

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA, GENÉTICA E BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VERA LÚCIA LOPES

Micronúcleos e alterações morfológicas em eritrócitos e hepatócitos de espécimes de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) quando expostos a um herbicidas a base de cianamida hidrogenada

MARINGÁ
2017

VERA LÚCIA LOPES

Micronúcleos e alterações morfológicas em eritrócitos e hepatócitos de espécimes de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) quando exposto a um herbicida a base de cianamida hidrogenada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: **ANA LUIZA DE BRITO PORTELA CASTRO**

MARINGÁ
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

L864m Lopes, Vera Lúcia
 Micronúcleos e alterações morfológicas em
 eritrócitos e hepatócitos de espécimes de *Astyanax*
 altiparanae (Pisces, Characiformes) quando expostos
 a um herbicidas a base de cianamida hidrogenada /
 Vera Lúcia Lopes. -- Maringá, 2017.
 38 f. : il. color., figs.

 Orientadora: Prof.ª Dr.ª Ana Luiza de Brito
 Portela Castro.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento
 de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
 2017.

 1. Efeitos histopatológicos (Pisces, Characidae)
 - *Astyanax altiparanae* (Lambari). 2. Genotoxicidade.
 3. Herbicidas - A base de Cianamida hidrogenada. 4.
 Micronúcleos - Alterações morfológicas nucleares. I.
 Castro, Ana Luiza de Brito Portela, 1958-, orient.
 II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de
 Ciências Biológicas. Departamento de Biotecnologia,
 Genética e Biologia Celular. Programa de Pós-
 Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDD 23.ed. 597.48
MN-004040

BIOGRAFIA

Vera Lúcia Lopes nasceu em 25 de fevereiro de 1982, em Maringá, Paraná.

Em 2008 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá.

Atualmente é aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual de Maringá, onde atua na área de Genética.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de uma Introdução Geral e um artigo cujo título é: **Micronúcleos e alterações morfológicas em eritrócitos e hepatócitos de espécimes de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) quando expostos a um herbicida a base de cianamida hidrogenada**

Lopes, V.L.; Portela-Castro, A.L.B.

Este artigo foi descrito seguindo as normas da revista *Genetics and Molecular Biology*, classificada como B1 no Qualis CAPES.

**À memória de Bruna Grandi
Pinheiro e José Pinheiro de
Freitas, meus avôs, cujos
ensinamentos e encorajamento
me incentivaram a lutar pelos
meus ideais, dedico**

AGRADECIMENTO (S)

À DEUS, POR PROPORCIONAR-ME A CONCLUSÃO DE MAIS UMA ETAPA DA MINHA VIDA.

À MINHA FAMÍLIA QUE, COM MUITO CARINHO E APOIO, NÃO MEDIRAM ESFORÇOS PARA QUE EU CHEGASSE ATÉ ESSA ETAPA DE MINHA VIDA.

A PROF^A DR^A. ANA LUIZA DE BRITO PORTELA CASTRO ORIENTADORA DESTA DISSERTAÇÃO, POR TER-ME ACEITADO DE IMEDIATO E QUE POR TODO EMPENHO, SABEDORIA, COMPREENSÃO E, ACIMA DE TUDO, EXIGÊNCIA ME FIZERAM AMADURECER MEUS CONHECIMENTOS E CONCEITOS E ME LEVARAM A EXECUÇÃO E CONCLUSÃO DESTE TRABALHO.

A DR^A ANA PAULA SANTI PELO AUXILIO PRESTADO EM TODO PERÍODO DO MESTRADO.

E A TODAS AS PESSOAS QUE, DIRETA OU INDIRETAMENTE, CONTRIBUÍRAM PARA A EXECUÇÃO DESSA DISSERTAÇÃO.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

O ecossistema aquático é quase sempre o destino final para resíduos urbanos, agrícolas e industriais, o que pode afetar a homeostase dos seres vivos que o habitam. O estreito contato dos peixes com o ambiente aquático propicia o movimento de agentes genotóxicos através de muco, pele, brânquias e outras camadas externas ou ainda atingir órgãos internos causando danos muitas vezes irreversíveis. A ação de agentes tóxicos podem também induzir efeitos genotóxicos por afetarem material genético, o que pode ser evidenciado através de aberrações cromossômicas, como quebras cromossômicas ou cromátídicas, perda de cromossomos inteiros ou por condensação de fragmentos cromossômicos (micronúcleos) e, além disso, causar diversos tipos de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos. Portanto, o presente estudo visou verificar os efeitos da exposição ao agrotóxico Dormex® sobre os hepatócitos sobre eritrócitos de peixes da espécie *Astyanax altiparanae*. Neste estudo foram utilizados 65 exemplares de *Astyanax altiparanae* obtidos a partir de estabelecimentos de comércio de “iscas vivas” para pesca. As concentrações de Dormex® utilizadas foram de 0,05ml, 0,1ml e 0,5ml para 10 litros, com tempos de exposição de 24h, 48h e 72h para análise de eritrócitos e 24h e 48h para análise histológica. Para análise dos eritrócitos, a partir de sangue extraído da veia caudal, foram utilizados 40 animais sendo distribuídos quatro peixes/aquário contendo 10L de água e estabelecendo-se quatro grupos: 1 (controle, cujo aquário continha somente água de clorada e monitorado 24h); 2 (concentração 0,05ml/10L); 3 (concentração 0,1ml/10L) e 4 (concentração 0,5ml/10L). Para cada concentração, os peixes foram expostos durante 24h, 48h e 72h. Para os estudos histológicos foram utilizados 25 animais expostos às mesmas concentrações com tempos de exposição de 24h e 48h para cada tratamento. Amostras de fígado foram retiradas após eutanásia dos animais e processadas conforme métodos histológicos rotineiros. Os dados histológicos foram avaliados quanto a sua normalidade pelos testes Komogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Dados paramétricos foram submetidos ao teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey e para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. A análise dos eritrócitos dos peixes revelou diferentes tipos de alterações morfológicas nucleares e ocorrência de micronúcleos quando expostos às diferentes concentrações de solução de Dormex®. Com relação à presença de micronúcleos, observou-se uma maior frequência nos três tratamentos (0,05, 01 e 0,5 ml/10L) no período de exposição de 48h totalizando 7 células contendo um micronúcleo. Quanto às alterações morfológicas nucleares foram observados núcleos dos tipos notched, lobed, eightshaped e blebbed. Entretanto, observou-se uma frequência diferenciada quanto ao tipo de alteração sendo notched e eightshaped as mais frequentes. Com relação aos dados histológicos, os peixes quando expostos à solução de Dormex® na concentração de

0,5ml/10L demonstraram redução na densidade de hepatócitos ($p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos analisados, independente do tempo avaliado. Houve também aumento na área média celular e nuclear de hepatócitos ($p < 0,05$) nesta concentração (0,5ml/10L) e ocorreu um aumento da área nuclear na concentração de 0,05 (ml/L) em relação ao grupo controle. Os dados obtidos no presente estudo revelaram que a presença de agrotóxicos na água, até mesmo em baixas concentrações, como no caso dos tratamentos realizados com o agrotóxico Dormex®, pode causar danos aos tecidos dos peixes. As concentrações utilizadas correspondem às doses subletais permitindo a sobrevivência do animal nos aquários durante o período do experimento, porém quando diluídas em 10 litros de água resultou em uma concentração bem baixa. Contudo, devemos ressaltar que no ambiente a concentração de herbicidas, fluindo para as águas de rios, riachos e/ou córregos próximos aos locais de pulverização das plantações pode ser maior na época da aplicação dos mesmos. No presente estudo os peixes submetidos às diferentes concentrações e tempos da solução de Dormex®, resultaram no total de 63 alterações (presença de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares) sugerindo assim sua genotoxicidade. Os danos causados aos peixes foram confirmados pelas alterações na densidade e morfologia dos hepatócitos demonstrando os efeitos negativos do uso indiscriminado destes agrotóxicos.

Palavras-chave: efeitos histopatológicos, genotoxicidade, herbicidas, micronúcleos, peixes

ABSTRACT

The aquatic ecosystem is almost always the final destination for urban, agricultural and industrial waste, which can affect the homeostasis of the living beings that inhabit it. The close contact of the fish with the aquatic environment facilitates the movement of genotoxic agents through mucus, skin, gills and other external layers, or to reach internal organs, causing damage that is often irreversible. The action of toxic agents can also induce genotoxic effects by affecting genetic material, which can be evidenced by chromosomal aberrations, such as chromosomal or chromatic breaks, loss of whole chromosomes or by condensation of chromosomal fragments (micronuclei) and, in addition, cause different types of nuclear morphological changes in erythrocytes. Therefore, the present study aimed to verify the effects on liver cells and erythrocytes of fish of the species *Astyanax altiparanae* when exposure to the Dormex® pesticide by means of histological analyses and erythrocytes through the micronucleus test together with analysis of nuclear morphological changes. In this study, 65 specimens of *Astyanax altiparanae* were obtained from commercial establishments of "live bait" for fishing. The Dormex® concentrations used were 0.05ml/10L, 0.1ml/10L and 0.5ml/10L, with exposure times of 24h, 48h and 72h for erythrocyte analysis and 24h and 48h for histological analysis. For the analysis of the erythrocytes, from the blood drawn from the caudal vein, 40 animals were used and four fish/aquarium were distributed containing 10L of water and four groups were established: 1 (control, whose aquarium contained only unchlorinated water and monitored 24h); 2 (concentration 0.05ml /10L); 3 (concentration 0.1ml/10L) and 4 (concentration 0.5ml/10L). For each concentration, the fish were exposed for 24h, 48h and 72h. For the histological studies, 25 animals exposed to the same concentrations, with exposure times of 24h and 48h were used for each treatment. Liver samples were removed after euthanasia of the animals and processed according to routine histological methods. Histological data were evaluated for their normality by the Komogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. Parametric data were submitted to the One-way ANOVA and Tukey post-test, and for the non-parametric data the Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test were used. Analysis of fish erythrocytes revealed different types of nuclear morphological changes and occurrence of micronuclei when exposed to different concentrations of Dormex® solution. With respect to the presence of micronuclei, a higher frequency was observed in the three treatments (0.05, 0.1 and 0.5 ml / 10L) in the exposure period of 48h totaling 7 cells containing a micronucleus. As for the nuclear morphological changes were observed nuclei of the types notched, lobed, eightshaped and blebbed. However, a distinct frequency was observed as to the type of alteration being notched and eightshaped the most frequent. Regarding the histological data, the fish when exposed to the

solution of Dormex® in the concentration of 0.5 ml/10L demonstrated a reduction in hepatocyte density ($p < 0.05$) when compared to the other groups analyzed, regardless of the time evaluated. There was also an increase in the mean cellular and nuclear area of hepatocytes ($p < 0.05$) at this concentration (0.5 ml/10L) and at the concentration of 0.05 ml / L there was an increase in the nuclear area in relation to the control group. In addition to these alterations, nuclear hypertrophy was observed in the groups with the highest concentration (0,5 ml) of the pesticide, independent of time. The data obtained in the present study revealed that the presence of pesticides in the water, even in low concentrations, as in the case of the treatments carried out with the Dormex® pesticide, can cause damage to the fish tissues. The concentrations used correspond to the sublethal doses allowing the survival of the animal in the aquaria during the period of the experiment, but when diluted in 10 liters of water resulted in a very low concentration. However, it should be noted that in the environment the concentration of herbicides flowing into the waters of rivers, streams and/or streams near the crop spray sites may be higher at the time of application. In the present study, fish submitted to the different concentrations and times of the Dormex® solution resulted in a total of 63 changes (presence of micronuclei and nuclear morphological changes), thus suggesting their genotoxicity. The damage caused to the fish was confirmed by the changes in the density and morphology of the hepatocytes demonstrating the negative effects of the indiscriminate use of these pesticides.

Key words: fish, genotoxicity, herbicides, histopathologic effects, micronuclei,

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	MATERIAL E MÉTODOS	15
	II.1- Obtenção dos peixes.....	16
	II.2- Herbicida Experimental	17
	II.3- Tratamento dos animais.....	17
	II.4- Análise de micronúcleos.....	18
	II.5- Análise Histológica.....	19
	II.6 Análise das Hemácias.....	19
3	DISCUSSÃO	24
4	REFERÊNCIAS	28

I- Introdução

A presença dos poluentes no ambiente aquático pode causar letalidade em massa nas populações aquáticas, o que é menos frequente, ou causar diversos efeitos em todos os níveis da organização biológica. As concentrações subletais de poluentes podem causar alterações no organismo comprometendo o comportamento, crescimento, desenvolvimento, estrutura dos tecidos e a reprodução (Rand *et al.*, 1995). As respostas biológicas ao estresse provocadas pelos poluentes podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes sendo denominadas de biomarcadores. Os biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas modernos de monitoramento ambiental em países desenvolvidos (Walker, 1996). Atualmente, biomarcadores fisiológicos e histopatológicos são utilizados extensivamente para documentar e quantificar tanto a exposição, quanto os efeitos de poluentes ambientais. Estudos sobre genotoxicidade têm sido realizados em várias espécies de peixes para avaliação de possíveis danos ao DNA em função de ambientes contaminados (Kang *et al.*, 2014; Pawlowski *et al.*, 2014; Ameur *et al.*, 2015; Maier *et al.*, 2015).

Uma das metodologias mais simples e de rápida obtenção de resultados é a contagem de frequência de micronúcleos. O teste do micronúcleo tem sido amplamente empregado para avaliar alterações mutagênicas em diferentes organismos, incluindo peixes (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Os micronúcleos são formados pela condensação de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que são incluídos no núcleo principal após a anáfase, possibilitando a detecção de substâncias clastogênicas no meio aquático (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). O teste de micronúcleo possui aplicação em diversas áreas biológicas e da saúde, assim como na identificação do potencial genotóxico de novos produtos farmacêuticos, agroquímicos ou agentes físicos em geral (Kirsch-Volders e M., 1997).

Em peixes a mutagenicidade de diversos poluentes foram testadas a partir de testes de micronúcleo. A presença de micronúcleos foram registradas em espécies como Tilápias (*Oreochromis niloticus*), peixes-modelos do lago Paranoá, DF exposta aos compostos genotóxicos Ciclofosfamida e Mitomicina C (Grisolia e Starling, 2001), e em peixes expostos aos efluentes de uma refinaria de petróleo (Cavaş e Ergene-Gözükara, 2005). Na espécie *Carassius auratus* (peixe-dourado) expostos a tratamento de lixiviados de aterros de resíduos sólidos foram registrados alta concentração de micronúcleos em células branquiais (Deguchi *et al.*, 2007).

Além da frequência de micronúcleos, a ocorrência de alterações nucleares nos eritrócitos também tem sido considerada um importante indicador de danos genotóxicos. As alterações foram descritas inicialmente por (Carrasco *et al.*, 1990) e classificadas como: 1)

blebbed: pequena evaginação da membrana nuclear a qual parecer conter eucromatina ou algumas vezes heterocromatina; 2) lobed: núcleo com evaginação maior do que a do blebbed; 3) notched: apresenta fenda bem definida e profundo no núcleo; 4) núcleo vacuolado; núcleo contendo um espaço vazio. Além dessas alterações, células binucleadas, núcleos eightshaped que apresenta núcleos com formato de oito (Grisolia e Starling, 2001; Furnus *et al.*, 2014) e ainda núcleos budding. Este último tem sido definido como estruturas de DNA unidas ao núcleo por uma ponte citoplasmática estreita e que são responsáveis pela expulsão de conteúdo indesejável de DNA podendo ser precursores de micronúcleos (Dutra *et al.*, 2010).

Ayllón e Garcia-Vazquez, (2001) observaram, além de micronúcleos, alterações nucleares em eritrócitos periféricos em truta induzidos por ciclofosfamida e mitomicina-c, dois produtos com forte ação clastogênica. Alta incidência de micronúcleos e alterações nucleares também foram observados em eritrócitos de tilápias de um rio contaminado por efluentes de uma fábrica de transformação de xisto (Da Silva Souza e Fontanetti, 2006). Além disso, aumento na frequência de alterações eritrocíticas nucleares em peixes expostos à água do mar contaminada, tanto na exposição na bioensaios quanto in situ também foram observados (Van Ngan *et al.*, 2007).

Outra ferramenta, a histologia, é também considerada sensível para se diagnosticar efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetem tecidos animal sendo assim um importante bioindicador do impacto ambiental causado por agentes tóxicos sobre os animais de uma determinada fauna e, portanto, é utilizada em análises dos efeitos destes compostos (Martinez e Souza, 2002; Albinati e Santos, 2009).

As alterações histopatológicas podem ser uma importante ferramenta para avaliação de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, podendo levar a formação de lesões nas células, nos tecidos e nos órgãos (Hinton e E. Hendricks, 1992; Hinton e Laurén, 1990). As células hepáticas têm várias funções vitais, além da secreção da bile e metabolismo de xenobióticos. Em peixes, elas apresentam um importante papel no metabolismo das proteínas, lipídios e carboidratos e, além disso, estão envolvidas na hematopoiese e na produção de anticorpos durante o período larval dos peixes, sobretudo elas também servem como local de estocagem para alguns nutrientes (Takashima e Hibiya, 1995; Paris-Palacios *et al.*, 2000). Na presença de poluentes o fígado pode desenvolver alterações histológicas nos hepatócitos que podem ser usadas para o monitoramento de efeitos descontaminantes (Fanta *et al.*, 2003; Thophon *et al.*, 2003). O citoplasma das células hepáticas apresenta aspecto variável, dependendo do estado nutricional do indivíduo. Quando este se encontra bem alimentado, os hepatócitos armazenam quantidades significativas de glicogênio e processam grandes quantidades de lipídios (Takashima e Hibiya, 1995). O metabolismo do glicogênio está vinculado às necessidades de carboidratos de todo o organismo.

Em função do crescimento exponencial da população humana, faz-se necessário também um aumento na produção de alimentos e nesse sentido, os agrotóxicos têm sido muito utilizados, provocando fenômenos como: erosão, desertificação, assoreamento dos rios e envenenamento de solos e cursos d'água (Oliveira-Silva *et al.*, 2003). O impacto dos agrotóxicos na saúde humana e na qualidade ambiental é preocupante, mesmo que a exposição seja pequena, podendo acarretar efeitos negativos, além de trazer problemas para a própria exploração agrícola (Castro *et al.*, 2004). Um dos agrotóxicos utilizados na agricultura é o Dormex®, cujo componente principal é a cianamida hidrogenada (H_2CN_2 -CH). Este composto tem como princípio atuar como regulador vegetal resultando na aceleração da dormência das gemas de plantas decíduas, como maçã, amêndoa, figo, uva, pêssego, caqui e ameixa. Este é usado na pulverização sobre as gemas em doses que podem variar em função do local, cultivar, vigor da planta, somatório de horas de frio acumulado e na época de poda e estágio de dormência das gemas (Cruz Júnior e Ayub, 2002). A cianamida, em altas concentrações pode ser letal nas plantas ou quando aplicada em estágio fisiológico inadequado. Tanto a espécie como o cultivar (genótipo), seu estado nutricional, modo de aplicação e condições climáticas podem influenciar no sucesso do uso da cianamida hidrogenada (Miele, 1991).

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) classifica o Dormex® (490g L^{-1} de H_2CN_2) como a mais alta categoria de toxicidade devido aos seus efeitos corrosivos na pele e nos olhos. De acordo com o Ministério da Agricultura, se o ser humano tiver contato com o produto pode provocar ulcerações nos olhos, pele e trato respiratório, causando a síndrome de acetaldeído que ocasiona vômito, hiperatividade parassimpática, dispnéia, hipotensão e desorientação (Settimi, 2005) ou se injerido (autoenvenenamento) pode levar os indivíduos a morte (Sheshadri *et al.*, 2011). As propriedades químicas e caracterização dos riscos da cianamida hidrogenada (Dormex®) foram apresentadas em um documento do Departamento de Regulação de Pesticidas (Medical Toxicology and Worker Health and Safety Branches, Department, California Environmental Protection Agency, 1993). Neste documento são apresentados os resultados de testes de toxicidade, aguda, crônica e sub-crônica, genotoxicidade, oncogenotoxicidade, dentre outros, utilizando-se animais (ratos, cachorros). Uma das conclusões quanto à genotoxicidade deste composto é que o mesmo causou aberrações cromossômicas em células de *Hamster* chinês *in vitro*, porém, não foram observados micronúcleos *in vivo*. Portanto, os autores concluíram que o potencial genotóxico da cianamida hidrogenada neste caso é ambíguo. O destino final do agrotóxico Dormex® no ambiente com relação a sua duração é variável: a meia-vida fotolítica da cianamida hidrogênio em solução aquosa é de 29 dias, em pH 5, e 39 dias em pH 7. Em condições aeróbicas, a meia-vida da cianamida em solo arenoso é de aproximadamente 1/2 dia e sob condições anaeróbicas, sua meia-vida no solo é de 35 dias.

Nas condições de uso no campo, a meia-vidada cianamidahidrogenada variou entre 10 e 15 dias, sendo que não foram detectados resíduos nas plantações de uva tratadas com este composto, sugerindo que esta é rapidamente degradada e consideram improvável que não persista como um contaminante do ambiente (Cochran e T. B. Miller, 1993).

Assim, o presente estudo tem como objetivo principal avaliar danos celulares em hepatócitos e eritrócitos de peixes causados pelo agrotóxico Dormex®. Esse produto, quando aplicado sobre os campos de cultivo, pode atingir os corpos d'água diretamente, através da água da chuva e da irrigação, ou indiretamente através da percolação no solo, chegando aos lençóis freáticos. Quando lançadas no ambiente aquático, as substâncias oriundas das atividades agrícolas são capazes de interagir com o organismo vivo, causando múltiplas alterações que podem gerar graves desequilíbrios ecológicos, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição. Dessa forma, avaliou-se o efeito do agrotóxico Dormex® em espécimes de *Astyanax altiparanae* submetendo os animais à exposição em aquários contaminados, usando diferentes concentrações e tempo para avaliação de alterações histopatológicas em fígado, nucleares e presença de micronúcleos em eritrócitos. O conhecimento do potencial citogenotóxico deste composto é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de riscos para o homem e o ambiente.

Esse produto, quando aplicado sobre os campos de cultivo, podem atingir os corpos d'água diretamente, através da água da chuva e da irrigação, ou indiretamente através da percolação no solo, chegando aos lençóis freáticos. Quando lançadas no ambiente aquático, as substâncias oriundas das atividades agrícolas são capazes de interagir com o organismo vivo, causando múltiplas alterações que podem gerar graves desequilíbrios ecológicos, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1- Obtenção dos peixes

Os espécimes de *Astyanax altiparanae* foram obtidos comercialmente em lojas especializadas em lojas de “iscas vivas” para pesca da cidade de Paranavaí- PR. Os animais foram transportados em caixas de isopor contendo água e aeração adequada para o biotério de peixes localizado no bloco G-90, sala 18A (UEM-DBC, cadastrado no CIUCA), e mantidos em aquários aerados, permanecendo em temperatura e luminosidade ambiente, e alimentados com ração específica para peixes de pequeno porte até os procedimentos experimentais. Os animais apresentaram um peso médio de 11g.

Os animais foram identificados pela Prof^a. Dr^a Carla Simone Pavanelli, Curadora da Coleção Ictiológica, NUPÉLIA, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá.

II.2- Herbicida Experimental

Dormex® é um agrotóxico da classe cianamida produzido pela Degussa AG (Alemanha) e registrado pela BASF S.A., São Bernardo do Campo (SP). Este agrotóxico possui registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MAPA com nº 001095 e é composto de cianamida hidrogenada na concentração de 520g/L (52,0%) e 545 g/L de outros ingredientes (54,5%). Sua fórmula e componentes podem ser encontrados em www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt.../Dormex/DORMEX.pdf).

Para nosso experimento a solução Dormex® foi obtida comercialmente e inicialmente testada em concentrações subletais, estabelecendo-se 0,05ml, 0,1ml e 0,5ml para cada 10L de água correspondente a capacidade dos aquários.

II.3- Tratamento dos animais

Antes do início dos tratamentos, os peixes foram aclimatados por 7-10 dias em água desclorada em aquário de vidro (10 L), na relação de massa do organismo/volume de água de 1 g/L e alimentados com ração comercial duas vezes ao dia (pela manhã e ao final da tarde) até 24 horas antes do início do experimento. Neste estudo foi realizado um ensaio semi-estático onde os organismos eram expostos com renovação da solução a cada 24h, devido a instabilidade do Dormex® em água.

Um total de 65 exemplares de *Astyanax altiparanae* foi utilizado neste estudo sendo 40 animais para teste do micronúcelos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos e 25 para análise morfoquantitativa de fígado através de cortes histológicos. Os animais foram distribuídos em grupos conforme dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais de acordo com o tempo de exposição e concentração de Dormex® para análise de micronúcleos. Para cada indivíduo foram analisadas 2000 células.

Grupo/nº de indivíduos	Concentração do Dormex® (ml/10L)	Tempo de exposição (H)
1 (4)	Controle	24
2(12)	0,05	24
		48
		72
3(12)	0,1	24
		48
		72
4 (12)	0,5	24
		48
		72

Após o período de aclimação, cada animal retirado do aquário foi banhado em solução anestésica óleo de cravo/eugenol e aplicados conforme instruções em INOUE E MORAES (2007). Os animais foram manipulados somente após não responder a nenhum estímulo físico denotando morte por superdosagem de anestésico. Após a anestesia realizou-se uma punção na veia caudal de cada peixe e com uma seringa de vidro ressuspendeu-se o sangue gotejando-o em uma lâmina fazendo-se um esfregaço para análise de micronúcleos e de alteração morfológica nuclear. Em seguida os animais foram dissecados para retirada dos órgãos, gônadas (para identificação do sexo) e fígado para análise histológica. Após estes procedimentos, os animais foram fixados em álcool 95%L, protocolados com número, sexo e procedência sendo parte tombada no acervo do laboratório da Universidade Estadual de Maringá – UEM/NUPELIA como testemunho e os demais acondicionados em frascos de vidro com álcool absoluto ou comercial.

II.4- Análise de micronúcleos

Para análise dos micronúcleos (MN) foi empregada à técnica descrita por Heddle (1973), sendo coletado o sangue do peixe da veia caudal, através de uma punção e feito o esfregaço em lâminas. As lâminas foram coradas com Giemsa 5% e analisada em microscopia óptica, sendo contados 2000 eritrócitos por peixe. As alterações morfológicas nucleares que não se enquadram como micronúcleo também foram analisadas.

As alterações morfológicas nucleares (AMN) foram classificadas de acordo com Carrasco *et al.* (1990) como: blebbed: pequena evaginação da membrana nuclear;- lobed:

núcleo com evaginação maior do que a do blebbed; -notched: apresenta fenda bem definida e profundo no núcleo. Outra forma observada foi adicionada conforme descrição de GNA et al. (2014): eightshaped que apresenta núcleos com formato de oito.

II.5- Análise Histológica

Para análise histológica foram estabelecidos 5 grupos, sendo 5 peixes/aquário contendo 10 litros de água cada. Os aquários dos grupos controle (grupo 1) foram preenchidos apenas com água desclorada (solução Anticlor), enquanto os aquários dos grupos experimentais foram preenchidos com água e solução Dormex® nas concentrações de 0,05ml/24h (grupo 2) 0,05ml/48h (grupo 3); 0,5 ml/10L nos tempos de 24 e 48h (grupos 4 e 5 , respectivamente).

Após a eutanásia, amostras de fígado foram lavadas em solução salina 0,9% e fixadas em solução aquosa de Bouin durante 6 horas. Este material foi avaliado sob a objetiva de 40X em microscópio Leica DM2000 e os principais aspectos morfológicos dos hepatócitos foram analisados, como Densidade de hepatócitos, análise morfométrica celular e nuclear de hepatócitos. Para a quantificação foram contados hepatócitos em 50 imagens /animal capturadas em objetiva de 40x para o cálculo da densidade (células/cm²). A morfometria foi realizada através da medição da área celular e nuclear de 200 hepatócitos/animal de imagens obtidas em objetiva de 100X, sendo os resultados expressos em µm². As análises foram realizadas com auxílio do software Image Pró-Plus.(Behmer *et al.*, 1976), sendo posteriormente armazenadas em álcool 70°. Para o processamento histológico, o material foi desidratado em série crescente de álcoois (80%, 90% e 100%), diafanizado em xilol e incluído em parafina. Foram obtidos cortes transversais semi-seriados de 6µm de espessura, com auxílio de micrótomo rotativo LEICA no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Morfologia da Universidade Estadual de Maringá. As lâminas foram coradas pelo método Hematoxilina-Eosina – H&E (Behmer *et al.*, 1976)

Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina segundo Beçak e Paulete (1976).

Os resultados obtidos foram avaliados quanto a sua normalidade pelos testes Komogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Dados paramétricos foram submetidos ao teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey e para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's.

II.6- Análise das hemácias

Para análise dos eritrócitos, a partir de sangue extraído da veia caudal, foram utilizados 40 animais sendo distribuídos quatro peixes/aquário contendo 10L de água e estabelecendo-se quatro grupos: 1 (controle, cujo aquário continha somente água de clorada e monitorado 24h); 2 (concentração 0,05ml/10L); 3 (concentração 0,1ml/10L) e 4 (concentração 0,5ml/10L). Para cada concentração, os peixes foram expostos durante 24h, 48h e 72h. Para os estudos histológicos foram utilizados 25 animais expostos às mesmas concentrações com tempos de exposição de 24h e 48h para cada tratamento. Amostras de fígado foram retiradas após eutanásia dos animais e processadas conforme métodos histológicos rotineiros (Behmer *et al.*, 1976) e corados com hematoxilina e eosina segundo Paulete & Beçak (Beçak e Paulete, 1976). Foram obtidos cortes transversais semi-seriados de 6µm de espessura, com auxílio de micrótomo rotativo LEICA no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Morfologia da Universidade Estadual de Maringá. Os dados histológicos foram avaliados quanto a sua normalidade pelos testes Komogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Dados paramétricos foram submetidos ao teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey e para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's.

3 Resultados

Teste de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos

A análise dos eritrócitos dos peixes revelou diferentes tipos de alterações morfológicas nucleares e ocorrência de micronúcleos quando expostos às diferentes concentrações de solução de Dormex®. Estes dados estão representados na Tabela 2 e Figura 1. Com relação à presença de micronúcleos, observa-se uma maior frequência nos três tratamentos (0,05, 01 e 0,5 ml/10L) no período de exposição de 48h (Figura 1b, Tabela 2) e quanto às alterações morfológicas nucleares, considerando o número total de alterações/tempo de exposição e frequência (%), diferentes tipos de alterações ocorreram em todas as concentrações e tempos de exposição, incluindo o controle. Entretanto, observa-se uma frequência diferenciada quanto ao tipo de alteração sendo notched e eightshaped as mais frequentes (Tabela 2).

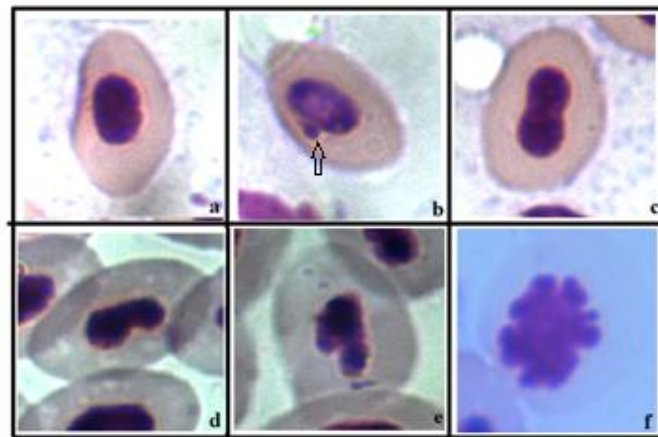


Figura 1: Eritrócitos maduros de *Astyanax altiparanae*. a) Núcleo normal; (b) Micronúcleo, seta; (c) Eightshaped,; (d) Notched; (e) Blebbed; (f) Lobed; Coloração: Giemsa 10%; Aumento: 1000x.

Tabela 4. Frequência de alterações morfológicas nucleares induzidas pelo Dormex® em concentrações e tempos de exposição distintos calculada com base em 2000 células/indivíduo.

Alterações nucleares	Número de células e frequência média das alterações nucleares (%) Concentrações (ml/10L) e tempo de exposição (H)										Total/ alteração nuclear
	Grupo 1 Controle	Grupo 2 0,05			Grupo 3 0,1			Grupo 4 0,5			
	24	24	48	72	24	48	72	24	48	72	
Micronúcleo	0	0	1	0	1	0	1	1	2	1	7
Notched	0	1	0	3	4	9	8	0	2	3	30
Eightshaped	0	0	0	3	5	0	0	0	5	6	19
Blebbed	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	5
Lobed	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Total	1	2	1	6	10	9	9	1	10	14	63
%	(0,05)	(0,1)	(0,05)	(0,3)	(0,5)	(0,45)	(0,45)	(0,05)	(0,5)	(0,7)	(3,1)

Análise Histológica

3.1- Densidade de Hepatócitos

Os peixes quando expostos à solução de Dormex® na concentração de 0,5ml/10L demonstraram redução na densidade de hepatócitos ($p < 0,05$) quando comparado aos

demais grupos analisados, independente do tempo avaliado. A concentração de 0,05ml/10l não alterou este parâmetro (Figura 2).

3.2- Análise morfológica celular e nuclear de hepatócitos

A exposição ao Dormex® na concentração de 0,5 (ml/L) causou aumento na área média celular e nuclear de hepatócitos ($p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos analisados, independente do tempo avaliado. A concentração de 0,05 (ml/L) causou aumento da área nuclear em relação ao grupo controle (Figura 2).

3.3 Alterações morfológicas nucleares

A exposição ao Dormex® nas diversas concentrações promoveu resultados significativos conforme apresentados na Tabela 4 e Figura 2.

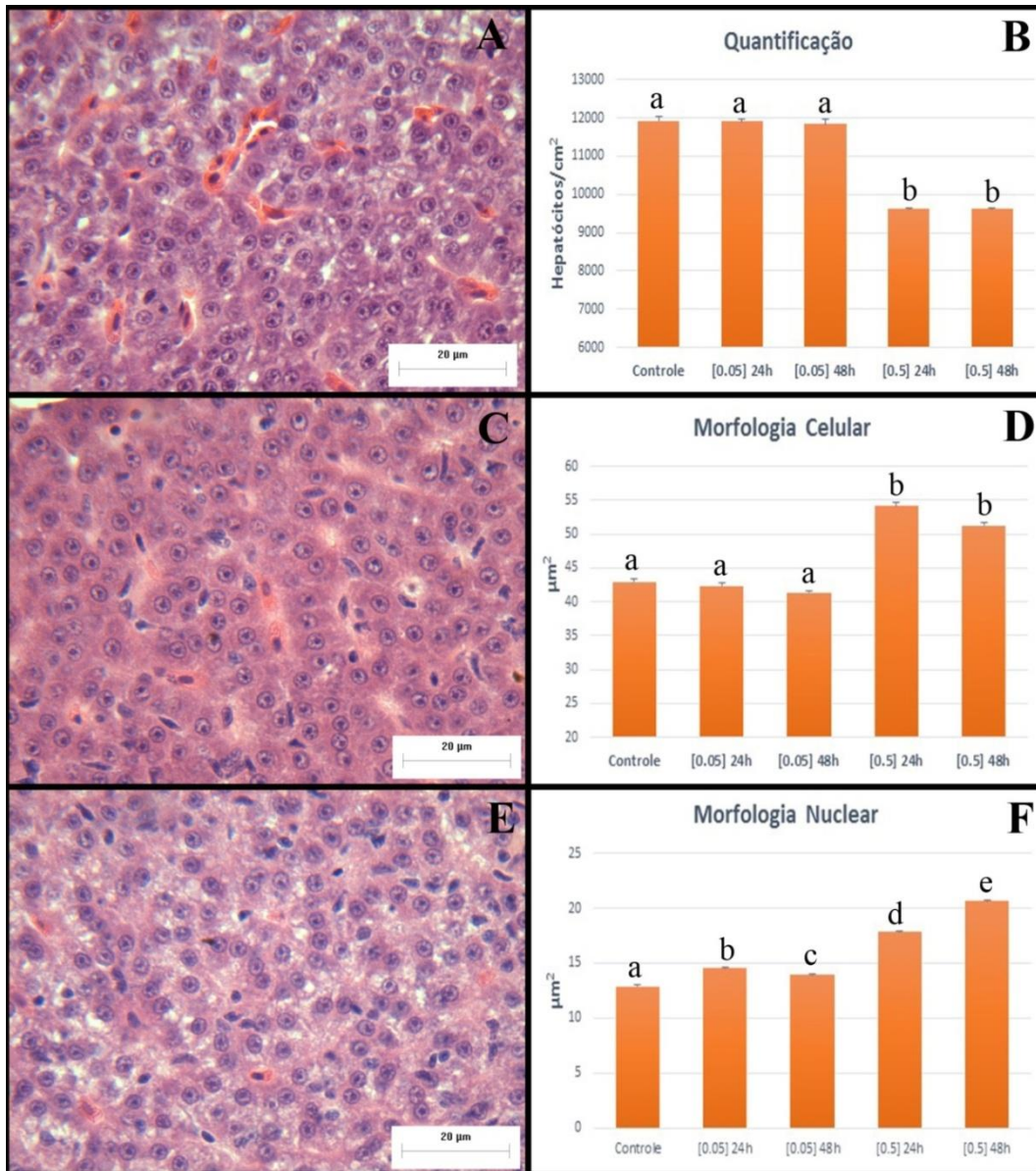


Figura 2: (A,C,E) Hepatócitos de *Astyanax altiparanae* após tratamentos com diferentes concentrações de Dormex®. (B, D, F); valores médios de densidade e morfologia celular e nuclear dos hepatócitos; (A) controle; (C) Hepatócitos após exposição na concentração de 0,05ml/10L; note uma redução de hepatócitos nos grupos de maior concentração independente do tempo; D. Hipertrofia celular nos grupos de maior concentração independente do tempo. E. Hepatócitos após exposição na concentração de 0,5ml/10L; F. hipertrofia nuclear nos grupos de maior concentração independente do tempo; Coloração: HE. Calibração: 20μ.

4 Discussão

Os dados obtidos no presente estudo revelaram que a presença de agrotóxicos na água, até mesmo em baixas concentrações, como no caso do agrotóxico Dormex®, podem causar danos aos tecidos dos peixes. As concentrações utilizadas correspondem às doses subletais permitindo a sobrevivência do animal nos aquários durante o período do experimento e ainda, diluídas em 10 litros de água resultando em uma concentração bem baixa. Contudo, no ambiente a concentração de herbicidas, fluindo para as águas de rios, riachos e/ou córregos próximos aos locais de pulverização das plantações pode ser maior na época da aplicação dos mesmos. De acordo com Cochran et al., (1993) (Cochran e T. B. Miller, 1993), em condições aeróbicas, a meia-vida da cianamida em solo arenoso é de aproximadamente 1/2 dia e sob condições anaeróbicas, sua meia-vida no solo é de 35 dias. No presente estudo os peixes foram submetidos às diferentes concentrações e tempos da solução de Dormex®, resultando no total de 63 alterações (presença de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares) sugerindo assim sua genotoxicidade.

O ensaio de micronúcleos tem se mostrado como uma técnica simples e rápida na detecção de impactos genotóxicos em organismos, apoiado no fato de que a formação espontânea de micronúcleos é baixa e quase uniforme entre as espécies, sendo indicado para triagens de rotina e monitoramentos ambientais (Siu *et al.*, 2004). Seu uso tem sido indicado para avaliação de ambientes contendo contaminantes genotóxicos, como os produtos químicos derivados de emissões industriais, empregando-se diversas espécies de peixes: *Ictalurus punctatus*, *Esox lucius* e *Oreochromis niloticus* (Sugg *et al.*, 1996; Ilyinskikh *et al.*, 1998; Mahrous *et al.*, 2015). Em outro estudo, envolvendo peixes em rios próximos de mineradoras de carvão, Talukdar et al. (2016) (Talukdar *et al.*, 2016) registraram danos ao DNA através do teste de micronúcleo, teste do cometa e aberrações cromossômicas devido a presença de altas concentrações de sulfato e ferro nas águas dos locais amostrados.

A análise dos eritrócitos dos indivíduos de *Astyanax altiparanae* revelou uma baixa frequência de micronúcleos (total de células com 1 micronúcleo = 7, Tabela 2), como verificado em alguns estudos. Em uma análise mutagênica com espécimes de *Astyanax altiparanae*, Disner et al. (2011) observaram uma baixa frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas nos animais expostos ao herbicida Roundup® (glifosato) mesmo usando diferentes concentrações e tempos de exposição. Em outra análise, uma avaliação comparativa da ação genotóxica dos herbicidas Roundup®, Stomp (dinitroalane) e Reglone (Diquat), Dimitrov et al. (2006) (Dimitrov *et al.*, 2006), utilizando como organismos modelos a planta *Crepis capillaris* L. (meristema de raízes) e medula óssea de rato encontraram respostas diferenciadas quanto aos efeitos dos herbicidas (frequência de aberrações cromossômicas bem como de micronúcleos) por estes organismos; o Roundup® não

induziu aberrações cromossômicas e micronúcleos em ambos testes, contudo o Diquat e o Stomp induziram aumento da frequência de micronúcleos nas células de ambos organismos. Segundo os autores as respostas diferenciadas entre animais e plantas às exposições aos herbicidas podem ser devidas as diferenças na biossíntese de metabólitos genotóxicos (no caso de células animais) e também pela ruptura do fuso mitótico como evidenciado em plantas. A baixa frequência de micronúcleos nos espécimes de *A. altiparanae*, pode estar relacionada a baixa concentração da cianamida nos tratamentos não sendo suficiente em tempo e concentração para formação de micronúcleos.

De acordo com Klingerman (1982) danos cromossômicos representados como formação de micronúcleos resultam da reparação ineficiente do DNA sendo expressa durante a divisão celular e constitui um índice de agentes genotóxicos acumulados. Esta variação significativa poderia ser atribuída a toxicocinética do poluente e a velocidade do ciclo hematopoiético das espécies de peixes. Neste contexto, a ausência de micronúcleo observada nesse trabalho pode também refletir um metabolismo mais rápido diante da temperatura da água, o que poderia ter mascarado o efeito do Dormex® nessa variável.

Efeitos citotóxicos da cianamida hidrogenada em peixes são basicamente desconhecidos, contudo, estes efeitos foram testados em exemplares de *Astyanax altiparanae* com tempos de exposição e concentração variáveis, resultando em aberrações cromossômicas como quebras cromatídicas e diferentes tipos de alterações morfológicas nas brânquias como fusão lamelar, hiperplasia e telangectasia (aneurisma lamelar) (Lemos, 2016). Os efeitos citotóxicos da cianamida hidrogenada foi também avaliado em raízes de *Allium cepa* L. sendo observadas diversas alterações como redução do comprimento das raízes, redução das células mitóticas, inibição da proliferação de células meristemáticas e ciclo celular, e ainda modificações no arranjo do citoesqueleto (Soltys *et al.*, 2011).

Devido ao fato dos peixes apresentarem eritrócitos nucleados, as alterações na morfologia do núcleo podem ser também um excelente bioindicador de poluição ambiental. Além de alta incidência de micronúcleos, alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de peixes são também consideradas importantes biomarcadores de citogenotoxicidade. Estas alterações têm sido registradas em estudos com exposição dos peixes aos herbicidas (Cavaş e Könen, 2007; Disner, 2011) metais pesados (Ferraro *et al.*, 2004), poluentes ambientais (Grisolia *et al.*, 2009), dentre outros. Dentre os quatro tipos de alterações observadas no presente estudo, as mais frequentes foram dos tipos notched e eighshaped (Tabela 2), principalmente nos tratamentos dos grupos 2 e 3, e em maior tempo de exposição (48 e 72h). Vários fatores podem contribuir para formação de anomalias morfológicas dos eritrócitos de peixes quando expostos às substâncias tóxicas. De acordo com Ateeq *et al.* (2002) agentes tóxicos podem causar condições de hipóxia nas células resultando na depressão de ATP o que levaria as mudanças na forma dos eritrócitos.

Anomalias dos tipos notched e células binucleadas têm sido atribuídas à ocorrência de aneuploidias devido falhas nos fuso mitótico e, além disso, estes agentes podem penetrar nas membranas dos eritrócitos causando perturbações na bicamada lipídica resultando em células vacuoladas e equinocíticas (Ateeq *et al.*, 2002).

A significativa redução na densidade de hepatócitos nos diversos tempos com concentração de 0,5 indica o potencial genotóxico do Dormex® em peixes de água doce, bem como o possível valor da espécie *Astyanax altiparanae* para esta avaliação. Degeneração em hepatócitos de peixes também foi observada quando expostos ao inseticida Propoxur (Gül *et al.*, 2012). Em outro estudo, ratos alimentados com ração contendo 0,1% de bifenispoliclorados (PCBs) durante uma semana apresentaram alterações estruturais e degenerativas das células hepáticas (Allen e Abrahamson, 1973).

(Ramírez-Duarte *et al.*, 2008) avaliaram a toxicidade aguda e as alterações histopatológicas induzidas pelo glifosato -N (fosfometil) glicina, na formulação Roundup® em juvenis de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) expostos durante 96 horas. A concentração letal 50 foi de 97.47mg. L⁻¹ (P<0.05). Nas brânquias foram achadas lesões proliferativas e necróticas. No fígado foi observada congestão, processos degenerativos, gotas hialinas e presença de vacúolos lipídicos nos hepatócitos. No estômago e na pele foi detectada hiperplasia ligeira das células de mucosa. Nesta última, adicionalmente foi observado engrossamento da epiderme com lesões necróticas, infiltração de células leucocitárias e acumulação de melanina. No cérebro foram observados focos de degeneração de somas neurais na região do telencéfalo junto com glicose e infiltração de células granulais eosinofílicas/células mast. Concluindo, as brânquias, o fígado, a pele e o cérebro são órgãos suscetíveis ao Roundup®. Adicionalmente, os efeitos sobre o sistema nervoso central poderiam reduzir a olfação nos peixes, tanto como o comportamento grupal e individual, a performance reprodutivo e desta forma, repercutir no nível populacional.

Segundo Cochran e T. B. Miller (1993) a cianamida de hidrogênio entrou no processo de avaliação de risco devido a possíveis efeitos adversos identificados na toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica e estudos de oncogenicidade. O processo de avaliação de risco consiste em quatro aspectos: identificação de perigos, avaliação de resposta a dose, avaliação de exposição e caracterização de risco. A identificação de perigo implica a revisão e avaliação das propriedades toxicológicas de cada pesticida. A avaliação dose-resposta então considera as propriedades toxicológicas e estima a quantidade que potencialmente poderia causar um efeito adverso. A quantidade que não resultará em um efeito não oncogênico observável ou mensurável é chamada de Nível de efeito não observado. Em geral, presume-se que os efeitos oncogênicos de um produto químico podem ocorrer em todas as dosagens. A capacidade de um produto químico para causar tumores é indicada pela sua potência.

Em um estudo realizado por Samanta *et al.* (2016) os efeitos do herbicida baseado em glifosato Excel Mera 71 em condições de campo e laboratório foram investigados para avaliar os sintomas patológicos através de estudo microscópico de luz e elétron na brânquia, fígado e rim de *Heteropneustes fossilis* (Bloch) por um período de 30 dias. Alterações histológicas como hipertrofia e fusão em lamelas secundárias, danos em células de cloreto foram mais proeminentes em condições de laboratório sob microscopia de luz. Alterações topológicas, como perda completa de micro saliências, inchaço nas brânquias, foram proeminentes no estudo microscópico eletrônico de varredura em condições de laboratório. O estudo de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) revelou vacuolação e degeneração em células de cloreto no epitélio branquial. O fígado apresentou hepatócitos alargados, vacuolação, excesso de gordura e necrose em condições laboratoriais ampliadas, enquanto que os núcleos acêntricos aumentados, o aumento do espaço sinusoidal e menor vacuolação no citoplasma foi observado em condições de campo.

A área morfométrica citoplasmática dos hepatócitos nas concentrações 0,5ml (24h) e 0,5ml (48h), aumentaram em 30,85% e em 31,31%, respectivamente nos peixes do grupo C 0,5 quando comparado aos dos demais grupos. Em outro estudo, também foi observado hipertrofia de células hepáticas em ratos alimentados com ração contendo 0,1% de bifenispolioclorados (Kimbrough *et al.*, 1972).

As alterações histopatológicas podem ser uma importante ferramenta para avaliação de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, podendo levar a formação de lesões nas células, nos tecidos e nos órgãos (Hinton e E. Hendricks, 1992; Hinton e Laurén, 1990).

Em resumo, embora a frequência de micronúcleos tenha sido relativamente baixa nos peixes expostos as diferentes concentrações de Dormex® comercial, entretanto, a ocorrência de diferentes tipos de alterações morfológicas dos eritrócitos, são dados obtidos neste estudo que sugerem genotoxicidade deste composto. Além disso, as alterações nos hepatócitos foram significativas e confirmaram os efeitos tóxicos do Dormex®.

Referencias

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res*, v. 343, n. 2-3, p. 121-35, Jun 1995. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7791806> >.

ALBINATI, A. C. L. M., E.L.T. ALBINATI, R.C.B.CARVALHO, J.V. LIRA, A.D.; SANTOS, G. B. V., L.V.O. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). ALVES, C. B. M.;VIEIRA, F., *et al*: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia: 621-627 p. 2009.

ALLEN, J. R.; ABRAHAMSON, L. J. Morphological and biochemical changes in the liver of rats fed polychlorinated biphenyls. *Arch Environ Contam Toxicol*, v. 1, n. 3, p. 265-80, Oct 1973. ISSN 0090-4341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4130176> >.

AMEUR, W. B. et al. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere*, v. 135, p. 67-74, Sep 2015. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25912422> >.

ATEEQ, B. et al. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by *Allium rot tip* test.: *Mutation Research*. 514: 05-113 p. 2002.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 49, n. 3, p. 221-5, Jul 2001. ISSN 0147-6513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11440474> >.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: Edart: 256 p. 1976.

BERNET, D. S., H. MEIER, W. BURKHARDT-HOLM, P. Histopathology in Fish: Proposal for a Protocol to Assess Aquatic Pollution: *J. Fis. Disea*. 22: 25-34 p. 1999.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. *Técnicas de citologia e histologia*. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos., 1976.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assessment os the piscine micronuclei test in situ biological indicator of chemical contaminats effects.: *Canad. Journ. of Fish. and Aquatic Scienc.*: 2123-2136 p. 1990.

CASTRO, T. G. et al. Health and nutrition of children, 0 to 60-month old, in an agrarian-reform settlement. Vale do Rio Doce, MG, Brazil.: *Revista de. Nutrição*: 167-176 p. 2004.

CAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol*, v. 74, n. 3, p. 264-71, Sep 2005. ISSN 0166-445X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023743> >.

CAVAŞ, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, v. 22, n. 4, p. 263-8, Jul 2007. ISSN 0267-8357. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426049> >.

COCHRAN, R. C. L., P. MOORE,; T. B. MILLER, C. D. P., G.T.FORMOLI ,T. A. PFEIFER, K. F. SCHREIDER, J. P. Hydrogen Cyanamid Risk Characterization Document Medical Toxicology and Worker Health and Safety Branches: Department of Pesticide Regulation California Environmental Protection Agency. 1993.

CORT, C. C. W. D.; GHISI, N. C. Uso de alterações morfológicas nucleares no peixe *Astyanax* spp. para avaliação da contaminação aquática.: *O Mundo da Saúde (Online)*: 31-39 p. 2014.

COSTA, C.; TEIXEIRA, J. P. Efeitos Genotóxicos dos Pesticidas.: *Revista de Ciências Agrárias*. 35 2012.

COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Curitiba Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente*. 15: 65-72 p. 2005.

CRUZ JÚNIOR, A. O.; AYUB, R. A. Quebra de dormência de gemas de macieira cv. Eva tratadas com cianamida hidrogenada. *Jaboticabal: Revista Brasileira de Fruticultura*. 24: 576-578 p. 2002.

DA SILVA SOUZA, T.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat Res*, v. 605, n. 1-2, p. 87-93, Jun 2006. ISSN 1873-135X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678473> >.

DEGUCHI, Y. et al. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat Res*, v. 627, n. 2, p. 178-85, Mar 2007. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196875> >.

DIMITROV, B. D. et al. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis*, v. 21, n. 6, p. 375-82, Nov 2006. ISSN 0267-8357. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998229> >.

DISNER, G. R. Avaliação da atividade mutagênica do Roundup® em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii). *Joaçaba.: Evidência*. 11: 33-42 p. 2011.

DUTRA, A. et al. Nuclear bud formation: a novel manifestation of Zidovudine genotoxicity. *Cytogenet Genome Res*, v. 128, n. 1-3, p. 105-110, 2010. ISSN 1424-859X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20407220> >.

FANTA, E. et al. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 54, n. 2, p. 119-30, Feb 2003. ISSN 0147-6513 (Print) 0147-6513.

FERRARO, M. V. M. et al. Genetic Damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations.: *Genetics and Molecular Biology*. 27: 270–274 p. 2004.

FURNUS, G. N. et al. Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina). *Braz J Biol*, v. 74, n. 1, p. 217-21, Feb 2014. ISSN 1678-4375. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25055105> >.

GRISOLIA, C. K. et al. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet Mol Biol*, v. 32, n. 1, p. 138-43, Jan 2009. ISSN 1415-4757. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637659> >.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat Res*, v. 491, n. 1-2, p. 39-44, Apr 2001. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287296> >.

GÜL, A. et al. Sublethal propoxur toxicity to juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758): biochemical, hematological, histopathological, and genotoxicity effects. *Environ Toxicol Chem*, v. 31, n. 9, p. 2085-92, Sep 2012. ISSN 1552-8618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22730006> >.

HENARES, M. N. P. et al. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum Biology Science*. 30: 77-82 p. 2008.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*: 51- 66 p. 1990.

HINTON, D. E. B., P. C. GARDNER, G. R. HAWKINS, W.; E. HENDRICKS, J. D. M., R. A. OKIHIRO. Histopathologic Biomarkers. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. J., H. R.; KIMERLI, R. A., et al. Boca Raton: Lewis Publishers: p. 155 – 196. p. 1992.

ILYINSKIKH, N. N.; ILYINSKIKH, E. N.; ILYINSKIKH, I. N. Micronucleated erythrocytes frequency and radiocesium bioconcentration in pikes (*Esox lucius*) caught in the Tom River near the nuclear facilities

of the Siberian Chemical Complex (Tomsk-7). *Mutat Res*, v. 421, n. 2, p. 197-203, Nov 1998. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9852993> >.

KANG, N.; KANG, H. I.; AN, K. G. Analysis of fish DNA biomarkers as a molecular-level approach for ecological health assessments in an urban stream. *Bull Environ Contam Toxicol*, v. 93, n. 5, p. 555-60, Nov 2014. ISSN 1432-0800. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260997> >.

KIMBROUGH, R. D.; LINDER, R. E.; GAINES, T. B. Morphological changes in livers of rats fed polychlorinated biphenyls: light microscopy and ultrastructure. *Arch Environ Health*, v. 25, n. 5, p. 354-64, Nov 1972. ISSN 0003-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4346789> >.

KIRSCH-VOLDERS; M. The CB *in vitro* micronucleus assay in human lymphocytes. n. *Mutat. Res*, p. 1-2, 1997.

KLINGERMAN, A. Fishes as biological detectors of the effects of genotoxic agents. Academic Press, New York: Heddle JA (ed) *Mutagenicity, new horizons in genetic toxicology* 1982.

LEMOS, L. Z. Avaliação do potencial de genotoxicidade e das alterações morfológicas 15 branquiais em espécimes de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characidae) 16 quando submetidos ao agrotóxico Dormex®. Dissertação, Universidade Estadual de Maringá, PR.: 74p. p. 2016.

MAHROUS, K. F. et al. Inhibition of cadmium- induced genotoxicity and histopathological changes in Nile tilapia fish by Egyptian and Tunisian montmorillonite clay. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 119, p. 140-7, Sep 2015. ISSN 1090-2414. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26001163> >.

MAIER, D. et al. Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in wastewater, surface water, and sediments with effects in fishes. *Water Res*, v. 72, p. 127-44, Apr 2015. ISSN 1879-2448. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260601> >.

MARTINEZ, C. B.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v. 133, n. 1, p. 151-60, Sep 2002. ISSN 1095-6433 (Print) 1095-6433.

MIELE, A. Efeito da cianamida hidrogenada na quebra de dormência das gemas, produtividade do vinhedo e composição química do mosto da uva Cabernet Sauvignon. . Brasília Pesquisa Agropecuária Brasileira 26: 315-354 p. 1991.

MURTY, A. Toxicity of pesticides to fish.: CRC-Press. 2v 1986.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. ***Mutat Res***, v. 343, n. 2-3, p. 121-35, Jun 1995. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7791806> >.

ALBINATI, A. C. L. M., E.L.T. ALBINATI, R.C.B.CARVALHO, J.V. LIRA, A.D.; SANTOS, G. B. V., L.V.O. **Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em**

piaçu (*Leporinus macrocephalus*). ALVES, C. B. M.;VIEIRA, F., *et al*: **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**: 621-627 p. 2009.

ALLEN, J. R.; ABRAHAMSON, L. J. Morphological and biochemical changes in the liver of rats fed polychlorinated biphenyls. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 1, n. 3, p. 265-80, Oct 1973. ISSN 0090-4341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4130176> >.

AMEUR, W. B. et al. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in Mugil cephalus and Dicentrarchus labrax gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. **Chemosphere**, v. 135, p. 67-74, Sep 2015. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25912422> >.

ATEEQ, B. et al. **Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by Allium rot tip test.**: Mutation Research. 514: 05-113 p. 2002.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 49, n. 3, p. 221-5, Jul 2001. ISSN 0147-6513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11440474> >.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica** . São Paulo: Edart: 256 p. 1976.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos., 1976.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. **Assessment os the piscine micronuclei test in situ biological indicator of chemical contaminats effects.**: Canad. Journ. of Fish. and Aquatic Scienc.: 2123-2136 p. 1990.

CASTRO, T. G. et al. **Health and nutrition of children, 0 to 60-month old, in an agrarian-reform settlement.** Vale do Rio Doce, MG, Brazil.: Revista de. Nutrição: 167-176 p. 2004.

CAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquat Toxicol**, v. 74, n. 3, p. 264-71, Sep 2005. ISSN 0166-445X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023743> >.

CAVAŞ, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the

comet assay. **Mutagenesis**, v. 22, n. 4, p. 263-8, Jul 2007. ISSN 0267-8357. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426049> >.

COCHRAN, R. C. L., P. MOORE,; T. B. MILLER, C. D. P., G.T.FORMOLI ,T. A. PFEIFER, K. F. SCHREIDER, J. P. Hydrogen Cyanamid Risk Characterization Document Medical Toxicology and Worker Health and Safety Branches: Department of Pesticide Regulation California Environmental Protection Agency. 1993.

CRUZ JÚNIOR, A. O.; AYUB, R. A. **Quebra de dormência de gemas de macieira cv. Eva tratadas com cianamida hidrogenada.** Jaboticabal: Revista Brasileira de Fruticultura. 24: 576-578 p. 2002.

DA SILVA SOUZA, T.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutat Res**, v. 605, n. 1-2, p. 87-93, Jun 2006. ISSN 1873-135X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678473> >.

DEGUCHI, Y. et al. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutat Res**, v. 627, n. 2, p. 178-85, Mar 2007. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196875> >.

DIMITROV, B. D. et al. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis**, v. 21, n. 6, p. 375-82, Nov 2006. ISSN 0267-8357. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998229> >.

DISNER, G. R. **Avaliação da atividade mutagênica do Roundup® em Astyanax altiparanae (Chordata, Actinopterygii).** Joaçaba.: Evidência. 11: 33-42 p. 2011.

DUTRA, A. et al. Nuclear bud formation: a novel manifestation of Zidovudine genotoxicity. **Cytogenet Genome Res**, v. 128, n. 1-3, p. 105-10, 2010. ISSN 1424-859X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20407220> >.

FANTA, E. et al. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 54, n. 2, p. 119-30, Feb 2003. ISSN 0147-6513 (Print) 0147-6513.

FERRARO, M. V. M. et al. **Genetic Damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations.** Genetics and Molecular Biology. 27: 270–274 p. 2004.

FURNUS, G. N. et al. Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina). **Braz J Biol**, v. 74, n. 1, p. 217-21, Feb 2014. ISSN 1678-4375. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25055105> >.

GRISOLIA, C. K. et al. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genet Mol Biol**, v. 32, n. 1, p. 138-43, Jan 2009. ISSN 1415-4757. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637659> >.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutat Res**, v. 491, n. 1-2, p. 39-44, Apr 2001. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287296> >.

GÜL, A. et al. Sublethal propoxur toxicity to juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758): biochemical, hematological, histopathological, and genotoxicity effects. **Environ Toxicol Chem**, v. 31, n. 9, p. 2085-92, Sep 2012. ISSN 1552-8618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22730006> >.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. **Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes**. American Fisheries Society Symposium: 51- 66 p. 1990.

HINTON, D. E. B., P. C. GARDNER, G. R. HAWKINS, W.; E. HENDRICKS, J. D. M., R. A. OKIHIRO. **Histopathologic Biomarkers**. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. J., H. R.; KIMERLI, R. A., et al. Boca Raton: Lewis Publishers: p. 155 – 196. p. 1992.

ILYINSKIKH, N. N.; ILYINSKIKH, E. N.; ILYINSKIKH, I. N. Micronucleated erythrocytes frequency and radiocesium bioconcentration in pikes (*Esox lucius*) caught in the Tom River near the nuclear facilities of the Siberian Chemical Complex (Tomsk-7). **Mutat Res**, v. 421, n. 2, p. 197-203, Nov 1998. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9852993> >.

KANG, N.; KANG, H. I.; AN, K. G. Analysis of fish DNA biomarkers as a molecular-level approach for ecological health assessments in an urban stream. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 93, n. 5, p. 555-60, Nov 2014. ISSN 1432-0800. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260997> >.

KIMBROUGH, R. D.; LINDER, R. E.; GAINES, T. B. Morphological changes in livers of rats fed polychlorinated biphenyls: light microscopy and ultrastructure. **Arch Environ Health**, v. 25, n. 5, p. 354-64, Nov 1972. ISSN 0003-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4346789> >.

KIRSCH-VOLDERS; M. **The CB in vitro micronucleus assay in human lymphocytes**. n. *Mutat. Res*, p. 1–2, 1997.

KLINGERMAN, A. **Fishes as biological detectors of the effects of genotoxic agents**. Academic Press, New York: Heddle JA (ed) Mutagenicity, new horizons in genetic toxicology 1982.

LEMOS, L. Z. **Avaliação do potencial de genotoxicidade e das alterações morfológicas 15 branquiais em espécimes de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characidae) 16 quando submetidos ao agrotóxico Dormex®**. Dissertação, Universidade Estadual de Maringá, PR.: 74p. p. 2016.

MAHROUS, K. F. et al. Inhibition of cadmium- induced genotoxicity and histopathological changes in Nile tilapia fish by Egyptian and Tunisian montmorillonite clay. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 119, p. 140-7, Sep 2015. ISSN 1090-2414. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26001163> >.

MAIER, D. et al. Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in wastewater, surface water, and sediments with effects in fishes. **Water Res**, v. 72, p. 127-44, Apr 2015. ISSN 1879-2448. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260601> >.

MARTINEZ, C. B.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 133, n. 1, p. 151-60, Sep 2002. ISSN 1095-6433 (Print) 1095-6433.

MIELE, A. **Efeito da cianamida hidrogenada na quebra de dormência das gemas, produtividade do vinhedo e composição química do mosto da uva Cabernet Sauvignon**. Brasília **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 26: 315-354 p. 1991.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. et al. **Avaliação da exposição humana a agrotóxicos**. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (org.). **É veneno ou é remédio?** Rio de Janeiro: Fiocruz 2003.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquat Toxicol**, v. 50, n. 1-2, p. 109-124, Aug 1 2000. ISSN 0166-445x.

PAWLOWSKI, J. et al. Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities. **Mol Ecol Resour**, v. 14, n. 6, p. 1129-40, Nov 2014. ISSN 1755-0998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24734911> >.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquat Toxicol**, v. 50, n. 1-2, p. 109-124, Aug 1 2000. ISSN 0166-445x.

PAWLOWSKI, J. et al. Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities. **Mol Ecol Resour**, v. 14, n. 6, p. 1129-40, Nov 2014. ISSN 1755-0998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24734911> >.

RAMÍREZ-DUARTE, W. F.; RONDÓN-BARRAGÁN, I. S.; ESLAVA-MOCHA, P. R. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*): **Pesq. Vet. Bras.** 28(11): 547-554 p. 2008.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTHY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. *In: G. M. Rand (ed.), Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.* Washington, DC. 1995.

SABRA, F. S.; MEHANA. Pesticides Toxicity in Fish with Particular Reference to Insecticides: *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences.* 03 2015.

SAMANTA, P. et al. Toxic effects of glyphosate-based herbicide, Excel Mera 71 on gill, liver, and kidney of *Heteropneustes fossilis* under laboratory and field conditions. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, v. 4, n. 3, p. 147-155, 2016. ISSN 2213-879X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213879X16000031> >.

SETTIMI, L. Update: hydrogen cyanamide-related illnesses--Italy, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 54, n. 16, p. 405-8, Apr 29 2005. ISSN 0149-2195.

SHESHADRI, S. H. et al. DORMEX-hydrogen cyanamide poisoning. *J Emerg Trauma Shock*, v. 4, n. 3, p. 435-7, Jul 2011. ISSN 0974-2700.

SIU, W. H. et al. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environ Toxicol Chem*, v. 23, n. 5, p. 1317-25, May 2004. ISSN 0730-7268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180386> >.

SOLTYS, D. et al. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta*, v. 234, n. 3, p. 609-21, Sep 2011. ISSN 1432-2048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21573814> >.

SUGG, D. W. et al. DNA damage and radiocesium in channel catfish from chernobyl. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 7, p. 1057-1063, 1996. ISSN 1552-8618. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620150706> >.

RAMÍREZ-DUARTE, W. F.; RONDÓN-BARRAGÁN, I. S.; ESLAVA-MOCHA, P. R. **Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachyomus*):** *Pesq. Vet. Bras.* 28(11): 547-554 p. 2008.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTHY, L. S. **Introduction to aquatic toxicology. *In: G. M. Rand (ed.), Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.*** Washington, DC. 1995.

SAMANTA, P. et al. Toxic effects of glyphosate-based herbicide, Excel Mera 71 on gill, liver, and kidney of *Heteropneustes fossilis* under laboratory and field conditions. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 3, p. 147-155, 2016. ISSN 2213-879X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213879X16000031> >.

SETTIMI, L. Update: hydrogen cyanamide-related illnesses--Italy, 2002-2004. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 54, n. 16, p. 405-8, Apr 29 2005. ISSN 0149-2195.

SHESHADRI, S. H. et al. DORMEX-hydrogen cyanamide poisoning. **J Emerg Trauma Shock**, v. 4, n. 3, p. 435-7, Jul 2011. ISSN 0974-2700.

SIU, W. H. et al. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. **Environ Toxicol Chem**, v. 23, n. 5, p. 1317-25, May 2004. ISSN 0730-7268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180386> >.

SOLTYS, D. et al. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. **Planta**, v. 234, n. 3, p. 609-21, Sep 2011. ISSN 1432-2048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21573814> >.

SUGG, D. W. et al. DNA damage and radiocesium in channel catfish from chernobyl. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 1057-1063, 1996. ISSN 1552-8618. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620150706> >.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology normal and pathological features. Kodansha, 1995.

TALUKDAR, B. et al. Evaluation of genetic toxicity caused by acid mine drainage of coal mines on fish fauna of Simsang River, Garohills, Meghalaya, India. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 131, p. 65-71, May 2016. ISSN 1090-2414. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27213561> >.

THOPHON, S. et al. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environ Pollut**, v. 121, n. 3, p. 307-20, 2003. ISSN 0269-7491 (Print) 0269-7491.

VAN NGAN, P. V. et al. **Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz," King George Island** *Polar Biology*: 209-217 p. 2007.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. et al. Avaliação da exposição humana a agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (org.). É veneno ou é remédio? Rio de Janeiro: Fiocruz 2003.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology normal and pathological features. Kodansha, 1995.

TALUKDAR, B. et al. Evaluation of genetic toxicity caused by acid mine drainage of coal mines on fish fauna of Simsang River, Garohills, Meghalaya, India. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 131, p. 65-71, May 2016. ISSN 1090-2414. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27213561> >.

THOPHON, S. et al. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ Pollut*, v. 121, n. 3, p. 307-20, 2003. ISSN 0269-7491 (Print)0269-7491.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, v. 13, n. 2, p. 57-149, Feb 2003. ISSN 1382-6689 (Print)1382-6689.

VAN NGAN, P. V. et al. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz," King George Island *Polar Biology*: 209-217 p. 2007.

VIARENGO, A. et al. A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian Sea (Italy). *Arch Environ Contam Toxicol*, v. 53, n. 4, p. 607-16, Nov 2007. ISSN 0090-4341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882475> >.

WALKER, C. H. *Principles of ecotoxicology*. London: Taylor & Francis. 1996.

