, tais como 0,1 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP, mas é potencialmente tóxico em concentrações muito altas como 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Palavra-chave: Citotoxicidade, *Prochilodus lineatus*, Ecotoxicologia, Hesperidina, Pesticidas.

ABSTRACT

Pesticides have been continuously applied in agriculture to control insects considered agricultural pests which increases the likelihood of these products reaching the aquatic environment and affecting the biota, including fish. The present study is of great ecological importance because it evaluated the histopathological lesions and the gills and liver of curimatá, *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) after 24 and 96 hours of exposure to increasing concentrations (0, 0,1, 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) of the new metallo-insecticide [Mg(hesp)₂(phen)] a Mg complex with hesperidin and phenanthroline as a chelating agent called MgHP. In the gills, the most frequent alterations were cell atrophy in the filament epithelium and lamellae, constriction / rupture / dilatation of the marginal canal of the pillar cells, lamellar epithelium hyperplasia, which occurred more frequently after exposure to 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of MgHP. Gill change index (I_{org}) increased significantly after 24 h exposure from 10 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ MgHP and after 96 h exposure to 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ MgHP. Chloride (CC) cell proliferation occurred after 96 h of exposure to 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ MgHP and was more frequent in the filament epithelium. In the liver, changes in cellular structure were observed, such as hypertrophy, cytoplasmic degeneration and the appearance of intracellular cytoplasmic substances. They were more common and significant at concentrations of 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ MgHP in both exposure periods (24 and 96 h). Liver I_{org} increased significantly after 24 h exposure at 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ MgHP concentrations and after 96 h exposure at 10, 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ MgHP concentrations. The data obtained suggest that these lesions may affect the organ structure, altering the physiological functions of the exposed organism and revealed different sensitivity of the gills in relation to the liver. The gills were more sensitive in the first hours of contact with MgHP and showed recovery of gill tissue after 96 h while the liver showed greater changes after 96 h of exposure. Regarding WC, MgHP affected the density of these cells after 24 h, as a reduction was observed, which could cause a transient electrolyte imbalance. On the other hand, an increase in CC density after 96 h suggests a possible compensatory response in order to maintain the ionic balance of the animal. In general, MgHP is not toxic to *P. lineatus* at low concentrations, such as 0,1 and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ MgHP, but is potentially toxic at very high concentrations such as 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Keywords: Cytotoxicity, *Prochilodus lineatus*, Ecotoxicology, Hesperidin, Pesticides.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O MEIO AMBIENTE.....	1
1.2. CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL	2
1.3. PEIXES E A CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA.....	4
1.4. BIOMARCADORES	5
1.5. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS - HISTOPATOLOGIA	6
1.7. <i>Prochilodus lineatus</i>	7
2. OBJETIVOS	9
2.1. OBJETIVO GERAL	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. CARACTERIZAÇÃO DE INSETICIDA	10
3.2. PEIXE E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	10
3.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA	11
3.4. IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DE CLORETO NAS BRÂNQUIAS	12
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
4. RESULTADOS	14
4.1. HISTOPATOLOGIAS NAS BRÂNQUIAS	14
4.2. IMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS DE CLORETO NAS BRÂNQUIAS	19
4.3. HISTOPATOLOGIAS NO FÍGADO.....	23
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS	36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do metalo-inseticida [Mg(hesp) ₂ (phen)].....	3
Figura 2 - Exemplar Juvenil de curimatá (<i>P. lineatus</i>)	8
Figura 3 - Brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos ao metalo-inseticida MgHP durante 24h.....	17
Figura 4 - Brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos ao metalo-inseticida MgHP durante 96h.....	18
Figura 5 - Índice de alterações totais nas brânquias (I_{org}) de <i>Prochilodus lineatus</i>	19
Figura 6 - Imunohistoquímica da enzima $Na^+ /K^+ -ATPase$ nas células de cloreto de <i>Prochilodus lineatus</i> expostas ao metalo-inseticida [Mg(hesp) ₂ (phen)] por 24h	21
Figura 7 - Imunohistoquímica da enzima $Na^+ /K^+ -ATPase$ nas células de cloreto de <i>Prochilodus lineatus</i> expostas ao metalo-inseticida [Mg(hesp) ₂ (phen)] por 96h.....	22
Figura 8 - Densidade de células de cloreto (CC) nos filamento e lamelas das brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i>	23
Figura 9 - Fígado de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos ao metalo-inseticida MgHP durante 24h.....	26
Figura 10 - Fígado de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos ao metalo-inseticida MgHP durante 96h.....	27
Figura 11 - Índice de alteração totais nos fígados (I_{org}) de <i>Prochilodus lineatus</i>	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índices de alterações (I_{alt}) das brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i>	15
Tabela 2 - Índice de alterações (I_{alt}) dos fígados de <i>Prochilodus lineatus</i>	24

1. INTRODUÇÃO

1.1 O MEIO AMBIENTE

Um sistema ecológico ou ecossistema trata-se de qualquer unidade que inclua todos os organismos (a comunidade biótica) em uma dada área interagindo com o ambiente físico de modo que um fluxo de energia leve às estruturas bióticas claramente definidas e à ciclagem de materiais entre componentes vivos e não vivos. Um ecossistema é mais que uma unidade geográfica (ou ecorregião): é uma unidade de sistema funcional, com entradas, saídas e fronteiras que podem ser tanto naturais como arbitrárias (ODUM e BARRET, 2011).

Com essas interações entre os seres vivos e os fatores abióticos de um ecossistema, podemos identificar ações que podem alterar o desenvolvimento de determinados organismos em um local que sofre interferências antrópicas. A análise da vulnerabilidade dos ecossistemas é um indicador da capacidade de suporte ambiental. As comunidades aquáticas impactadas pela agricultura são geralmente afetadas por misturas complexas de inseticidas, muitos deles com mecanismos de ação ainda desconhecidos.

Um ambiente estável e livre de contaminantes seria o adequado para a sobrevivência das espécies de fauna e flora. Os seres vivos conseguem viver apenas dentro de seu limite de tolerância, ou seja, entre os limites inferiores e superiores de uma série de fatores bióticos e abióticos, tais como interações ecológicas, temperatura, intensidade luminosa, nutrientes, entre outros. Entretanto, há um acréscimo de interferência que afeta tanto os fatores bióticos quanto os abióticos e também a biota de um local, como o uso inadequado de insumos químicos (elementos utilizados no processo de produção, tais como inseticidas).

1.2. CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Os insumos químicos são os contaminantes aquáticos mais comuns resultantes de atividades antropogênicas. Os pesticidas foram desenvolvidos para eliminar alguma forma de vida, mas também podem atingir espécies não-alvo (GRISOLIA, 2005). Vários insetos são considerados pragas para a agricultura e silvicultura pois podem afetar as plantações, levando a uma perda potencial de toda a colheita (ZANETTI et al. 2003). Entre eles, as formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*), que causam desfolhamento severo das plantas, são uma das principais pragas das áreas brasileiras de cultivo e reflorestamento (DECIO et al., 2013). Assim, abordagens químicas e biológicas têm sido realizadas para controlar esses insetos, sendo que o controle químico tem sido a tecnologia de larga escala amplamente utilizada nesses casos (SCHOEREDER et al., 2012).

Os pesticidas mais utilizados para o controle de formigas-cortadeiras são a sulfluramida, fipronil, clorpirifós e deltametrina, muitos dos quais são persistentes e tóxicos para os espécimes, possuindo os mesmos mecanismos de ação para os organismos alvos e não-alvos, afetando-os pelo seu nicho ecológico e não somente por bioacumulação.

A hesperidina é um flavonóide naturalmente produzido por plantas cítricas e que possui ação inseticida. Quando complexado com magnésio e fenantrolina como agente quelante ($[Mg(hesp)_2(phen)] - MgHP$ (Fig. 1), torna-se mais solúvel em água, o que potencializa sua ação inseticida, sendo utilizado em forma de iscas para as formigas. Este metalo-inseticida apresenta um maior tempo de ação atuando em relação aos demais produtos químicos (COUTINHO et al., 2005), e tem sido considerado para substituir o uso de outros inseticidas persistentes, como a sulfluramida. O magnésio (Mg) complexado com este flavonóide aumenta a hidrofilia do composto, amplificando as

atividades biológicas do flavonóide livre, e é altamente aplicável nas indústrias agrícola, química e farmacêutica (OLIVEIRA et al., 2013, BONOMO 2018). Da mesma forma que a hesperidina, as piretrinas, são estéreis tóxicos isolados de flores das espécies *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas, que dão origem ao um derivado sintético usado com pesticida, os piretróides (NASUTI et al, 2003; SPENCER et al, 2001, VALENTINE, 1990).

As piretrinas foram utilizadas como inseticidas durante muitos anos, devido a sua ação sob uma vasta variedade de insetos e à baixa toxicidade em mamíferos, quando em circunstâncias de uso adequado. Entretanto, as piretrinas naturais apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, o que diminui a sua eficácia no controle de pragas da agricultura e de outros insetos (CHEN, 1996). Assim como o complexo MgHP, os piretróides foram sinteticamente produzidos. Ambas as substâncias foram extraídas de plantas e modificadas para o uso na forma de inseticida na agricultura, há uma ampla gama de estudos realizados sobre os impactos dos piretróides. Já sobre o complexo MgHP, por tratar-se de uma substância nova, pouco se sabe sobre possíveis impactos fora do laboratório ou de um estudo controlado, ou seja, no ambiente natural.

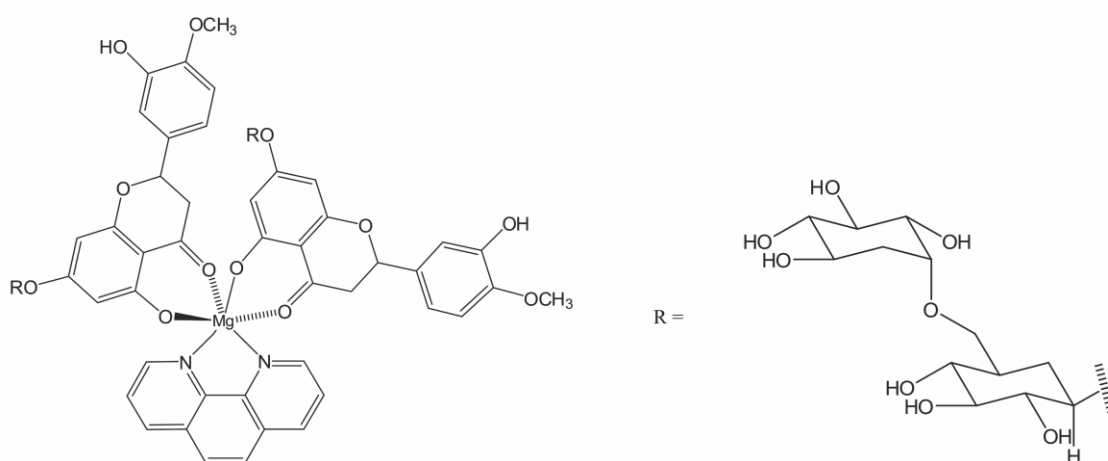


Figura 1. Estrutura do metalo-inseticida $[Mg(hesp)_2(phen)]$ denominado MgHP (BONOMO et al., 2019).

A aplicação em larga escala de produtos químicos agrícolas aumenta a probabilidade dessas substâncias atingirem o meio aquático, contaminando o ecossistema local por meio da bioacumulação na biota aquática, incluindo os peixes, e podendo causar alterações fisiológicas e histológicas.

1.3. PEIXES E A CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

A saúde dos peixes tem sido alvo de vários estudos devido ao uso abusivo de substâncias tóxicas, tais como os insumos agrícolas, que podem afetá-los diretamente. Estudos realizados com peixes neotropicais, como o curimatá (*Prochilodus lineatus*) e outras espécies, já demonstraram que o *P. lineatus* é suscetível a ação de xenobióticos como cobre, alumínio, atrazina, cianotoxinas, diflubenzuron, glifosato, clomazone e organoclorados ocorrendo alterações genéticas, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (BENZE et al., 2016; CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; MAZON et al., 2002, PAULINO et al., 2012 a, b, 2014, 2017a, b; SHIOGIRI et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; MADUENHO E MARTINEZ, 2008, TAVARES et al., 2018).

Acessibilidade às barreiras biológicas que separam os organismos de seu meio envolvente, membranas celulares epiteliais e estruturas biológicas como brânquias, pele e tegumento, controlam a entrada e os processos de absorção dos químicos, que depende diretamente da biodisponibilidade do contaminante (JESUS, 2009). Havendo a presença de contaminantes dissolvidos na água em que os organismos se encontram, sua contaminação será consequência dessa exposição.

As brânquias dos organismos aquáticos, onde ocorrem as trocas gasosas e iônicas, tratam-se de órgãos muito sensíveis à exposição de poluentes (DI GIULIO E HINTON, 2008). Distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica são aspectos característicos de estresse em peixes. Isso ocorre devido à íntima relação entre os fluidos corpóreos nas brânquias e o ambiente aquático (WENDELAAR BONGA, 1997). Assim como as

brânquias, o fígado também pode ser considerado um órgão-alvo em ambientes degradados devido a sua grande importância no metabolismo de xenobióticos e sua alta sensibilidade a esses compostos. Portanto, alterações na estrutura hepática podem ser significativas na avaliação da saúde do peixe (HEATH, 1995). Brânquias e fígado são órgãos adequados para análise de alterações histopatológicas visando determinar os efeitos da contaminação aquática em peixes (BERNET et al., 1999; POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

1.4. BIOMARCADORES

As modificações nos diferentes níveis biológicos (celulares, teciduais e sistêmicos) são indicativas dos danos – efeitos biológicos – que os contaminantes podem provocar nos peixes (NOGUEIRA et al., 2011). Tais modificações são conhecidas como biomarcadores. As duas características mais importantes dos biomarcadores são: a) a identificação das interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos; b) a mensuração de efeitos subletais (JESUS e CARVALHO, 2008).

Os biomarcadores são uma resposta a um organismo em exposição, e sua ocorrência vai resultar na resposta arremetida, mesmo que os biomarcadores sejam resposta a outros estressores e não somente ao complexo MgHP.

Entender como os biomarcadores atuam em peixes é complexo e possui alta relevância ecológica, os critérios para utilização de um biomarcador no monitoramento ambiental são perfeitamente aceitáveis para os peixes, pois estes são organismos sensíveis a alterações ambientais (STEGEMAN et al., 1992). Os biomarcadores podem ser genéticos, bioquímicos, fisiológicos ou histológicos, e indicam a exposição à xenobióticos ou os efeitos desses xenobióticos (HUGGETT et al., 1992).

Leonzio e Fossi (1993) ampliaram a definição de biomarcadores proposta pela National Academy of Sciences (1993), definindo o que propuseram chamar de

biomarcadores ecotoxicológicos como variações bioquímicas, celulares, fisiológicas e/ou comportamentais que possam ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos orgânicos, em organismos ou populações, de forma a evidenciar exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos ou radioativos.

1.5. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS - HISTOPATOLOGIA

Biomarcadores morfológicos são indicadores de alterações celulares em consequência de alterações em processos bioquímicos e fisiológicos, tais como as alterações observadas nas brânquias: aneurisma (no canal marginal lamelar ou na região das células pilares); atrofia das células do filamento ou lamelar; alterações no epitélio de filamento, como descolamento e edema; células pilares (constricção/ruptura/dilatação do canal marginal); congestão/hiperemia/hemorragia nas lamelas; fusão parcial e/ou total de lamelas; hipertrofia do epitélio lamelar; hiperplasia do epitélio lamelar; necrose celular (focal/ total); proliferação de células de cloreto na lamela e no filamento, bem como as observadas no fígado: substâncias citoplasmáticas intracelulares; arquitetura hepática e alterações na estrutura celular; alterações nucleares; aneurisma; atrofia; centros de melanomacrófagos; degeneração citoplasmática; hemorragias; hipertrofia; hiperemia e necrose (POLEKSIC E MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994, BERNERT et al., 1999).

Assim como os biomarcadores bioquímicos e fisiológicos, os marcadores morfológicos indicam que um organismo foi exposto a um poluente. Esses biomarcadores são utilizados em vários estudos que demonstram a importância das análises dos xenobióticos e seus impactos ambientais.

As análises histopatológicas permitem identificar alterações na morfologia de células, tecidos e órgãos de um organismo quando o mesmo é exposto a um xenobiótico e comparado a um grupo de referência e/ou controle. As histopatologias são biomarcadores que informam que órgãos são mais sensíveis à ação de um determinado

contaminante ambiental, e aparecem como uma resposta a estressores, ou seja, alterações bioquímicas fisiológicas podem ocorrer nos órgãos, resultando em alterações morfológicas. Assim, histopatologias são consideradas indicadores da presença de substâncias tóxicas em seres vivos.

A imunohistoquímica permite determinar a localização ou distribuição de um antígeno (e.g. proteínas ou parte delas) em tecidos após uma ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico. No caso das brânquias, permite quantificar a densidade de células de cloreto (CC) e sua distribuição nos filamentos e lamelas branquiais tanto em peixes de água doce, como nos marinhos.

Em peixes de água doce, as brânquias captam íons Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} ativamente através das CC, que estão diretamente relacionadas à regulação iônica nesses animais (MAYERGOSTAN et al., 1987; BINDON et al., 1994; HIROSE et al., 2003). As CC normalmente estão localizadas nos filamentos próximos à base das lamelas (PERRY, 1997). As CC desempenham um papel essencial na manutenção do equilíbrio iônico do animal. Essas células são ricas em mitocôndrias e possuem várias ATPases como $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ (NKA) e $\text{Ca}^{2+} \text{-ATPase}$. Elas também têm Ca^{2+} e canais de Na^+ , bem como trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ que refletem sua importância no transporte de íons através das brânquias (PERRY, 1997; CLAIBORNE et al., 2002).

1.7. *Prochilodus lineatus*

A espécie *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837), conhecida popularmente como Curimba ou Curumbatá, tem a seguinte classificação sistemática:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Axtinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero Prochilodus

O curimatá, *P. lineatus*, tem ampla distribuição nos rios da região sudeste do Brasil. Essa espécie tem sido considerada como modelo para estudos de toxicidade nessa região e tem potencial para ser utilizada como bioindicadora por possuir moderada a alta sensibilidade a xenobióticos e devido ao hábito alimentar detritívoro, o qual coloca o animal em contato com xenobióticos presentes tanto na água quanto no sedimento (CARVALHO e FERNANDES, 2006; CAMARGO et al., 2009; GALINDO et al., 2010; MODESTO e MARTINEZ, 2010).



Figura 2. Exemplar Juvenil de curimatá (*P. lineatus*); (Tese: Talita Laurie Lustosa Do Carmo, 2015)

A espécie *P. lineatus*, por meio de seus hábitos, conduz biomassa para os níveis superiores da cadeia alimentar. Devido às contaminações por xenobióticos e alterações ecossistêmicas muitas vezes não estudadas com afinco e nem levadas em consideração, principalmente em organismos aquáticos onde as alterações fisiológicas e morfológicas são significativas, há a demanda de uma observação mais detalhada de acordo com a fisiologia específica de cada espécie.

A necessidade de desenvolver novas técnicas de aprimoração do cultivo agrícola se faz constante e, em consequência deste fato, uma das melhores medidas para controle e conhecimento de compostos seria testar seus efeitos em organismos vivos. Visando a possível reação no seu habitat, o *P. lineatus* foi exposto ao complexo MgHP para análise da resposta estressora a esse xenobiótico em concentrações diferentes, tornando possível identificar o limite de uso da substância para que o ambiente sofra o menor impacto possível.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de um novo metaloinseticida, o complexo $[Mg(hesp)_2(phen)]$, denominado MgHP, no peixe neotropical curimatá, cientificamente nomeado *P. lineatus*, através de análises morfológicas das brânquias e fígado.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O estudo teve como objetivos específicos:

- Identificar as possíveis alterações histopatológicas nas brânquias causadas por exposição a dosagens subletais de MgHP em *P. lineatus*;
- Identificar possíveis alterações nas CC e sua distribuição nos filamentos e lamelas das brânquias da espécie *P. lineatus*, expostos a dosagens subletais de MgHP;
- Identificar possíveis alterações histológicas no fígado da espécie *P. lineatus* causadas por exposição a dosagens subletais de MgHP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DE INSETICIDA

A hesperidina complexada com magnésio (II) ($\text{MgC}_{68}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_{30}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (OLIVEIRA et al, 2013) e fenantrolina (MgHP) foi fornecida pelo Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica do Laboratório de Química da Universidade Federal de São Carlos. MgHP é um pó de cor amarela com picos de absorvância de 260-300/nm, que possui alta estabilidade fotoquímica e estabilidade química na faixa de pH 3 a 9 e solubilidade em água igual a 472 mg L^{-1} (OLIVEIRA et al., 2013).

3.2. PEIXE E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade Federal de São Carlos (Proc. Nº 3475090815).

Espécimes de juvenis de *P. lineatus* (massa corporal: $29,55 \text{ g} \pm 10,82$; comprimento total: $13,39 \text{ cm} \pm 1,43$) foram obtidos da Piscicultura de Santa Cândida (Santa Cruz da Conceição, SP) e mantidos em laboratório por 30 dias em fotoperíodo natural (~ 12:12 horas). Os aquários, com 180 litros, foram mantidos com água livre de cloro e aeração constante; os animais foram alimentados com ração comercial (FRI-ACQUA 40, Rações Fri-Ribe, 40% de proteína), ad libitum. As variáveis de aclimatização da água foram: O_2 dissolvido 90-95%; pH 6,95-7,46; condutividade elétrica 51-61 $\mu\text{S/cm}$ e temperatura 24-25 °C.

Após a aclimação, os peixes foram divididos aleatoriamente em seis grupos ($n = 10$ cada grupo) em aquários experimentais de 180L e os protocolos de exposição estática foram realizados em duplicata. A alimentação foi suspensa 24 h antes do início dos experimentos, os animais não foram alimentados durante os experimentos. As variáveis físicas e químicas da água foram as mesmas que no período de aclimação.

As concentrações de MgHP foram: 0,0 (controle), 0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 μgL^{-1} , escolhidas, definidas desta forma por não haver informações sobre o complexo MgHP na resolução CONAMA (BRASIL, 2005), e de forma a abranger uma ampla variação de concentrações uma vez que não havia estudos prévios sobre a toxicidade do MgHP (BONOMO, 2018). As concentrações experimentais foram obtidas por diluição seriada em água do aquário a partir de uma solução estoque preparada em banho ultrassônico de baixa frequência (40 KHz) (Q335D, QUIMIS®, Brasil). Os animais foram expostos por 24 h e 96 horas.

Após o período de exposição, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) e posteriormente mortos pela secção da medula espinhal. Brânquias e fígado foram removidos imediatamente e amostras de cada órgão foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,3.

3.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Amostras de brânquias e fígado fixadas, foram desidratadas em séries crescentes de etanol até 95% (1 hora cada) e embebidas e incluídas em historesina (Leica, Alemanha). Após inclusão, cortes histológicos (3 μm de espessura) foram realizados em micrótomo (Micron HM 360). As secções histológicas das brânquias foram coradas com azul de toluidina e as do fígado foram coradas com azul de toluidina e fucsina básica. As alterações histopatológicas nas brânquias foram analisadas em 5 campos em cada filamento e 5 filamentos branquiais aleatórios em cada amostra. Secções histológicas do fígado foram analisadas em 5 campos aleatórios em cada seção e 5 seções por animal. As seções foram examinadas usando um microscópio de luz (Olympus BX51; Olympus. Dinamarca) com câmera de vídeo e conectado a um computador com software específico para captura de imagem (Plus Image Analysis - Olympus DP2-B5W).

As análises histopatológicas avaliaram a distribuição das lesões no órgão analisado e a gravidade das alterações. As lesões foram classificadas em escores (Sc) e fator de importância (Fi), de acordo com BERNET et al. (1999), modificado por Paulino et al. (2015). Os Sc foram: ausência de ocorrência (valor numérico atribuído = 1); ocorrência rara (valor numérico atribuído = 2); baixa ocorrência (valor numérico atribuído = 3); ocorrência moderada (valor numérico atribuído = 4); ocorrência frequente (valor numérico atribuído = 5).

O Fi indica como tal alteração afetaria a função do órgão e a possibilidade do peixe sobreviver e recebe os seguintes valores: (1) lesões que são facilmente reversíveis e de mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o estressor é neutralizado e tem importância patológica moderada; (3) lesões geralmente irreversíveis e de extrema importância patológica.

Assim, considerando a distribuição Sc e Fi para cada mudança, o índice de mudança (I_{alt}) dos indivíduos foi calculado como $IL = Fi \times Sc$ e o resultado do índice de lesão de órgão de cada órgão (I_{Org}) foi calculado como $I_{Org} = \sum L$.

3.4. IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DE CLORETO NAS BRÂNQUIAS

As brânquias foram lavadas com solução salina e amostras (5 a 6 filamentos branquiais) foram fixadas em solução de Bouin (6 h), desidratadas em série crescente de etanol até etanol absoluto, diafanizadas com xilol e embebidas em parafina. Seções sagitais (8 μ m de espessura) foram confeccionadas e processadas de acordo com a técnica do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) para visualização das células de cloreto, através da identificação da unidade α da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA), segundo DANG et al. (2000). As lâminas foram pré-incubadas (20 min) com 20% de soro normal de cabra (Normal Goat Serum – Gibco Invitrogen) para bloquear sítios de ligação não específicos (em câmara úmida). Posteriormente as lâminas foram incubadas “overnight” com o

anticorpo monoclonal α -5 anti unidade α da NKA (Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences, University of Iowa, USA) diluído 1:1000. No dia seguinte, os cortes histológicos foram incubados com o segundo anticorpo de cabra anti-rato peroxidase conjugado (GAMPO, Chemicon International, USA) diluído 1:100. O complexo anticorpo-antígeno foi visualizado corando os cortes histológicos com 3-3-diaminobenzidina em sulfato de níquel (II) amoniacal hexahidratado (DAB-Ni 0,05 M) em solução salina tamponada com tampão Tris (pH 7,4), contendo H_2O_2 (0,03 %) que foi adicionada imediatamente antes do uso. A coloração foi interrompida com água destilada (2x).

Finalmente, as seções foram desidratadas e montadas com Entellan (Merck). As células de cloreto foram quantificadas em relação ao comprimento do filamento (mm) de acordo com sua localização: no filamento branquial (CCF) ou nas lamelas branquiais (CCL), utilizando um microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Denmark) e o software analisador de imagem (Motic Image Plus 2.0). Para cada seção do mesmo peixe, cinco filamentos foram selecionados aleatoriamente e medidos para quantificação CC. Os resultados foram expressos como o número de CC por mm^2 de filamento e/ou lamela (média \pm DP).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada aplicando o teste de D'Agostino-Pearson. Anova não-paramétrica OneWay ANOVA (pós-teste de Kruskal-Wallis e Dunns) foi aplicada para os dados de histopatologia para verificar se havia diferença significativa entre os tratamentos. Nas análises de imunohistoquímica foi aplicado o teste paramétrico OneWay ANOVA $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

Durante o experimento não houve mortalidade dos animais, as variáveis de água permaneceram constantes como já descrito na metodologia para ambos os tempos de exposição (24 e 96 h).

4.1. HISTOPATOLOGIAS NAS BRÂNQUIAS

As brânquias dos grupos controle (24 e 96 h) apresentaram epitélio filamentar constituído por vários tipos de células: células de pavimento, cloro e mucosa e lamelas finas constituídas por duas camadas celulares. A maioria das células da camada em contato com o meio aquático são células de pavimento e algumas células de cloreto são encontradas entre elas, ambos os grupos de controle mostraram células de cloreto nas lamelas (Fig. 3A, 4A). Algumas alterações histopatológicas foram encontradas distribuídas aleatoriamente nas brânquias dos grupos controle, como atrofia celular, descolamento epitelial e hiperplasia (Tabela 1, Fig. 3A. 4A).

A exposição ao MgHP aumentou a frequência de descolamento epitelial, hiperplasia de células de cloreto, atrofia celular e causou outras histopatologias, como alterações nas células pilares e hiperplasia focal do epitélio filamentar (Tabela 1, Fig. 3B-F e 4B-F). Os grupos expostos no período de 24 h a doses de concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle, sendo estas dosagens as menores, no entretanto, após exposição no período de 96 h, observou – se aumento significativo do descolamento epitelial lamelar e alterações no epitélio filamentar ocorreram a partir da dosagem de concentração de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Mudanças significativas no I_{alt} ocorreram em animais expostos nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP em ambos os períodos de exposição, 24 e 96 h (Tabela 1) e resultaram em aumento significativo de I_{org} após 24 h de exposição a concentrações. de 10, 100 e

1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP e após 96 h de exposição às concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP (Fig. 5).

Tabela 1. Índices de alterações (I_{alt}) das brânquias de *Prochilodus lineatus* dos grupos controles ($0,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e expostos a $0,1, 1, 10, 100$ e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ do metalo-inseticida [$\text{Mg}(\text{hesp})_2(\text{phen})$], denominado MgHP durante 24 e 96 h. (*) indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle, Fi = fator de importância ($p < 0.05$).

Índice de Alterações (I_{alt}) de brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i>													
Alterações	Fi	24 h						96 h					
		MgHP ($\mu\text{g L}^{-1}$)						MgHP ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
		0	0,1	1	10	100	1000	0	0,1	1	10	100	1000
Aneurisma (lamelar e canal marginal)	1	1,0	1,0	1,2	1,1	1,3*	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,3*
Atrofia celular	2	2,2	2,3	2,7	4,2	4,8*	4,1	3,4	2,4	6,1	6,1	6,7	7,9*
Alterações no epitélio do filamento	1	1,0	1,2	2,1	2,6*	1,9	2,2	1,0	1,4	3,4*	2,6	3,0	3,1
Células pilares (constrição/ruptura/dilatação do canal marginal)	1	1,0	1,5	1,2	1,7	1,6	2,2*	1,0	1,6	2,4	2,8	3,1	4,0*
Congestão/hiperemia/hemorragia sanguínea	1	1,0	1,3	1,3	1,0	1,4	1,6*	1,0	1,4	1,8	2,4	3,0	4,0*
Deslocamento do epitélio e edema	1	1,0	1,3	1,2	1,2	1,7	1,8*	1,0	1,2	2,1*	1,4	1,5	2,0
Fusão parcial de lamelas	1	1,0	1,2	1,6	1,9*	1,6	1,3	1,0	1,0	2,0	1,8	2,7*	2,6
Fusão total de lamelas	2	2,0	1,0	2,2	2,2	3,0*	2,0	2,0	2,3	3,0*	2,0	2,4	2,3
Hipertrofia do epitélio lamelar	1	1,0	1,3	1,1	1,4*	1,3	1,0	1,0	1,2	1,8	1,3	1,8	3,5*
Hiperplasia do epitélio lamelar	2	2,0	2,0	2,6	3,0	6,2*	4,5	2,7	2,5	2,7	3,8*	2,6	3,4
Necrose lamellar (focal)	3	3,0	3,0	3,1	3,0	3,1	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Proliferação e hipertrofia de células cloreto	1	2,3	3,4	3,0	3,2	3,0	4,0*	2,0	2,4	3,8	3,5	3,9	4,3*
Ruptura do epitélio lamellar	2	2,0	2,0	2,0	2,1	2,3*	2,2	2,0	2,0	2,2*	2,0	2,1	2,0

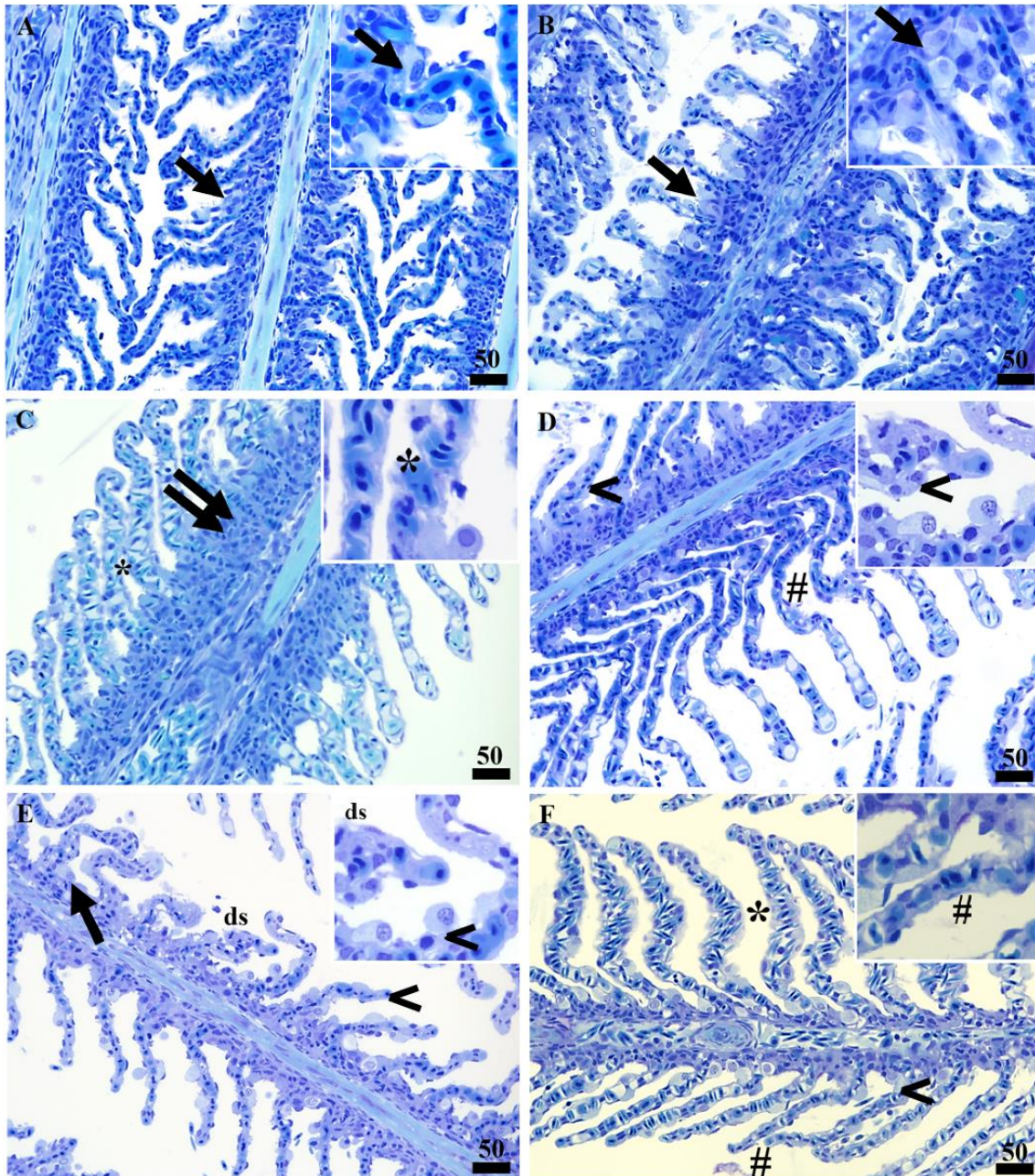


Figura 3. Brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao metalo-inseticida MgHP durante 24h. Quadro superior mostra detalhes das células. A. Grupo controle. B. Expostos a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. C. Expostos a $1 \mu\text{g L}^{-1}$. D. Expostos a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. E. Expostos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. F. Expostos a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Alterações: Proliferação das células de cloreto (seta), hiperplasia do epitélio do filamento (seta dupla), Constrição das células pilares (*), Hipertrofia do epitélio lamelar (#), hiperplasia do epitélio lamelar (<) e descolamento do epitélio lamelar (ds). Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala = $50 \mu\text{m}$.

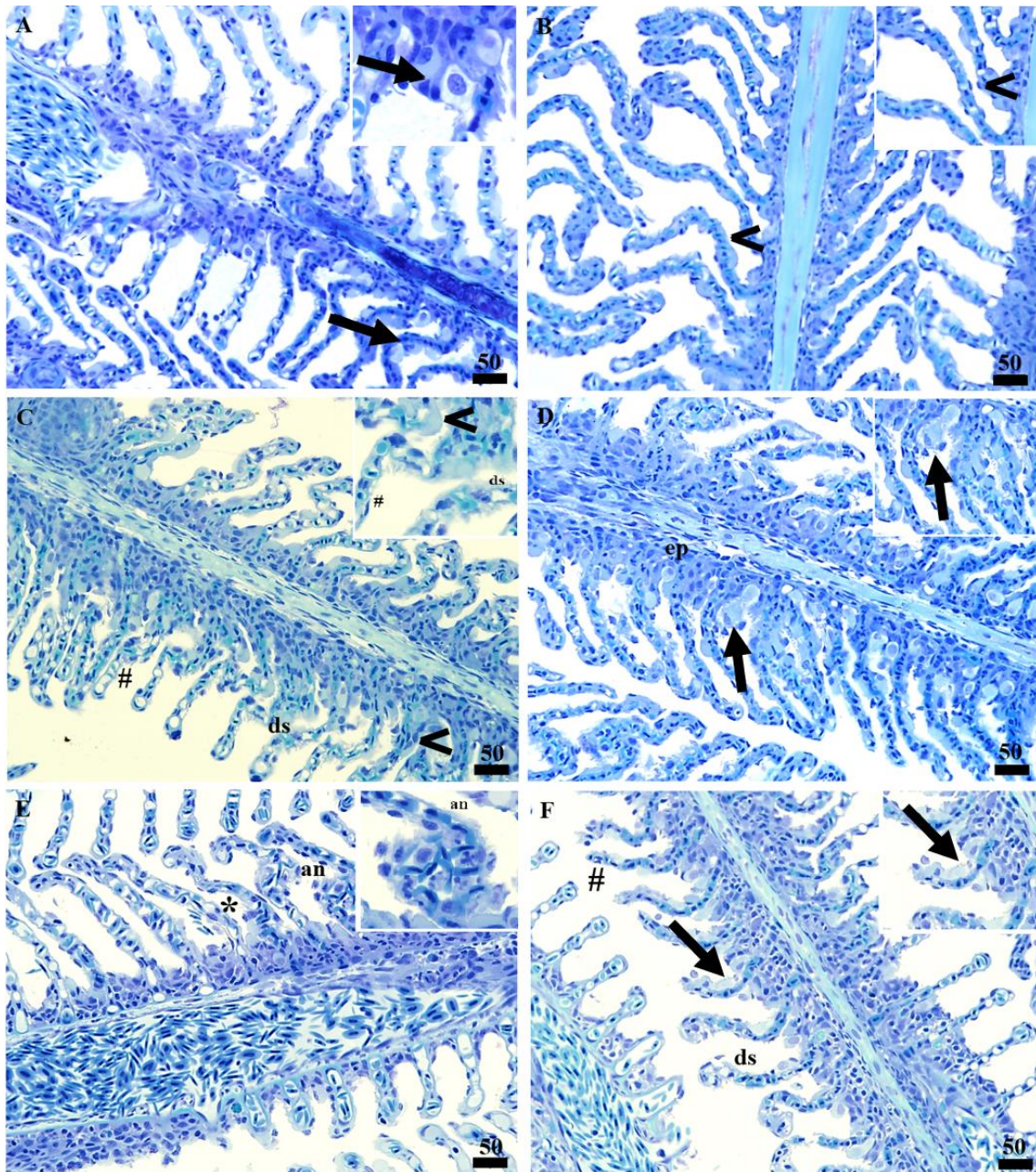


Figura 4. Brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao metalo-inseticida MgHP durante 96 h. Quadro superior mostra detalhes das células. A. Grupo controle. B. Expostos a $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. C. Expostos a $1 \mu\text{g L}^{-1}$. D. Expostos a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. E. Expostos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. F. Expostos a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Alterações: Proliferação das células de cloreto (seta), Constrição das células pilares (*), Hipertrofia do epitélio lamelar (#), hiperplasia do epitélio lamelar (<), Descolamento do epitélio lamelar (ds), Alterações no epitélio de filamento (ep) e Aneurisma (na). Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala = $50\mu\text{m}$.

BRÂNQUIAS

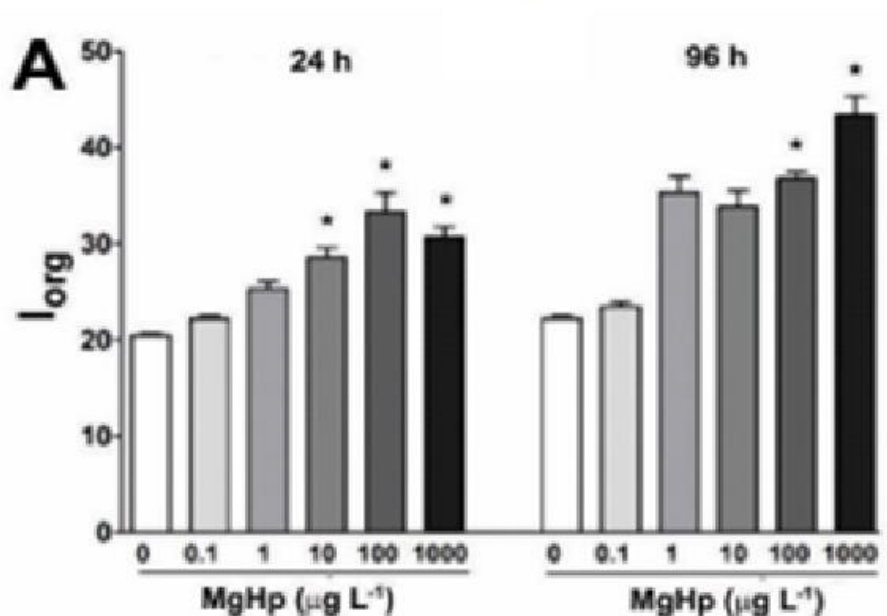


Figura 5. Índice de alterações totais nas brânquias (I_{org}) de *Prochilodus lineatus* do grupo controle ($0,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e grupos expostos a $0,1$, 1 , 10 , 100 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ do metalo-inseticida $[\text{Mg}(\text{hesp})_2(\text{phen})]$ denominado MgHP, durante 24 h e 96 h. * indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

4.2. IMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS DE CLORETO NAS BRÂNQUIAS

As CC no filamento e lamelas das brânquias dos grupos controle e expostos após 24 e 96 horas de exposição estão apresentadas nas Figuras 6 e 7. A Figura 8 mostra a densidade das CC nos filamentos e lamelas.

No grupo controle no período de 24 h foi constatado uma densidade de CC nos filamentos, maior do que a densidade em relação as concentrações de $0,1$ e $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP exposto ao mesmo período. O mesmo ocorreu no período de 24 horas para as demais concepções 10 , 100 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP, a densidade diminuiu (Figura 6).

Nas lamelas, as concentrações se mantiveram inalteradas nos grupos controle e expostos a 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP. Nas exposições a concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP houve uma tendência a um declínio, mas não foi significativamente diferente do controle (Figura 6).

Os grupos expostos ao complexo MgHP por 96 horas mostrou que as CC aumentaram no filamento m relação ao grupo controle que apresentou diferença significativa a partir da concentração 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP, demonstrando uma dose dependência. Os grupos 1 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP apresentam semelhança entre si e divergem dos grupos 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP (Figura 7). Nas lamelas, não houve diferença significativa na densidade de CC em nenhuma das concentrações (Figura 6).

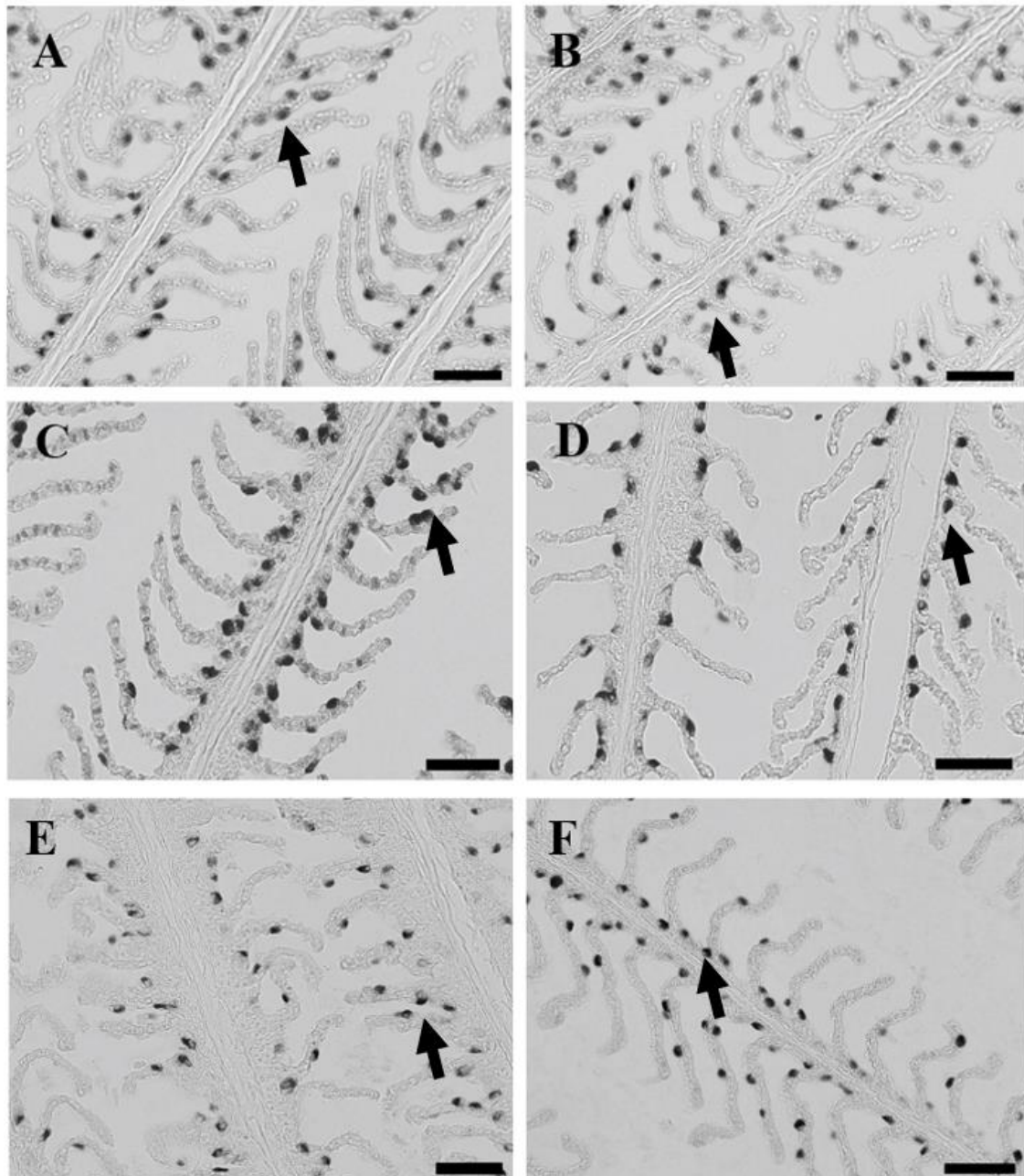


Figura 6. Imunohistoquímica da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas células de cloreto (coradas em preto) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* (n = 8 em cada grupo) do grupo controle (A) e grupos expostos a 0,1 (B), 1 (C), 10 (D), 100 (E) e 1000 (F) $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP por 24 h. F, filamento; L, lamela (seta). escala barras = 50 μm .

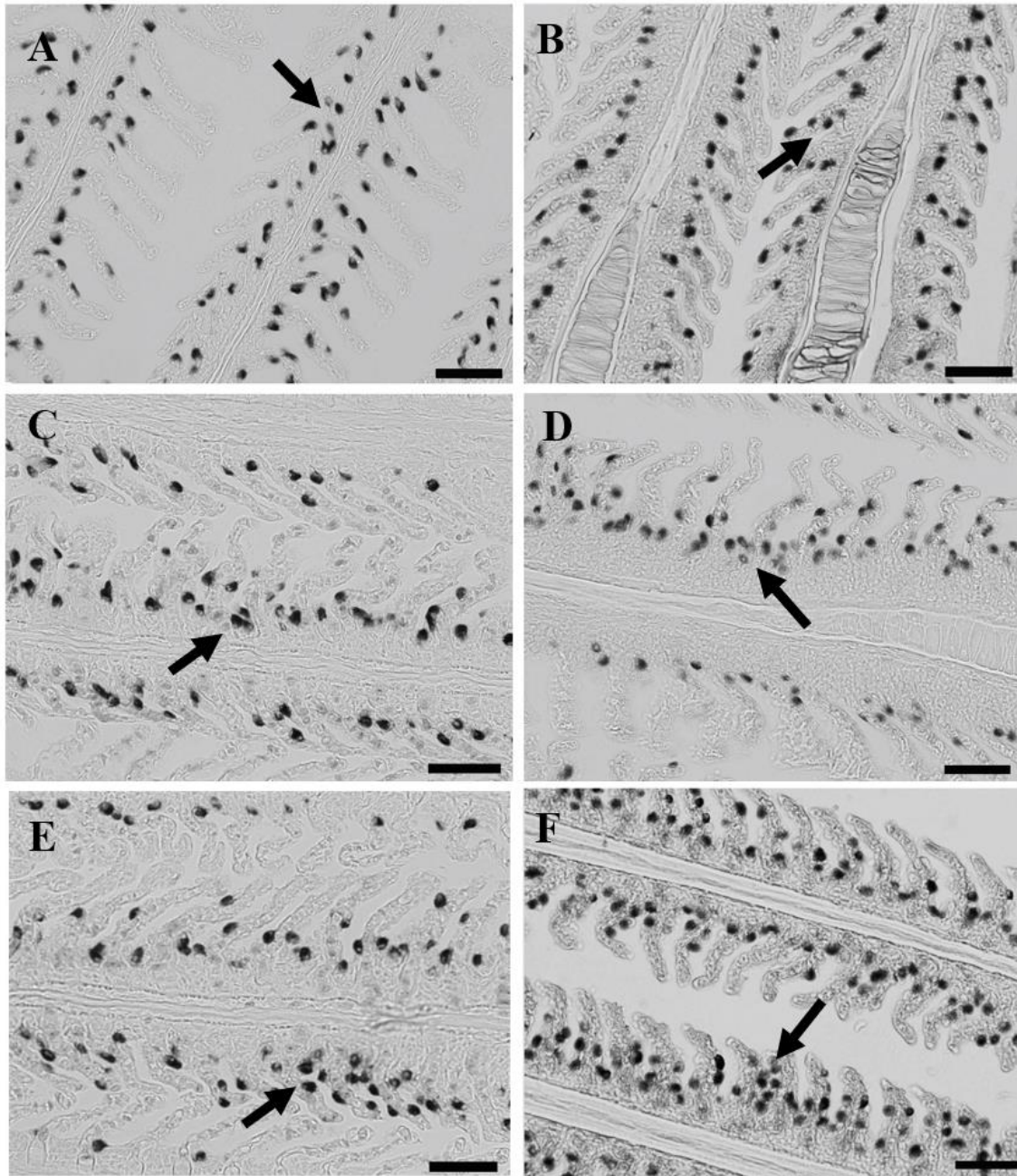


Figura 7. Imunohistoquímica da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas células de cloreto (coradas em preto) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* (n = 8 em cada grupo) do grupo controle (A) e grupos expostos a 0,1 (B), 1 (C), 10 (D), 100 (E) e 1000 (F) $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP por 96 h. F, filamento; L, lamela (seta). escala barras = 50 μm .

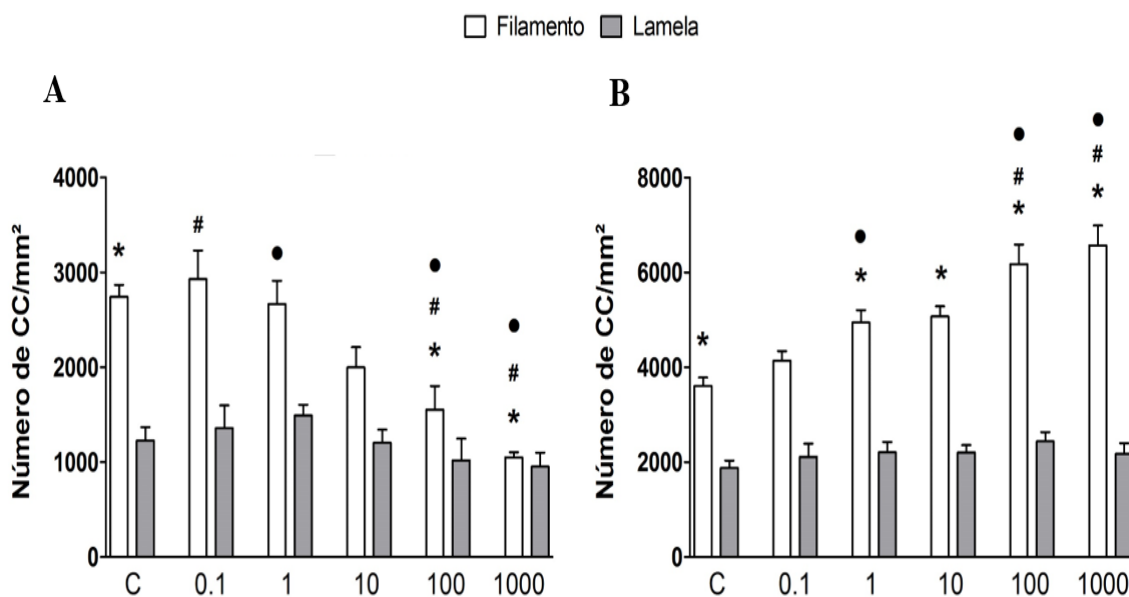


Figura 8. Densidade de células de cloreto (CC) nos filamentos e lamelas das brânquias de *Prochilodus lineatus* dos grupos controle (0,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e grupos expostos a 0,1, 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP, durante 24 h e 96 h. A. Alterações no grupo exposto a 24h. (*) indica diferenças significativas de CC em relação ao respectivo grupo controle, (#) indica diferenças significativas entre grupos 0,1; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, (•) indica diferenças significativas entre grupos 1, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. B. Alterações no grupo exposto a 96h. (*) indica diferenças significativas de CC em relação ao respectivo grupo controle, (#) indica diferenças significativas entre grupos 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, (•) indica diferenças significativas entre grupos 1, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, ($p < 0,05$).

4.3. HISTOPATOLOGIAS NO FÍGADO

O fígado dos animais controle (24 e 96 h) apresentou parênquima homogêneo, hepatócitos poligonais, núcleo esférico com nucléolo central. Os hepatócitos foram organizados em cordas acompanhadas por vasos sinusóides finos. Em algumas regiões, os hepatócitos tinham acumulação de grânulos intracelulares (Tabela 2, Fig. 9A, 10A). Após exposição ao inseticida metálico MgHP, algumas histopatologias foram significativas em animais expostos no período de 24h, nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP, como alterações hepáticas, alterações nucleares, degeneração citoplasmática, hipertrofia e hiperemia de hepatócitos e acúmulo de hepatócitos (Fig. 9E-F, 10E-F). O foco de necrose ocorreu apenas no fígado de animais expostos a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP, no período de 96 h (Fig. 9D). Grânulos intracelulares amarelo-avermelhados no citoplasma presentes nos animais dos grupos expostos nos períodos de 24 e 96 h, nas

concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP, ambos foram considerados sinais de estagnação biliar (Fig. 9E, F e 10E, F). I_{org} apresentou alterações significativas nos animais expostos a 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP após 24 h e em animais expostos a 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP após 96 h (Tabela 2. Fig. 11).

Tabela 2. Índice de alteração dos fígados de *Prochilodus lineatus* dos grupos controle (0,0 µg L⁻¹) e grupos expostos a 0,1, 1, 10, 100 e 1000 µg L⁻¹ de inseticida de metal [Mg(hesp)₂(phen)] denominado MgHP durante 24 e 96 h. (*) indica diferenças significativas do respectivo grupo de controle. Fi = Fator de importância p <0,05).

Índice da Alteração (I _{alt}) de Fígados de <i>Prochilodus lineatus</i>													
Alterações	Fi	24 h						96 h					
		MgHP (µg L ⁻¹)						MgHP (µg L ⁻¹)					
		0	0.1	1.0	10	100	1000	0	0.1	1	10	100	1000
Substâncias citoplasmáticas intracelulares	1	1,3	1,1	2,7	2,6	3,0*	3,0*	1,4	2,0	2,4	3,0	3,4*	3,9*
Alterações na arquitetura hepática e na estrutura celular	1	1,1	1,6	2,4	2,6	3,0*	3,0*	1,2	1,5	2,4	3,1	3,3*	3,9*
Alterações nucleares	2	2,0	2,2	5,0	5,2	5,9*	6,1*	2,0	4,8	5,0	6,1	6,8*	8,2*
Aneurisma	1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,6*	1,3	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,6*
Atrofia	2	2,0	2,1	2,4	2,4	2,0	2,6*	2,0	3,2	3,2	3,2	3,6*	3,2
Centro de Melanomacrófagos	1	1,1	1,5	1,4	1,6	1,2	1,9*	1,2	1,4	1,4	2,1	1,7	2,0*
Degeneração citoplasmática	1	1,1	1,6	2,5	2,5	3,0*	2,9	1,3	1,6	2,4	3,0	3,1*	3,3*
Hemorragia	1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,6*	1,6*	1,3	1,2	1,0	1,0	1,4	1,9*
Hipertrofia	1	1,1	1,6	2,3	2,5	3,0*	3,1*	1,2	1,6	2,4	3,0	3,1*	3,3*
Hipermeria	1	1,1	1,2	2,0	1,5	1,8	2,4*	1,3	1,6	2,0	1,7	2,3*	2,3*
Necrose	3	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0

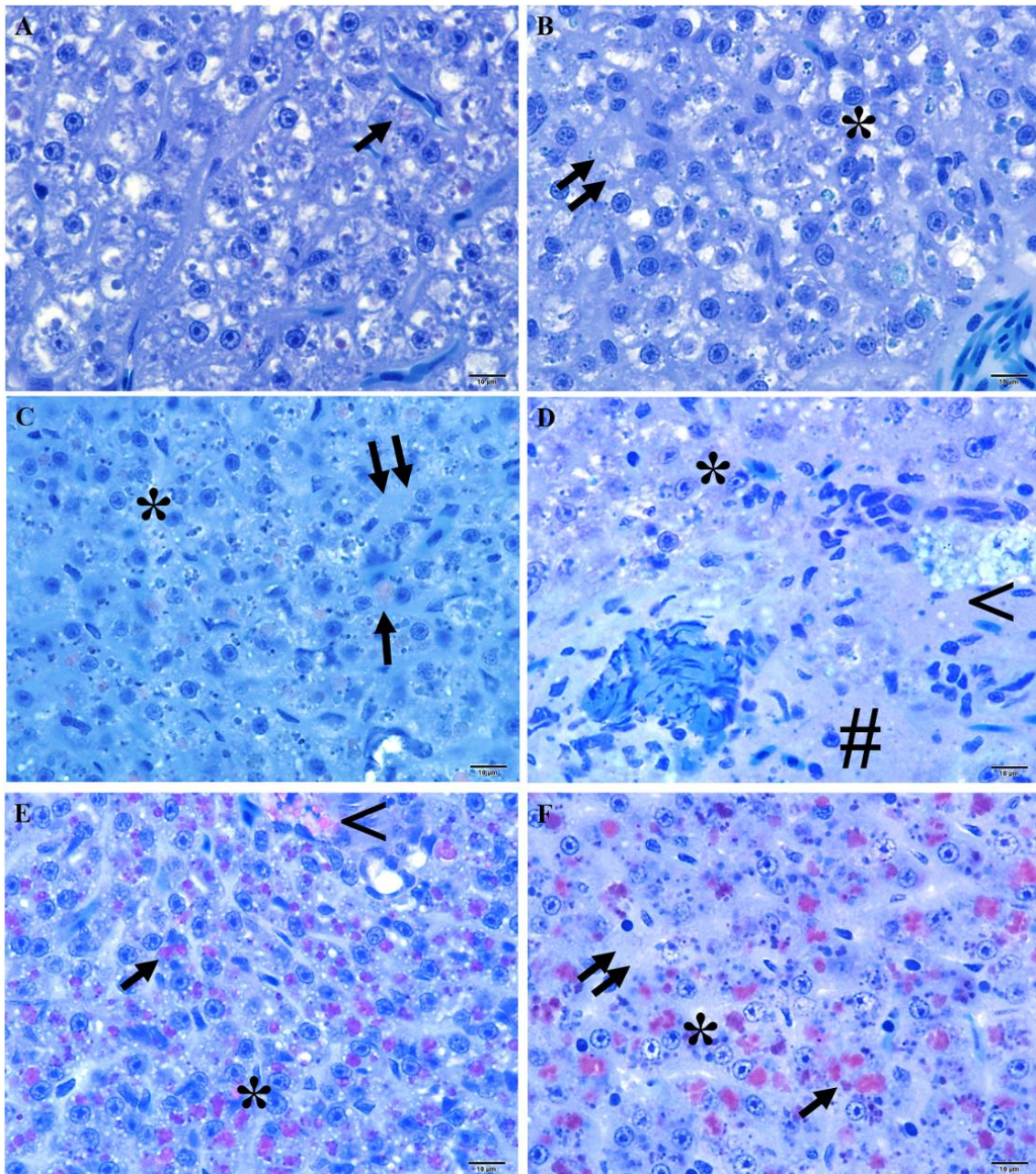


Figure 9. Fígados de *Prochilodus lineatus* exposto ao metalo-inseticida MgHP por 24 h. A. Grupo controle. B. Expostos a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. C. Expostos a $1 \mu\text{g L}^{-1}$. D. Expostos a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. E. Expostos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. F. Expostos a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Alterações: substâncias intracelulares (seta), degeneração citoplasmática (seta dupla), alterações nucleares (*), necrose focal (#), centro de melanomacrófagos (<). Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

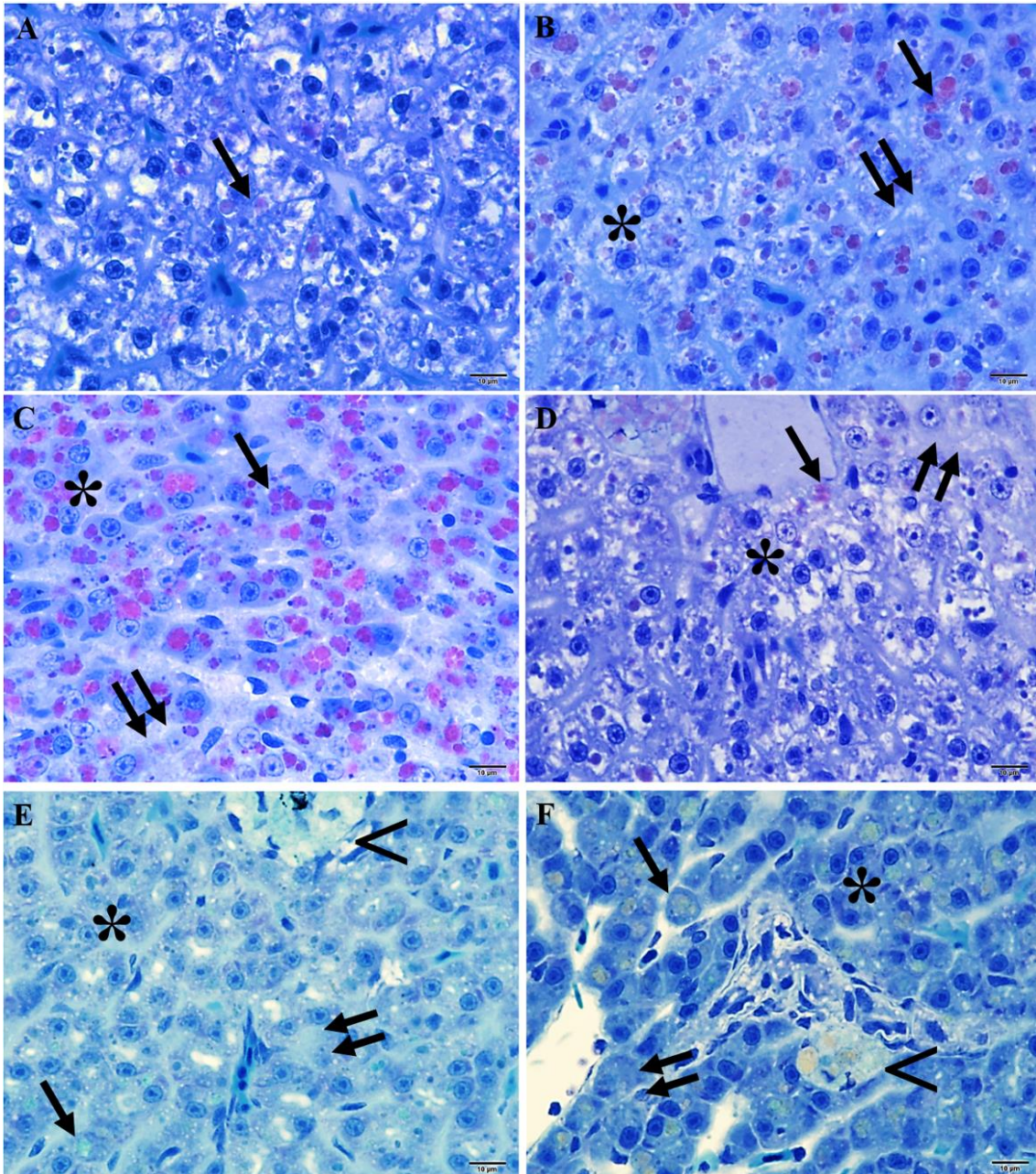


Figure 10. Fígados de *Prochilodus lineatus* exposto ao metalo-inseticida MgHP por 96 h. A. Grupo controle. B. Expostos a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. C. Expostos a $1 \mu\text{g L}^{-1}$. D. Expostos a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. E. Expostos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. F. Expostos a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Alterações: substâncias intracelulares (seta), degeneração citoplasmática (seta dupla), alterações nucleares (*), centro de melanomacrófagos (<). Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

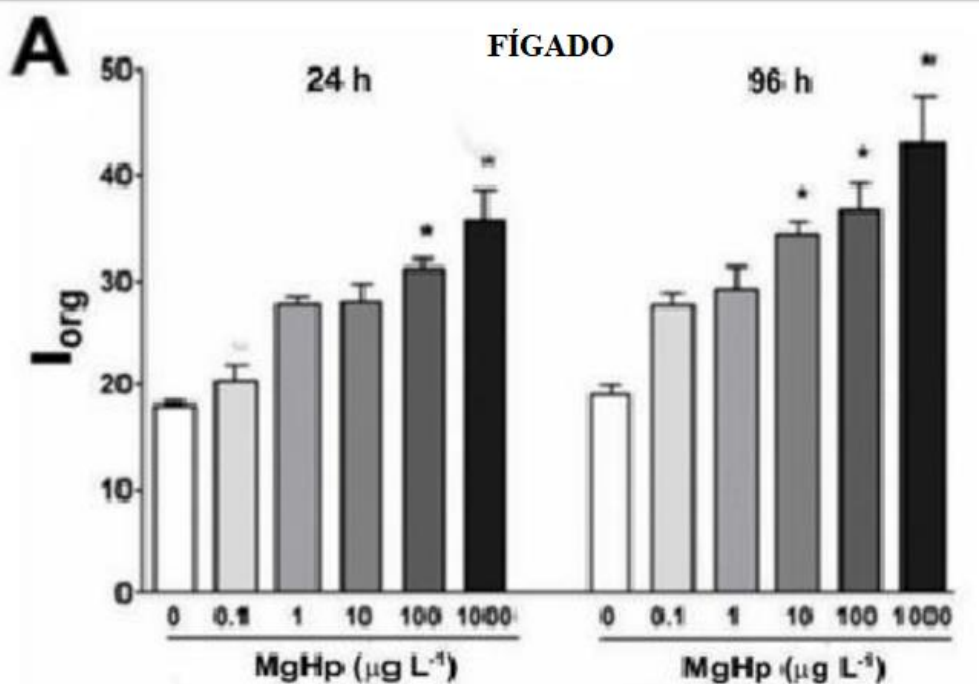


Figura 11. Índice de alteração total dos fígados (I_{org}) de *Prochilodus lineatus* do grupo controle ($0,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e grupos expostos a 0,1, 1, 10, 100 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ do metalo-inseticida $[\text{Mg}(\text{hesp})_2(\text{phen})]$ denominado MgHP. durante 24 h e 96 h. (*) indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Devido ao fato de que hoje, no Brasil, o consumo de insumos agrícolas é muito grande, há uma necessidade de modificá-los buscando técnicas que causem menor impacto por meio de ações antropogênicas, ao invés da utilização de técnicas que sejam extremamente tóxicas ao ambiente. Tendo em vista essa demanda, atualmente há o desencadeamento de ações que demonstram uma ampliação em estudos sobre o tema.

O complexo MgHP vem com essa visão, substituir insumos com consequências ambientais severas. O aporte de agrotóxicos e fertilizantes ricos em compostos fosfatados e nitrogenados (ASARE et al., 2000; BAPTISTA et al., 2003), são produtos químicos sintéticos estranhos ao ambiente, de difícil assimilação e que interferem negativamente na estrutura e funcionamento do meio (FRACÁCIO et al., 2001).

As formigas cortadeiras causam prejuízos elevados aos setores florestal e agrícola uma vez que utilizam fragmentos de vegetais para manterem a cultura de seu fungo simbiótico, do qual se alimentam (MASCHWITZ et al. 1970). A perda de parte de suas folhas, em algumas plantas, afeta diretamente a sua taxa fotossintética, por tratar-se do local onde há maior concentração de clorofila, o que restringe a capacidade de captação da luz solar e pode reduzir sua produção de matéria orgânica, influenciando a taxa de crescimento da cultura e, por consequência, sua produtividade.

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que as concentrações de MgHP até 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ não foram letais para *P. lineatus*, mas resultaram em alterações histopatológicas nas brânquias e fígado após exposição à concentrações iguais ou superiores a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Diversos estudos relataram histopatologias em brânquias e fígado de peixes após exposição subletal aguda e subcrônica a xenobióticos como, por exemplo, as realizadas à atrazina que induziram alterações genotóxicas, bioquímicas e histopatológicas nas brânquias e fígado de *P. lineatus* (PAULINO et al., 2012a, b, SANTOS e MARTINEZ, 2012; VENTURA et al., 2008).

Lesões do epitélio branquial são esperadas na presença de contaminantes do meio aquático devido ao contato direto com o mesmo (MCDONALD E WOOD, 1993). As lesões observadas nas brânquias de *P. lineatus*, como hiperplasia do epitélio filamentar e lamelar, podem ser consideradas respostas de defesa, pois aumentam a distância de difusão água-sangue contribuindo para diminuir a absorção do contaminante e, conseqüentemente, a transferência para a corrente sanguínea e distribuição para todos os órgãos (PAULINO et al., 2012a, b; BENZE et al., 2016).

A hiperplasia, que é o aumento do número de células devido ao aumento da atividade mitótica das células indiferenciadas na base do filamento e/ou lamela, pode resultar em fusão parcial ou total das lamelas, também observada no estudo.

Nas brânquias, a ação de xenobióticos do ambiente causou as alterações descritas, que afetam a absorção do oxigênio necessário para o metabolismo. Várias alterações estão relacionadas a mecanismos de proteção contra um agente irritante, sendo isto uma resposta que dificulta o contato desse agente estressor, impedindo que ele atinja a corrente sanguínea, como é relatado para outros xenobióticos (CERQUEIRA E FERNANDES 2002; FERNANDES et al. 2007).

Em geral, a hiperplasia é reversível quando o agente estressor (contaminante) é removido do meio. A reversibilidade da hiperplasia foi demonstrada em *Prochilodus scrofa* expostos ao cobre (CERQUEIRA E FERNANDES 2002). Carpas (*Carassius carassius*) expostas à agentes químicos e físicos, como mudanças na temperatura e concentração de oxigênio no ambiente aquático, indicam que pode haver remodelação das brânquias em resposta à temperatura, pela alteração da área da superfície respiratória com uma resposta na melhoria na funcionalidade do órgão.

Dessa forma, a hipóxia e a alta temperatura induzem mudanças aparentemente idênticas, ou seja, fazendo com que as lamelas branquiais se projetem, sugerindo assim que o gatilho estressor é a demanda de oxigênio dos peixes (SOLLID et al., 2003, 2005).

Alterações nas células pilares e congestão/hiperemia/aneurisma nas lamelas implicam em distúrbios circulatórios que também podem afetar as trocas gasosas, bem como o descolamento do epitélio lamelar, que é uma indicação de edema intercelular (BENZE et al. 2016). Neste estudo, embora essas mudanças tenham ocorrido, aneurismas foram muito pouco frequentes e, possivelmente, não afetaram o processo respiratório.

Alguns outros metais e agroquímicos causam graves distúrbios circulatórios com a presença de aneurismas e hemorragias (MAZON et al. 2000, 2002; JIRAUNGKOORSKUL et al. 2002).

Em relação às células de cloreto, sua presença nas lamelas de peixes da ictiofauna brasileira é comum, pois a maioria das águas continentais do Brasil é pobre em íons (CAMARGO et al., 2009). No entanto, a hipertrofia e a proliferação dessas células em *P. lineatus* expostas ao inseticida estudado, sugerem que a MgHP provocou alterações na regulação do íon quando em alta concentração no meio aquático (100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$).

A redução na densidade das CC no filamento após exposição de 24 horas ao MgHP sugere possível ação direta do MgHP nessas células. Redução nas CC afeta a atividade enzimática das ATPases, como Na^+/K^+ -ATPase (NKA), H^+ /ATPase (HA) e Ca^{2+} -ATPase, resultando em desequilíbrio iônico.

Os poluentes podem alterar o balanço iônico, uma vez que atingem órgãos diretamente envolvidos na osmorregulação, metabolismo ou processos ativos de transporte (BALDISSEROTTO et al., 2012). Após o período de 96 horas de exposição ao MgHP, foi possível identificar uma resposta inversa ao grupo exposto por 24 horas; ocorreu o aumento no número de CC no filamento, embora não nas lamelas, a diferença do grupo controle em relação aos demais grupos, demonstrou uma resposta dose-dependente. A proliferação de células de cloreto indica uma resposta compensatória para aumentar a absorção de íons e manter a homeostase iônica e osmótica quando alterada pelo xenobióticos (FERNANDES e MAZON, 2003).

Hipertrofia e proliferação celular são processos que indicam aumento da atividade celular (BERNET et al. 1999). Os distúrbios iônicos são causados por alterações no tecido branquial que podem aumentar a perda de íons em peixes de água doce ou pela inibição

das enzimas associadas à absorção ativa de íons iônicos e/ou mudanças nos co-transportadores e contra-transportadores iônicos (HWANG et al. 2011; DYMOWSKA et al. 2012; INOKUCHI et al., 2017).

Além disso, o estresse fisiológico causado pela exposição ao metalo-inseticida MhHP pode induzir a liberação de cortisol que estimula a proliferação de células de cloreto e o aumento das unidades de expressão de Na^+/K^+ - ATPase (DANG et al. 2000). O cortisol também regula a homeostase do Na^+ , estimulando a transcrição de transportadores de Na^+/Cl^- (LIN et al. 2006).

Dessa forma o organismo pode desenvolver um prejuízo energético, fazendo com que a energia seja alocada para as funções basais, como o desenvolvimento das gônadas reprodutivas, que resulta em um possível atraso no período reprodutivo da espécie, já que há um desvio de energia para as alterações no organismo em função de modificações que ele realiza para se estabilizar fisiologicamente devido ao estresse em consequência do xenobiótico.

As alterações histopatológicas presentes no fígado, o principal órgão de desintoxicação, indicam que o metalo-inseticida absorvido pelas brânquias foi transferido para a corrente sanguínea, e foi distribuído por todo o corpo, sendo absorvido pelos hepatócitos. Da mesma forma que nas brânquias, as concentrações 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP foram as que resultaram em alterações significativas no I_{alt} e I_{org} .

A organização dos hepatócitos em cordões não foi alterada no fígado de *P. lineatus* expostos a MgHP, entretanto, a estrutura celular mostrou alterações no núcleo e vacuolização citoplasmática que tem como consequência a inibição de síntese proteica, depleção energética e desagregação de microtúbulo (HINTON e LAUREN 1990).

Alterações nos cordões de hepatócitos e na estrutura celular ocorrem no fígado de animais expostos a hepatocianotoxinas produzidas por cianobactérias do gênero *Microcystis*, e outros que produzem hepatotoxinas resultando em disfunção celular (PAULINO et al., 2017a, b; TAVARES et al., 2018).

As alterações no núcleo dos hepatócitos foram marcantes em ambos os períodos de exposição, o que pode afetar a função celular devido ao fato do material genético se encontrar no núcleo e dele depender todas as funções da mesma. As lesões nos hepatócitos podem resultar em disfunção do órgão como um todo, resultando em graves consequências para o metabolismo. A concentração de xenobióticos no fígado, a excreção desses agentes ou de seus metabólitos através da bile ou ainda a conversão dessas substâncias nos hepatócitos, contribuem para a vulnerabilidade do fígado a injúrias químicas (HEATH, 1987; HINTON et al., 1992).

O acúmulo intracelular de substâncias em indivíduos expostos a 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MgHP durante 24 e 96 horas sugerem um processo degenerativo que está associado a alterações na eliminação da bÍlis, de uma forma que ela se acumule nos hepatócitos e não seja eliminada, por possível obstrução dos canalículos biliares como relatado com a *Anguilla anguilla* (PACHECO e SANTOS 2002) e em *P. lineatus*, em estudos *in situ* durante sete dias em um córrego urbano (CAMARGO e MARTINEZ, 2007), apesar de que a possível eliminação do complexo MgHP seja por via urinária. Tais alterações foram relatadas em fígado de peixes expostos a outros agroquímicos como o diflubenzuron (MADUENHO E MARTINEZ, 2008; BENZE et al., 2016).

A hipertrofia celular indica aumento de atividade celular o que pode levar a uma perda da função metabólica, já que pode resultar na degradação de proteínas, e a degeneração citoplasmática é evidenciada pela presença de vacúolos. Fato esse que reflete o estado funcional do fígado e é notavelmente diferente em estados hiper ou

hipofuncionais. A hipertrofia celular indica a grande atividade da célula em decorrência da presença de algum composto químico ou ausência de alguma substância (MEYER & HENDRICKS, 1985; HINTON et al., 1992; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995) e pode resultar em necrose (FANTA ET AL., 2003; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

Os agregados de melanomacrófagos desempenham um papel importante no sequestro dos produtos de degradação celular e em materiais teciduais potencialmente tóxicos, como radicais livres e produtos de degradação catabólicos (AGIUS e ROBERTS, 2003).

Centros de melanomacrófagos são observados em concentrações mais elevadas (100 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$), tanto por 24 horas como por 96 horas, com maior ocorrência em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ após 96 horas de exposição ao MgHP, fato este que pode indicar um processo de adaptação que leva ao aumento do fluxo sanguíneo no tecido hepático, facilitando o transporte de macrófagos para as regiões danificadas deste tecido e também melhorando a oxigenação destas áreas. Assim a presença dos melanomacrófagos pode ser considerada indicadora de estresse em peixes decorrente da presença de agentes químicos (ANDERSON & ZEEMAN, 1995).

Resultado semelhante foi observado no fígado de *A. fasciatus* e *P. maculatus* coletados no reservatório da represa da Hidroelétrica de Furnas. A hiperemia hepática foi relacionada aos processos metabólicos de desintoxicação, assim como os melanomacrófagos, que ocorrem nesses peixes, descritos no estudo realizado por Paulino et al. (2014).

Os danos causados às espécies não alvo no ambiente podem ser severos, mesmo que a maioria dos danos identificados nos organismos exposto não tenham um Fi 3 (considerado irreversível). Os resultados demonstram que, quando utilizadas em doses

superiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, é possível observar ocorrências de necrose celular no fígado, demonstrando uma perda de integridade e a degradação do órgão, sendo a necrose uma consequência grave do contato com o complexo MgHP, evidenciando processos de intoxicação, sendo a extensão e gravidade da lesão proporcional ao tipo, duração, severidade da agressão e estado fisiológico da célula envolvida (ROBBINS; COTRAN, 2005).

No Brasil, vários estudos sobre a ação do xenobióticos no meio ambiente vem sendo realizados, demonstrando que o uso excessivo de insumos na produção agrícola e agropecuária pode causar danos irreversíveis ao meio ambiente, atingindo espécies não alvo, podendo gerar bioacumulação e, conseqüentemente atingir a população humana.

Em uma visão mais ampla e ecológica acerca desses impactos, não podemos prever com exatidão os danos que podem ser ocasionados aos seres humanos, mas visualizar a capacidade do seu impacto, relacionando as conseqüências dos fatos observáveis no estudo de espécies *in vita* nos laboratórios e evitando ao máximo o uso desmedido desses mesmos compostos químicos.

6. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos a partir da análise morfológica das brânquias e fígado de *P. lineatus* expostos por 24 e 96 horas ao metalo-inseticida MgHP, apesar de não ocorrer mortalidade dos peixes durante o experimento, foi verificado que a substância é capaz de causar danos a esses órgãos.

As lesões foram mais frequentes nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, resultando em maior I_{org} nos dois órgãos. O uso em altas concentrações irá afetar os organismos não alvos, interferindo no ecossistema, prejudicando-os.

7. REFERÊNCIAS

AGIUS C.; ROBERTS R. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology, *Journal of Fish Diseases*, Vol. 26, p. 499-509, 2003. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>

ANDERSON, D.P.; ZEEMAN, M.G. Immunotoxicology in Fish. In: RAND, G. M. (Editor). *Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects: environmental fate and risk assessment*. Taylor & Francis, Issue 2, p. 345-369, 1995.

ASARE, D.K.; SAMMIS T.; SMEAL D.; et al., Impact of irrigation scheduling practices on pesticides leaching at a regional level. *Agricultural Water Management*, Vol. 43, p. 311-325, 2000.

BALDISSEROTTO, B.L.O.; GARCIA A.P.; BENADUCE, R.N.; et al. Sodium fluxes in tamoatá, *Hoplosternum littoralle*, exposed to formation water from Urucu Reserve (Amazon, Brazil). Vol. 62, Issue 1, p. 78–84, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9673-z>

BAPTISTA, D.F.; BUSS, D.F.; EGLER, M. Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F. (Org). *É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Fiocruz, Insue 8, p.157-175, 2003.

BENZE, T.P.; SAKURAGUI, M.M.; DE PAULA ZAGO L.H.; et al. Subchronic exposure to diflubenzuron causes health disorders in neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*, *Environmental Toxicology*, Vol. 31, p. 533-542, 2016. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/tox.22065>

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Disease*, Vol. 22, Issue 1, p. 25-34, 1999. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x> e4

BINDON, S.D.; GILMOUR, K.M.; FENWICK, J.C.; et al. The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 197, p. 47–63, 1994. <https://jeb.biologists.org/content/jexbio/197/1/47.full.pdf>

BONOMO, M.M. Estudo in vitro e in vivo da toxicidade de substâncias naturais complexas com metais potencialmente eficazes como inseticidas no controle de formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*), Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Carlos, 2018.

BONOMO, M.M.; FERNANDES, J.B.; CARLOS, R.M.; et al. Mitochondrial and lysosomal dysfunction induced by the novel metal-insecticide [Mg(hesp)2(phen)] in the zebrafish (*Danio rerio*) hepatocyte cell line (ZF-L). *Chemical-Biological Interactions*, Vol. 307, p.147-153, 2019.

BRASIL, RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005, RESOLUÇÃO CONAMA, publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, p. 58-63, 2005. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> Acessado Em 12//04/2019

CAMARGO, M.M.P.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, Vol. 94, p. 40–4694, 2009. <http://www.uel.br/laboratorios/lefa/CAMARGO%20et%20al,%202009.pdf> 34

CAMARGO, M.M.P; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 21, p. 61–69, 2006.

CARVALHO, C.S.; FERNANDES, M.N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, Vol. 251, Issue 1, p. 109-117, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.018>

CARMO, T.L.L. Efeito da exposição a nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) em curimatá (*Prochilodus lineatus*, Teleostei): aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos. Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, 2015.
<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/7213/TeseTLLC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicologia Environmental Safety*. Vol. 52 (2), p. 83-91, 2002. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2164>

CHEN, Z.; WANG. Y. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. *Journal of Chromatography A.*, Vol. 754, Issues 1–2, p. 367-395, 1996.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00490-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00490-6)

CLAIBORNE, J.B.; EDWARDS, S.L.; MORRISON-SHETLAR, A.I. Acid–Base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 293, p. 302-319, 2002. <https://doi.org/10.1002/jez.10125>

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GARBELLINI, G.S.; et al. Pesticides: Mechanism of action, degradation and toxicity. *Pesticides, Journal of Ecotoxicology and Environment*, Curitiba, Vol. 15, p. 65-72, 2005.

<https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/4469/3518>

DANG, Z.; LOCK, R.A.C.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S.E. Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *Journal of Experimental Biology*. Vol. 203, p. 379-387. 35, 2000.

DECIO, P.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; BUENO, F.C.; et al. Toxicological and histopathological effects of hydramethylnon on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers, *Micron*, Vol. 45, p. 22-31, 2013.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432812002417>

DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. *The Toxicology of Fishes*, CRC Press, New York, Edition 1, 2008.

DYMOWSKA, A.K.; HWANG, P.P.; GOSS, G.G. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. *Respir Physiol Neurobiol*. Vol. 184 (3), p. 282-92, 2012. doi:10.1016/j.resp.2012.08.025.Epub2012Set

FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; et al. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 54, p. 119 –130, 2003.

FERNANDES, C.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; MONTEIRO, S.M.; et al. Changes in plasma electrolytes and gill histopathology in wild *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 79, p. 301–305, 2007. DOI:10.1007/s00128-007-9242-3

FERNANDES, M.N.; MAZON, F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: VAL, A.L. and KAPOOR, B.G., Ed. Fish adaptations. Enfield: Science Publishers, p. 203-23, 2003.

FRACÁCIO, R. Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) e análises limnológicas para avaliação ambiental dos reservatórios do médio e baixo Tietê (SP). Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 233, 2001.

GALINDO, B.A.; TROILO, G.; CÓLUS, I.M.S.; et al. Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Water, Air, & Soil Pollution, Vol. 212, Edição 1– 4, p. 419–428, 2010.

GRISOLIA, C.K. Agrotóxicos: mutações, câncer & reprodução. Brasília: Editora UNB, 2005.

HEATH, A. G. Water Pollution and Fish Physiology. C.R.C. Press, 1987.

HEATH, A.G. Water Pollution and Fish Physiology. C.R.C. Edition 2, 1995.
https://doi.org/10.1201/9780203718896_36

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; et al. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE Jr, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, Vol. 4, p. 155 –196, 1992.

HINTON, D.E.; LAUREN, D.J. Integrative histopathological approaches to detect effects of environmental stressors on fish. In: SM ADAMS (Ed) Biological Indicators of Fish Stress. Bethesda, Maryland: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE DA PESCA AMERICANA, p.51-66. 1990.

HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; et al. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 136, p. 593-620, 2003. <https://www.sciencedirect.com/journal/comparative-biochemistry-and-physiology-part-b-biochemistry-and-molecular-biology/vol/136/issue/4>

HUGGETT, R.J.; KIMERIE, P.M.; BERGMAN, H.L. Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 347, 1992. <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:002303581>

HWANG P.P.; TSUNG-HAN L.; LI-YIH L. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, Vol. 301, p. 28-47, 2011. doi: 10.1152 / ajpregu.00047.2011.

INOKUCHI, M.; NAKAMURA, M.; MIYANISHI, H.; et al. Functional classification of gill ionocytes and spatiotemporal changes in their distribution after transfer from seawater to fresh water in *Japanese seabass*. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 220, p. 4720-4732, 2017. Doi:10.1242/jeb.167320 <https://jeb.biologists.org/content/220/24/4720>

JESUS, T.B. Utilização de Biomarcadores para Avaliação das Alterações Químicas, Bioquímica, Hematológicas e Histológicas em traíra, *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), após Exposição Aguda ao Metilmercúrio e ao Cloreto de mercúrio. Tese de doutorado no Programa de em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009. <http://uenf.br/posgraduacao/ecologia-recursosnaturais/wp-content/uploads/sites/7/2013/11/Taise-Bomfim.pdf>

JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis*, Vol. 12, p. 680-693, 2008. DOI:10.4257/oeco.2008.1204.07

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M.; et al. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*, Vol. 28, p. 121-127, 2002. http://www.scienceasia.org/2002.28.n2/v28_121_127.pdf

LEONZIO, C.; FOSSI, M.C. Nondestructive biomarkers strategy: perspectives and applications. Pp. 297-312. In: M.C. Fossi and C. Leonzio. (eds.). *Nondestructive biomarkers in vertebrates*, Lewis Publ., London, p. 368, 1993.

LIN, L.Y.; HORNG, J.L.; KUNKEL, J.G.; et al. Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae, *American Journal of Physiology Cell Physiology*, Vol. 290 (2), p. 371-8, 2005. DOI: 10.1152/ajpcell.00281.2005

MADUENHO, L.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, Vol. 148, Issue 3, p. 265-272, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.010>

MAYER-GOSTAN, N.; WENDELAAR BONGA, S.E.; BALM, P.H.M. Mechanisms of hormone actions on gill transport. *Vertebrate Endocrinology Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press, Chicago – USA, Vol. 2, p. 221-238, 1987.

MAZON, A.F.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial a biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *Prochilodus scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae). In:

ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.E.R.M.; ROCHA, O.; et al. (Eds).
Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI. São Carlos: RIMA, p. 327-340, 2000.

MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the south American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*, Environmental Research Section A, Vol. 88, p. 52-63, 2002.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001393510194315438>

MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin, J.C.; Jensen, F. B. (Eds), Fish Ecophysiology. Chapman & Hall Fish and Fisheries Series, Springer, Dordrecht, Vol. 9, p. 297-321. 1993.
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-2304-4_12

MEYERS, T. R.; HENDRICKS, J.D. Histopatologia. IN: RAND, G. M.; PETROCELLI, S.R. (Editores). Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. Hemisphere Publishing Corporation, Washington: p. 283-331, 1985.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere. Vol. 78, p. 294-299, 2010. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.047

NASUTI, C.; CANTALAMESSA F.; FALCIONI G.; et al. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. Toxicology, Vol.191, p. 233-244, 2003.

NOGUEIRA, D.J.; CASTRO, S.C.; VIEIRA, R.C.A.; et al. Utilização das brânquias de *Pimelodus maculatus* (Lacèpède, 1803) (Siluriformes; Pimelodidae) como biomarcador de poluição no reservatório da UHE Marechal Mascarenhas de Moraes, Minas Gerais, Brasil. Revista Biotemas, Vol. 24, p. 51-58, 2011. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2011v24n3p51>

ODUM, E. P.; BARRET, G. W. Fundamentos de Ecologia. São Paulo: Cengage, Learning, 2011.

OLIVEIRA, R.M.M.; DE SOUZA DANIEL, J.F.; AGUIAR, I.; et al. Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes, Journal of Inorganic Biochemistry, Vol. 129, p. 35-42, 2013
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.08.005>

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel, *Anguilla anguilla* L. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 53, p. 331-347. 2002.
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.579.8023&rep=rep1&type=pdf> 39

PAULINO, M.G.; BENZE, T.P.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; et al. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. Science of the Total Environment, Vol. 497–498, p. 293–306, 2016. <https://www.sciencedirect.com/journal/science-of-the-total-environment/vol/497-498>

PAULINO, M.G.; ROSSI, P.A.; VENTURINI, F.P.; et al. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). Chemosphere, Vol. 175, p. 431-439, 2017, (b). <https://europepmc.org/abstract/med/28242458>

PAULINO, M.G.; SAKURAGUI, M.M.; FERNANDES, M.N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*, Chemosphere, Vol. 86 (1), p. 1-7, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.033>

PAULINO, M.G.; SOUZA, N.E.S; FERNANDES, M.N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 80, p. 6–13, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.001>

PAULINO, M.G.; TAVARES, D.; BIECZYNSKI, F.; et al. Crude extract of cyanobacteria (*Radiocystis fernandoi*, strain R28) induces liver impairment in fish. *Aquatic Toxicology*, Vol. 182. p. 91-101, 2017, (a). <https://bv.fapesp.br/pt/publicacao/129229/crude-extract-of-cyanobacteria-radiocystis-fernandoi-strai/>

PEREIRA L.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R.; Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 36, Issue 1, p. 1-8, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.019>

PERRY, S.F. The Chloride Cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology*, Vol. 59, p. 325-47, 1997.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller. R. & R. Lloyd (Eds.). *Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish* Oxford, Fishing News Books, p. 339-352, 1994.

ROBBINS, S.; COTRAN, R.S. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. (Eds) Elsevier: Rio de Janeiro, 2005.

SANTOS, T.G., MARTINEZ, C.B.R. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, Vol. 89, Issue 9, p. 1118-1125, 2012. [doi:10.1016/j.chemosphere.2012.05.096](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.096)

SCHOEREDER, J.H.; SILVA, H.M.M.; CARVALHO, A.F.; et al. Proposed lime stone treatment as pest control fails for the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Crop Protection*, Vol. 42, p. 79-82, 2012. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219412002268>

SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P.; et al. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 34 (2), p. 388-396, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.007>

SOLLID, J.; DE ANGELIS, P.; GUNDERSEN, K.; et al. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 206, p. 3667-3673, 2003. DOI: 10.1242/jeb.00594 41

SOLLID, J.; WEBER, R.E.; NILSSON, G.E. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*, *Journal of Experimental Biology*, Vol. 208, p. 1109-1116, 2005. doi: 10.1242/jeb.01505

SPENCER, C. I.; YUILL, K.H.; BORG, J.J.; et al. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 298, Issue 3, p.1067-1082, 2001.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; et al. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: *Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE J.R.; et al. (Ed.). Chelsea, MI: Lewis Publishers, p. 235-335. 1992.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology normal and pathological features. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, Edição 2, 1995.

TAVARES, D.; PAULINO, M.G.; TEREZAN, A.P.; et al. Biochemical and morphological biomarkers of the liver damage in the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*, injected with crude extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi*. Environmental Science and Pollution Research, Vol. 25, Issue 16, p. 15349-15356, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1746-3>

VALENTINE, W. M. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Vol. 20 (2), p. 375-382, 1990. DOI: 10.1016/s0195-5616(90)50031-5

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. Pesticide Biochemistry and Physiology, Vol. 90, p. 42–51, 2008. Doi: 10.1016/j.pestbp.2007.07.009.

WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. Physiology Review, Vol. 77, p. 591-625, 1997. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234959>

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; et al. Systematic combat of ants-cutters with granulated baits, in eucalyptus with minimum cultivation, Rev. Árvore, Vol. 27, Edição 3, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622003000300016>