



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE ERITROCITÁRIA E
HISTOPATOLOGIA BRANQUIAL EM LAMBARIS (*Astyanax lacustris*)
EXPOSTOS AO INSETICIDA LAMBDA-CIALOTRINA**

Lidiane Cecilia Pereira

Dissertação apresentada à Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Zoologia Experimental Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Letícia Gediel Rivero-Wendt

CAMPO GRANDE, MS

JANEIRO, 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por nunca permitir que eu me perdesse e por me abençoar todos os dias! O que me faltou, Ele sempre me deu.

À família Fioravante, Carlitos, Lana e Ravi, que são meu alicerce, sempre me apoiando em todas as dificuldades.

Às minhas amigas do coração, Eloísa Luz e Taciana Noriko, por estarem do meu lado há tantos anos e por sempre me apoiarem e incentivarem a continuar essa jornada.

Ao meu orientador, Carlos Eurico dos Santos Fernandes, e à Prof.^a Alda Maria Teixeira Ferreira, pela oportunidade, carinho, orientação e paciência.

À minha coorientadora, Carla Letícia Gediel Rivero Wendt, por ter auxiliado na orientação do projeto.

Ao pessoal do LAPEX, Sté, Nath, Lucas, Brenda, Duda, André e Heloise.

Ao pessoal da Piscicultura, Gio Stringhetta, Rebeca Sousa e Lucas Brasileiro, pela ajuda e ensinamentos com o manejo dos alevinos.

Aos amigos que ganhei ao longo desses dois anos de mestrado e que quero guardar para a vida toda: Luana Garcia (Minha fiota), Bárbara Bazhuni (Barb), Diego Valuz (Di), Kélvyn Cavalcante (Kelvinho), Rafael Nunes (Rafito), Thais Sorrilha (Tata), Douglas Lopes e Vivian Nacagava.

Aos membros das bancas avaliadoras de projeto, qualificação e dissertação, que disponibilizaram tempo e dedicação para contribuir com o trabalho.

À Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, a qual agradeço a todos os professores pelos ensinamentos transmitidos durante essa trajetória, e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Por fim, sou grato à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001, cujo apoio, por meio da bolsa de estudos, foi essencial para a concretização deste mestrado.

Obrigada!

*“Não há nada que possa me impedir
De ser capaz ou ser forte o bastante
Errante é o passo que se limita a ser raso.”*

Guilherme de Sá (Íngreme)

RESUMO

PEREIRA, Lidiane C. **ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE ERITROCITÁRIA E HISTOPATOLOGIA BRANQUIAL EM LAMBARIS (*Astyanax lacustris*) EXPOSTOS AO INSETICIDA LAMBDA-CIALOTRINA**. 2024. 51f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2024.

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas globais e um grande consumidor de defensivos agrícolas. O uso de agrotóxicos aumentou significativamente de 2010 a 2020, superando o crescimento da área cultivada. Apesar da regulamentação, o manejo desses produtos químicos ainda apresenta desafios. A Anvisa proibiu certos pesticidas, potencialmente aumentando o uso de piretróides, considerados seguros por sua toxicidade seletiva, mas que podem contaminar ambientes aquáticos. A lambda-cialotrina (LC) é um inseticida piretróide utilizado no controle de pragas em ambientes agrícolas e domésticos. Embora seja menos tóxico para aves e mamíferos, sua introdução em ecossistemas aquáticos, que pode ocorrer principalmente através da deriva durante a pulverização, lixiviação, escoamento superficial e até por aplicação direta em corpos d'água, pode ser prejudicial para organismos não-alvo. Este estudo tem como objetivo principal avaliar os efeitos subletais da exposição ao inseticida piretróide lambda-cialotrina em *Astyanax lacustris*, utilizando marcadores genotóxicos e histopatológicos. Foram usados 80 espécimes juvenis de *A. lacustris* divididos em oito grupos experimentais. Quatro grupos, com dez indivíduos cada, foram expostos à concentração de 1,5 µg/L de LC por 1, 3, 6 e 12 dias. Para cada período, foram utilizados dez espécimes controle. Foram avaliados os efeitos genotóxicos com base na frequência de alterações nucleares e micronúcleos em eritrócitos, além da quantificação das alterações histopatológicas do tecido branquial. Os resultados mostraram elevação das anormalidades nucleares classificadas como binucleados e núcleos invaginados. Estas alterações foram mais frequentes nos peixes expostos por períodos de 1, 3 e 6 dias, em comparação com os não expostos. As lesões histológicas foram caracterizadas pela descamação do epitélio, edema nas lamelas secundárias, aderência lamelar, hiperplasia e hipertrofia das células de muco, aneurismas e, em casos mais severos (12 dias), fusão completa das lamelas secundárias. No geral, os resultados apontam que, a partir de três dias, a LC pode ser considerada tóxica para o *A. lacustris*. Nossos resultados demonstram a necessidade de biomonitoramento e avaliação dos riscos associados ao uso de inseticidas na agricultura, especialmente considerando os efeitos adversos em espécies não-alvo. Além disso, o *A. lacustris* pode ser incluído na lista de espécies bioindicadores visando futuros impactos ecotoxicológicos de inseticidas piretróides, destacando o emprego de novas estratégias de conservação e gestão ambiental para mitigar a exposição a contaminantes e preservar a biodiversidade regional.

Palavras-chave: Genotoxicidade. Histopatologia. Piretróide. Peixe.

ABSTRACT

PEREIRA, Lidiane C. **ANALYSIS OF ERYTHROCYTE GENOTOXICITY AND GILL HISTOPATHOLOGY IN *ASTYANAX LACUSTRIS* EXPOSED TO THE INSECTICIDE LAMBDA-CYHALOTHRIN**. 2024. 51f. Dissertation (Master's in Animal Biology) – Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, 2024.

Brazil is a major global agricultural producer and consumer of pesticides. The use of pesticides has significantly increased from 2010 to 2020, outpacing the growth in cultivated areas. Despite regulations, managing these chemicals still presents challenges. The Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa) has banned certain pesticides, potentially increasing the use of pyrethroids, which are considered safe due to their selective toxicity but can contaminate aquatic environments. Lambda-cyhalothrin (LC) is a pyrethroid insecticide widely used in agricultural and domestic pests. While it is less toxic to birds and mammals, its introduction into aquatic ecosystems can harm non-target organisms. It can occur mainly through drift during spraying, leaching, surface runoff, and even direct application to water bodies. The primary aim of this study was to assess the sublethal effects of exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin on *Astyanax lacustris*, using genotoxic and histopathological markers. Eighty juvenile specimens of *A. lacustris* were divided into eight experimental groups, with four groups exposed to a concentration of 1.5 µg/L of LC for 1, 3, 6, and 12 days, respectively. Ten specimens were used for each period. The study evaluated the genotoxic effects by analyzing the frequency of nuclear alterations and micronuclei in erythrocytes, as well as quantifying histopathological alterations in gill tissue. The results indicate an increase in nuclear abnormalities, specifically binucleated and invaginated nuclei, in fish exposed for 1, 3, and 6 days compared to those not exposed. Histological lesions were observed, including desquamation of the epithelium, edema in the secondary lamellae, lamellar adhesion, hyperplasia, hypertrophy of the mucus cells, aneurysms, and complete fusion of the secondary lamellae in more severe cases (12 days). The results suggest that the sublethal concentration of LC is toxic to *A. lacustris* from three days onwards. The results indicate the necessity of agricultural bio-monitoring and risk assessment when using insecticides, mainly due to the negative impact on non-target aquatic species. Additionally, *A. lacustris* may be included in the list of bioindicator species for future ecotoxicological impacts of pyrethroid insecticides. This highlights the need for new conservation and environmental management strategies to reduce contaminant exposure and preserve regional biodiversity.

Keywords: Genotoxicity. Histopathology. Pyrethroid. Fish.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 Inseticidas piretróides	9
2.2 O uso de piretróides no Brasil	10
2.3 Lambda-cialotrina.....	11
2.4 <i>Astyanax lacustris</i> como bioindicador ambiental	12
2.5 Biomarcadores em peixes.....	13
2.5.1 Alterações nucleares eritrocitárias	14
2.5.2 Teste de micronúcleo.....	15
2.5.3 Histopatologia branquial.....	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Local de estudo e amostragem	19
4.2 Grupos experimentais e bioensaio	19
4.3 Colheita de sangue, ensaios de anormalidades nucleares eritrocitárias e teste de micronúcleo.....	20
4.4 Análise histológica.....	20
4.5 Análise estatística	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Alterações nucleares	23
5.2 Análise histológica.....	26
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

O constante aumento populacional demanda a necessidade de expansão da produção alimentícia, sendo necessário o emprego de ferramentas que contribuam para a otimização da agricultura, como o uso de agrotóxicos. Também são conhecidos como inseticidas, pesticidas, produtos fitossanitários, defensivos agrícolas ou praguicidas e desempenham um papel crucial na agricultura do Brasil, contribuindo significativamente para a manutenção de níveis de produção elevados (PEREIRA; CORRÊA, 2018). Esses produtos, por vezes considerados símbolos do progresso agrícola, são utilizados com o objetivo de controlar pragas, plantas daninhas e microrganismos prejudiciais, responsáveis por causar danos econômicos e reduzir a eficiência das plantações e criações (FERREIRA, 2014).

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores agrícolas do mundo, ocupando a posição de segundo maior exportador mundial de *commodities* agropecuárias, como soja, algodão e cana-de-açúcar (BRAGA *et al.*, 2020). Além disso, figura entre os principais consumidores globais de defensivos agrícolas. No período entre 2010 e 2020, houve um aumento de 78,3% na quantidade de agrotóxicos comercializados no Brasil, uma taxa quase três vezes maior do que o crescimento da área cultivada no país, que foi de 27,6% (HESS; NODARI, 2022). Esse significativo aumento no consumo de agrotóxicos não correspondeu a um crescimento equivalente na produção agrícola brasileira. Sugerindo assim, uma maior utilização desses produtos por área cultivada, incluindo um aumento na frequência de aplicação e no uso de misturas de pesticidas.

As normativas de segurança para o uso de agrotóxicos no Brasil estão estabelecidas por diversas legislações e diretrizes, como a Lei nº 14.785 de 2023 (BRASIL, 2023), o Decreto nº 4.074 de 2002 (BRASIL, 2002), a Norma Regulamentadora nº 31, emitida pelo Ministério do Trabalho e Emprego (BRASIL, 2005b), e o Código Internacional de Conduta para a Distribuição e Uso de Agrotóxicos, implementado pelo Decreto nº 5.360 de 2005 (BRASIL, 2005a). Estes documentos delineiam as obrigações dos governos federal, estadual e municipal, bem como dos empregadores, no que se refere ao cumprimento e à supervisão das medidas de segurança para preservar a saúde (RISTOW *et al.*, 2020).

Apesar da regulamentação para controlar o uso de agrotóxicos no Brasil, ainda existem carências em relação ao uso e manejo desses produtos químicos no país (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; LOPES, 2017; MORELLO *et al.*, 2019). Nos últimos anos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) banuiu diversos ingredientes

ativos de pesticidas no Brasil, incluindo os organofosforados monocrotofós, triclorfom e metamidofós, além dos organoclorados lindano e pentaclorofenol (ANVISA, 2022). Essas medidas podem levar a um aumento no uso de outros tipos de inseticidas, como os piretróides.

Os piretróides, uma classe importante de inseticidas, surgiram na década de 1920 com o estudo do *pyrethrin*, extraído da planta de piretro. O primeiro pesticida piretróide identificado foi o *allethrin*, em 1949. A partir da década de 1970, eles começaram a ser amplamente utilizados na agricultura devido à sua alta eficácia, potência, ação rápida e toxicidade seletiva (AZNAR-ALEMANY; ELJARRAT, 2020). São conhecidos pelo uso no controle de insetos e pragas, e considerados seguros devido à sua toxicidade seletiva, sendo eficazes contra insetos, mas relativamente inofensivos para mamíferos e aves (HAVERIN; VORNANEN, 2014).

Dentre os diversos grupamentos químicos sintéticos classificados como piretróides, destaca-se a lambda-cialotrina (LC), considerado altamente tóxico para organismos aquáticos e enquadrado na classe toxicológica II. É um produto registrado e comumente utilizado no Brasil em culturas variadas como algodão, amendoim, arroz, soja e milho (ANVISA, 2023). Os piretróides podem entrar no ambiente aquático durante o uso agrícola, através da deriva durante os procedimentos de pulverização, lixiviação, escoamento superficial e por pulverização direta de corpos d'água (MURANLI; GÜNER, 2011; ULLAH *et al.*, 2019), expondo a comunidade de organismos aquáticos, incluindo os peixes, aos efeitos potencialmente deletérios desses compostos.

Embora não existam dados específicos sobre a presença de LC nas águas brasileiras ou regulamentações acerca de limites máximos permitidos para diferentes categorias em corpos d'água, já se identificou o inseticida em sedimentos de ambientes agrícolas na Costa Rica, atingindo concentrações de 0,98 µg/g (CARAZO-ROJAS *et al.*, 2018). Em águas superficiais, a presença de LC foi detectada variando de 0,35 µg/L em rios gregos a 0,80 µg/L em zonas agrícolas no sul dos Estados Unidos da América (ANDERSON *et al.*, 2013).

Bioindicadores são utilizados para monitorar a qualidade da água, sendo particularmente úteis na detecção precoce do potencial tóxico de agentes químicos e na compreensão dos seus mecanismos de ação (PRESTES; VINCENCI, 2019). Os peixes, por serem elementos característicos e importantes nos ecossistemas aquáticos, são considerados bons bioindicadores. Eles refletem as alterações no ambiente aquático em diversas escalas, graças às suas características de mobilidade e posição próxima ao topo da cadeia alimentar (NUNES; JESUS, 2019).

Os peixes exibem modificações em suas estruturas quando expostos a agentes tóxicos em doses subletais. Essa capacidade de responder a estressores ambientais é uma característica crucial de um organismo saudável, uma vez que as reações a esses estímulos são fundamentais para a sobrevivência e adaptação às variações do ambiente (FREITAS; SIQUEIRA-SOUZA, 2009). Por outro lado, a utilização de espécies nativas em testes de toxicidade é de extrema importância devido sua relevância ecológica e sensibilidade específica às condições ambientais locais. Essas espécies desempenham um papel fundamental no ecossistema nativo, refletindo com maior precisão os impactos ambientais reais na região (FRANCISCO *et al.*, 2019). Portanto, a análise da toxicidade em espécies nativas é essencial para a preservação da biodiversidade regional, contribuindo para manter a integridade ecológica.

Os resultados desses testes de toxicidade fornecem informações valiosas para estratégias de conservação e gestão ambiental, orientando medidas que visam reduzir a exposição a contaminantes e restaurar *habitats* afetados (DOURADO *et al.*, 2017). Além do mais, a variação genética característica dessas espécies, resultado dos longos períodos de adaptação local, oferece percepções importantes sobre como elas respondem ao estresse ambiental. Isso reforça ainda mais a relevância desses testes para uma compreensão abrangente e aplicável dos impactos ambientais dos contaminantes em ecossistemas específicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INSETICIDAS PIRETRÓIDES

Os inseticidas piretróides são compostos sintéticos derivados das piretrinas, extraídas das cabeças das flores secas do crisântemo, da espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium* (FEO, 2020). A partir da década de 1970, os piretróides evoluíram de produtos domésticos simples para desempenhar um papel essencial no controle de pragas na agricultura, oferecendo uma alternativa mais segura em comparação com os pesticidas organofosforados e organoclorados, que frequentemente apresentam elevada toxicidade e persistência no meio ambiente (LI *et al.*, 2022; MILANI *et al.*, 2022).

Com a proibição ou restrição do uso de inseticidas organofosforados inibidores da colinesterase, como clorpirifós e diazinon, a utilização dos piretróides aumentou consideravelmente, representando atualmente 25% das vendas globais de inseticidas (AZNAR-ALEMANY; ELJARRAT, 2020; WERNER; YOUNG, 2018). As piretrinas foram amplamente utilizadas como agentes de combate a insetos. Entretanto, esses compostos demonstravam grande instabilidade à luz e exposição ao ar, o que levou à necessidade de desenvolver compostos sintéticos com maior estabilidade (SANTOS; AREAS; REYES, 2007; MORAES *et al.*, 2015). Desta forma, a classe dos piretróides foi segmentada em dois grupos: o grupo I, que não contém o segmento α -ciano, como no caso da bifentrina, permetrina e resmetrina; e o grupo II, que incorpora o segmento α -ciano em sua composição, incluindo a deltametrina, cipermetrina, lambda-cialotrina e ciflutrina. A inclusão do grupo ciano está relacionado a maior fotoestabilidade e lipofilicidade, conferindo aos piretróides do grupo II maior potência e neurotoxicidade em vertebrados e invertebrados quando comparados aos do grupo I (AZNAR-ALEMANY; ELJARRAT, 2020; HOLLAND, 2015).

As formas mais eficazes para a utilização de inseticidas como a LC se dão pela pulverização em coluna ou pulverização aérea diretamente sobre as folhas na plantação (FIORIN *et al.*, 2011) e também pela aplicação direta no solo (SCORZA JÚNIOR, 2006). Dessa forma, as principais vias de introdução dos piretróides nos ecossistemas aquáticos envolvem a dispersão proveniente da aplicação de pesticidas por via aérea ou terrestre, tanto em ambientes rurais quanto urbanos, o escoamento decorrente de precipitações, a liberação deliberada de efluentes agrícolas e a introdução de águas residuais provenientes de áreas urbanas (WERNER; YOUNG, 2018). A presença de piretróides nos ecossistemas aquáticos dulcícolas tornou-se um problema mundial (STEHLE; SCHULZ, 2015) e

seu uso indiscriminado pode impactar significativamente o equilíbrio do meio ambiente, tornando imprescindível o monitoramento desses compostos por meio da análise de seus resíduos e efeitos (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001; PIMPÃO, 2006).

Peixes são considerados organismos não-alvo quanto ao emprego dos piretróides. Seus efeitos têm sido associados a uma variedade de alterações biológicas, além de desencadear alterações morfofuncionais em diversos tecidos (CENGIZ, 2006; MURANLI; GÜNER, 2011; KAN *et al.*, 2012). De acordo com Viran *et al.* (2003), devido à sua característica lipofílica, os piretróides apresentam uma notável capacidade de serem absorvidos rapidamente pelas brânquias dos peixes, contribuindo para a alta sensibilidade desses animais à exposição aos piretróides aquosos. Além disso, os peixes parecem possuir uma deficiência no sistema enzimático responsável por hidrolisar esses compostos. No entanto, é relevante destacar que, apesar de serem moléculas de baixa polaridade, eles não têm tendência a se acumularem nos tecidos dos animais, com exceção do tecido adiposo (SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

2.2 O USO DE PIRETRÓIDES NO BRASIL

Em 2021, o Brasil foi o maior consumidor mundial de pesticidas, com um total de 720.000 toneladas para uso agrícola, um valor quase 60% superior ao segundo colocado (Estados Unidos da América, com 457.000 toneladas). Nos números de aplicações de pesticidas por área de cultivo, o Brasil também ocupa a primeira colocação, com 10,9 kg/ha, cerca de duas vezes maior que a Argentina (5,6 kg/ha), segunda colocada (FAO, 2023).

O Ministério da Saúde utiliza piretróides no país desde 1996 (SANTOS *et al.*, 2007) em campanhas de saúde pública, onde atuam no controle de vetores em ambientes domésticos e na desinsetização de residências. No Brasil, os piretróides são autorizados para aplicação na agricultura (no solo, nas folhas e sementes, bem como para fins de armazenamento), como conservantes de madeira e para jardinagem. Na medicina veterinária, são encontrados em formulações comerciais, como xampus para animais de estimação, para o controle de ectoparasitas, principalmente carrapaticidas para grandes ou pequenos animais (PARANÁ, 2018; WERNER; YOUNG, 2018; ANVISA, 2023).

Na aquicultura, os piretróides têm sido empregados para combater parasitas de peixes e insetos que infectam os tanques de produção (BURRIDGE *et al.*, 2010; VAN GEEST; BURRIDGE; KIDD, 2014). No Brasil, a utilização dos piretróides na aquicultura para o controle de ectoparasitos em criações comerciais de peixes não é regulamentada, ao contrário de países como Noruega, Irlanda e Escócia, onde esses produtos são

permitidos e registrados para essa finalidade. Dado que doenças e parasitoses são fatores que impactam significativamente na produção de peixes e considerando que ainda são limitadas as fiscalizações e informações disponíveis para o uso de químicos no manejo, muitos produtos utilizados no controle de doenças na agricultura e em outros animais, acabam sendo aplicados no tratamento de peixes, como os inseticidas piretróides, que se tornam uma alternativa viável nesse cenário (MORAES *et al.*, 2015). No entanto, os piretróides são bastante tóxicos para organismos não-alvo, mesmo em baixas concentrações (VIRAN *et al.*, 2003; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Invertebrados aquáticos e peixes são particularmente sensíveis aos efeitos neurotóxicos desses inseticidas quando presentes em corpos d'água (CENGIZ; UNLU, 2006).

2.3 LAMBDA-CIALOTRINA

Com base no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura e Pecuária, atualmente, o Brasil conta com o registro de 164 compostos piretróides destinados a formulações comerciais. Dentre eles, destaca-se a LC como o piretróide do tipo II que detém o maior número de registros, totalizando 41 em sua lista. O que representa 25% do total de compostos piretróides registrados no país (MAPA, 2023). A Anvisa regulamenta o uso da LC em várias culturas, incluindo algodão, amendoim, arroz, batata, soja, trigo, milho, feijão e muitas outras (ANVISA, 2023). No entanto, apesar das diretrizes regulatórias estabelecidas, a LC é um piretróide frequentemente utilizado de maneira irregular no Brasil, conforme relatado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em seu Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (MORAES *et al.*, 2015; ANVISA, 2023b).

A LC, nomenclatura IUPAC [cyano-(3-phenoxyphenyl) methyl] (1R,3R) -3-[(Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl] -2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate (IBAMA, 2019), é um piretróide que atua no sistema nervoso central e exerce seu efeito inseticida principalmente por meio da interação com os canais de sódio nas membranas neuronais dos insetos. Essa alteração na permeabilidade dos canais de sódio leva a despolarização prolongada das membranas neuronais, resultando no aumento da excitação neuronal. Dessa forma, causa uma ativação repetitiva dos neurônios, resultando em paralisia muscular e, eventualmente, levando à morte do inseto (DONG *et al.*, 2014).

Juntamente com sua ampla utilização, há diversos relatos na literatura sobre sua toxicidade para organismos aquáticos, incluindo os peixes (BOWNIK; KOWALCZYK; BAŃCZEROWSKI, 2019; SALAKO *et al.*, 2020; EZENWOSU *et al.*, 2021). De acordo com Maund *et al.* (1998), a dose letal de LC que afeta 50% dos peixes em um período de 96

horas ($LC_{50}/96h$) varia de 0,078 $\mu\text{g/L}$ para a espécie *Leuciscus indus* até 2,3 $\mu\text{g/L}$ para *Poecilia reticulata*, demonstrando que estas espécies apresentam alta sensibilidade a este composto.

Segundo Alvim e Martinez (2019), há evidências de que a LC também pode atravessar a barreira hematoencefálica, permitindo sua entrada no sistema nervoso central. Estudos apontam para os efeitos neurotóxicos deste composto em diversos organismos. Por exemplo, observou-se variações na atividade da acetilcolinesterase (AChE) em *Oreochromis niloticus*, conforme indicado por Amin *et al.* (2023) e Fernandes *et al.* (2020). Além disso, Li *et al.* (2014) descreveram uma redução significativa dos níveis de colina e fosfato de colina no cérebro de *Carassius auratus*. Essas alterações sugerem alta neurotoxicidade da LC para essas espécies.

A toxicidade neurológica, reprodutiva e do desenvolvimento associada aos piretróides, como a LC, está intrinsecamente ligada ao estresse oxidativo. Esses pesticidas induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em várias espécies de peixes, afetando tecidos como brânquias, fígado e músculos. Esta ação resulta não apenas em alterações histopatológicas, mas também em peroxidação lipídica e danos ao DNA (ácido dioxirribonucleico), às proteínas e aos lipídios celulares. A exposição a esses piretróides também altera a atividade das enzimas antioxidantes, aumentando a vulnerabilidade dos peixes ao estresse oxidativo provocado por poluentes ambientais (YANG; LIM; SONG, 2020).

2.4 *ASTYANAX LACUSTRIS* COMO BIOINDICADOR AMBIENTAL

O peixe *Astyanax lacustris*, identificado popularmente como "lambari-do-rabo-amarelo" ou "piaba", é uma espécie que possui uma vasta distribuição geográfica, estendendo-se por todo o território nacional (COSTA *et al.*, 2023) e se destaca pela presença de uma mancha umeral preta oval horizontal e duas barras verticais marrons na região umeral. Sua coloração varia entre um padrão com o corpo claro e prateado, com pequenas manchas escuras formando faixas horizontais acima e abaixo da linha lateral, e um padrão com o corpo mais escuro, principalmente na região lateroventral, e manchas conspícuas formando faixas horizontais acima e abaixo da linha lateral. A intensidade das manchas e o número de listras podem variar independentemente do tamanho do indivíduo ou da área de ocorrência (LUCENA; SOARES, 2016). É caracterizado pela presença de nadadeiras pélvica, anal e caudal amareladas, as demais são hialinas ou levemente amareladas, características que lhe sugere o nome popular lambari da cauda amarela (LANGANI; RÊGO, 2014).

O lambari é de pequeno porte, com um ciclo de vida curto e fácil manejo (VALLADÃO; GALLANI; PILARSKI, 2018). Possui uma grande capacidade de adaptação a diferentes *habitats*, o que o torna um promissor candidato a bioindicador de ambientes de água doce (SILVA, 2021). Nos últimos anos, esta espécie tem sido reconhecida como um exemplo neotropical em vários estudos, incluindo seu papel na aquicultura (ABREU *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2022), reprodução (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2021; CHEHADE *et al.*, 2020) e ecotoxicologia (ASSIS *et al.*, 2021; GODOI *et al.*, 2020).

A utilização de espécies nativas, como o lambari, em estudos ecotoxicológicos tanto *in situ* quanto *ex situ*, possibilita uma representação mais precisa da sensibilidade dos organismos locais e das condições ambientais específicas. Resultando avaliações mais fidedignas do impacto de substâncias tóxicas no ecossistema (FREITAS; ROCHA, 2011).

Além da escassez de variedade de espécies empregadas em avaliações de toxicidade no Brasil, há uma demanda para substituição de organismos estrangeiros ou não nativos por aqueles de origem local, especialmente aqueles que habitam ambientes de água doce. Portanto, a maioria dos estudos concentra-se em espécies de crustáceos e peixes que não refletem adequadamente a diversidade de vida aquática existente no país (MARTINS; BIANCHINI, 2011).

Os bioindicadores são organismos selecionados como sentinelas capazes de responder a mudanças ambientais em diferentes níveis, abrangendo desde fatores celulares, fisiológicos, bioquímicos, genéticos e histológicos até variações no comportamento. Eles desempenham um papel crucial na detecção e avaliação dos efeitos dos estressores presentes no ambiente, que podem incluir poluentes, mudanças nas condições ambientais e outras perturbações (LIMA *et al.*, 2018). Um bioindicador ideal deve ser capaz de sobreviver em ambientes saudáveis, além de apresentar uma certa resistência ao contaminante ao qual está exposto (AKAISHI *et al.*, 2004). A utilização de indicadores em diferentes níveis de organização biológica fornece informações complementares essenciais para a análise de risco ecológico (ARIAS *et al.*, 2007).

2.5 BIOMARCADORES EM PEIXES

Os biomarcadores são respostas fisiológicas analisadas em bioindicadores e abrangem diversas medidas que fornecem informações sobre as funções normais ou patológicas dos organismos, bem como sobre os efeitos resultantes da exposição a um agente estressor. A toxicidade dos pesticidas impacta negativamente os parâmetros

bioquímicos, fisiológicos, reprodutivos, perfis imunológicos e induz alterações histopatológicas graves em vários tecidos dos peixes (ULLAH *et al.*, 2019; ROHANI, 2023).

Comumente, o estresse oxidativo é utilizado em avaliações de ecotoxicologia, sendo avaliado em termos de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou produção de radicais livres, aumento da peroxidação lipídica e atividades alteradas em resposta às enzimas antioxidantes. Esse estresse resulta em danos a nível celular, causando prejuízos aos processos das células (ULLAH *et al.*, 2018).

As alterações nos núcleos dos eritrócitos são consideradas biomarcadores de citotoxicidade e genotoxicidade (CANEDO *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2019; MITKOVSKA; CHASSOVNIKAROVA, 2020). Essas anormalidades compreendem alterações no arranjo da cromatina dentro do núcleo, deformação ou fragmentação do núcleo, bem como a formação de micronúcleos. Devido à notável sensibilidade aos xenobióticos, os eritrócitos de peixes são amplamente empregados com sucesso na avaliação do potencial genotóxico de poluentes e outros fatores ambientais adversos (WITESKA, 2013).

Vários estudos têm destacado a presença de anormalidades nucleares em eritrócitos como um meio de avaliar os impactos da contaminação ambiental (MAIER *et al.*, 2015; BOTELHO *et al.*, 2015; NAHAS *et al.*, 2017; CARAMELLO *et al.*, 2019; AMAEZE *et al.*, 2020; VIANA *et al.*, 2023). A correlação entre a frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares tem sido frequentemente observada, reforçando a utilidade dessas avaliações em estudos de genotoxicidade em peixes, conforme descrito por Çavas e Er-gene-Gözükara (2003).

Um outro biomarcador são as alterações histopatológica que constitui uma ferramenta importante para o estudo dos efeitos diretos e indiretos sobre os diferentes tecidos de um determinado bioindicador, decorrentes do contato com produtos químicos (RIBEIRO; NARCISO, 2016). Além disso, é interessante na detecção de efeitos agudos e crônicos em organismos aquáticos após a exposição a xenobióticos. Desempenha um papel crucial na identificação dos órgãos-alvo de toxicidade e auxilia no estudo dos mecanismos de ação envolvidos (MYERS *et al.*, 1998; TEH; ADAMS; HINTON, 1997; YANCHEVA *et al.*, 2016).

2.5.1 Alterações nucleares eritrocitárias

Os eritrócitos têm como principal finalidade o transporte de oxigênio, o qual é viabilizado pela quantidade de hemoglobina presente nessas células, substância responsável pelo transporte de gases como o oxigênio e o dióxido de carbono, e do mecanismo

de troca gasosa (FÁNGE, 1992). A maioria dos peixes teleósteos possui eritrócitos nucleados, assim como aves, répteis e anfíbios, diferentemente dos mamíferos. De formato ovoide ou elipsoide, achatado e biconvexo, os eritrócitos são uma ferramenta de grande relevância no diagnóstico de doenças e condições patológicas (FAZIO, 2019).

Dentro do conjunto de análises nucleares, a análise da morfometria dessas células desempenha um papel crucial em diversas investigações científicas (LAHNSTEINER, 2021) e pode fornecer informações sobre como o tamanho dessas células se adapta às condições fisiológicas, ambientais e aos diferentes hábitos alimentares (ACAR *et al.*, 2019). Tanto fatores internos como estresse relacionado ao manejo e transporte, bem como qualidade inadequada da água e altas densidades populacionais, podem levar a variações nos parâmetros morfométricos e nas análises hematológicas em geral (CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008).

Os mecanismos responsáveis pelo surgimento das alterações nucleares em eritrócitos ainda não foram totalmente desvendados. No entanto, um estudo realizado por Shimizu *et al.* (1998) sugere que quando uma região afetada é detectada pela célula, um processo de reparo ou eliminação da cromatina é iniciado. A porção afetada é então deslocada para a periferia do núcleo e eliminada por meio de exocitose. Durante esse processo de eliminação, a membrana nuclear pode apresentar imperfeições, resultando nas anormalidades nucleares observadas (SERIANI *et al.*, 2011).

As principais alterações nucleares foram delineadas por Carrasco, Tilbury e Myers (1990) e incluem: Brotamento nuclear (*Blebbed*), os quais são caracterizados por uma pequena "bolha" ou evaginação nuclear; núcleo lobulado (*Lobed*), que exibem projeções ou evaginações maiores, variando desde inchaços simples na superfície nuclear até a formação de múltiplos lóbulos; núcleo vacuolizado (*Vacuolated*), que apresenta uma cavidade bem definida desprovida de qualquer material visível; e invaginação nuclear (*Notched*), que contêm um entalhe bem definido. Os eritrócitos binucleados (*Binucleates*), também são uma alteração nuclear, onde a célula apresenta dois núcleos de mesma cor e foco (JINDAL; VERMA, 2015).

2.5.2 Teste de micronúcleo

Micronúcleo (MN) é um pequeno núcleo adicional ao citoplasma celular facilmente identificável por microscopia óptica. Durante as últimas décadas, tem sido amplamente utilizado como biomarcador de danos cromossômicos, instabilidade do genoma e quebras na estrutura do DNA (SAMANTA; DEY, 2012).

As alterações genéticas de um organismo exercem um impacto significativo nas populações, abrangendo todas as camadas da organização biológica, desde o nível molecular até o contexto de comunidades inteiras. Quando ocorrem modificações na estrutura do DNA, a viabilidade da espécie e sua eficiência reprodutiva podem ser profundamente influenciadas, ressaltando a importância da avaliação dos efeitos genotóxicos de poluentes em animais (SAMANTA; DEY, 2012). Atualmente, existem diversas metodologias disponíveis para a investigação desses efeitos, permitindo a análise de danos estruturais em níveis moleculares e celulares, incluindo a formação de adutos de DNA (SCHLENK *et al.*, 2008).

Segundo Cort e Ghisi (2014), o ensaio dos micronúcleos foi originalmente criado por Schmid (1975), utilizando células da medula óssea de camundongos, e posteriormente adaptado por Hoofman e Raat (1982) para a análise de células sanguíneas de peixes mantidos em condições laboratoriais, passando a ser conhecido como "Teste do Micronúcleo Písceo" ou "*Piscine Micronucleus Test*". Esse método permite a detecção e análise dos efeitos de substâncias que provocam quebras nos cromossomos ou uma segregação anormal desses componentes celulares. Sendo aplicado em amostras de sangue periférico de peixes teleósteos em estudos de campo e bioensaios (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Micronúcleos são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que apresentam um atraso em sua migração para os polos da célula durante a fase de anáfase. Esses fragmentos ou cromossomos não conseguem se ligar corretamente ao fuso mitótico e acabam sendo excluídos do núcleo principal, formando micronúcleos separados (AL-SABT; METCALFE, 1995; HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975).

A formação dessas anormalidades retrata um mecanismo pelo qual a célula elimina o material genético ampliado (SHIMIZU; SHIMUARA; TANAKA, 2000). A presença de micronúcleos nos eritrócitos de peixes expostos aos xenobióticos indicam a presença de substâncias clastogênicas e aneugênicas, que são capazes de induzir danos ao material genético desses organismos. Essas estruturas são resultantes da ação dessas substâncias, evidenciando os efeitos genotóxicos dos compostos (DEL-GUERCIO; CHRISTOFOLETTI; FONTANETTI, 2017).

Em um estudo de revisão conduzido por Canedo *et al.* (2021), que utilizou pesquisas com a espécie de peixe *Danio rerio*, observou-se que os herbicidas atrazina e ametrina, em concentrações de 0,1 a 2,0 µg/L durante 96 horas, bem como o organofosforado monocrotofós, induziram significativamente a formação de micronúcleos. Isso demonstra o potencial clastogênico desses pesticidas.

2.5.3 Histopatologia branquial

Na maior parte dos peixes teleósteos, as brânquias são constituídas por quatro arcos branquiais nos quais estão inseridas duas fileiras de filamentos branquiais ou lamelas primárias. Na porção interbranquial, localizam-se além dos capilares sanguíneos três tipos de células: as pavimentosas, as células de cloreto, responsáveis pelas trocas iônicas e as células mucosas, que desempenham a função de proteção das brânquias encarregadas pela produção de muco (CARROLA; RIBEIRO; PINTO, 2022). As brânquias são órgãos vitais nos peixes, e realizam diversas atividades fisiológicas importantes, incluindo trocas gasosas, equilíbrio iônico e excreção. Sua constante exposição ao ambiente aquático e sua ampla superfície tornam as brânquias dos peixes suscetíveis aos efeitos da poluição (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994; ROHANI, 2023). O tecido branquial desempenha um papel crucial na respiração através de um sistema de contracorrente circulatório, além de auxiliar no equilíbrio do pH orgânico. O oxigênio presente na água é extraído e transferido para o sangue que circula nas lamelas branquiais. Esse processo assegura uma alta eficiência na utilização do oxigênio dissolvido na água (HUGHES, 1966).

As brânquias constituem-se em um órgão primário para o estudo das respostas adaptativas ou lesivas frente as condições ambientais desfavoráveis do ambiente aquático (PERRY; LAURENT, 1993; SACHI *et al.*, 2021). As lesões branquiais são frequentemente investigadas em peixes coletados em ambientes naturais poluídos ou estudos controlados, a fim de se avaliar as mudanças do ecossistema aquático. Além disso, também são realizados estudos em peixes expostos a substâncias específicas para validar essas lesões como biomarcadores de efeito (CANTANHÊDE *et al.*, 2014).

Alterações histológicas no tecido das brânquias de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), expostos a uma concentração subletal de 0,86 µg/L de LC, foram descritas por Fernandes *et al.* (2020). Em 96 horas de exposição, alguns espécimes apresentaram lesões como proliferação epitelial lamelar associadas a necrose, aumento da espessura do epitélio lamelar primário e fusões lamelares secundárias focais. Hiperplasia e hipertrofia de células mucosas foram relatadas em todos os períodos, embora a ocorrência dessa alteração tenha sido maior a partir de 168 horas de exposição. Velmurugan *et al.* (2007) identificou alterações histológicas nos tecidos branquiais de *Cirrhinus mrigala* sob a influência da LC, incluindo a ocorrência de aneurismas, necrose epitelial, descamação, aumento da espessura epitelial, edema, encurtamento das lamelas secundárias, fusão lamelar e hiperplasia epitelial. Essas alterações foram observadas em exposições às concentrações de 0,3 e 0,6 partes por bilhão (ppb).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos subletais da exposição ao piretróide LC em *Astyanax lacustris*, utilizando marcadores genotóxicos e histopatológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a resposta de grupos submetidos a diferentes períodos de exposição à LC, utilizando biomarcadores genotóxicos e histológicos em peixes da espécie *A. lacustris*;
- Descrever e quantificar alterações histopatológicas do tecido branquial de *A. lacustris* sob condições de exposição à LC aguda e crônica; e
- Avaliar os efeitos genotóxicos do piretróide LC, com base na frequência de anormalidades nucleares e micronúcleos em eritrócitos de peixes *A. lacustris* submetidos a uma concentração subletal do composto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

O estudo foi conduzido no setor de piscicultura da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS/FAMEZ) e no Laboratório de Patologia Experimental (Lapex), no Instituto de Biociências (Inbio). Foram utilizados 80 espécimes juvenis de *Astyanax lacustris* de ambos os sexos (sem registro da proporção sexual), mesma desova, com peso de $3,52 \pm 1,44$ g, tamanho de $6,65 \pm 0,95$ cm e fornecidos por um produtor local credenciado (Grupo Acorci Piscicultura). Inicialmente os peixes foram aclimatados por 30 dias em uma caixa de polietileno com capacidade de 500 L, com renovação parcial diária de 30% da água e sistema de aeração artificial com bomba de recirculação. A alimentação foi realizada uma vez ao dia com ração extrusada 1,7 mm (AcquaLine/Supra Juvenil) com 46% de teor proteico. Os parâmetros de qualidade da água como temperatura ($23,6 \pm 1$ °C), oxigênio ($7,52 \pm 1,23$ mg/L) e pH ($6,39 \pm 0,96$) foram acompanhados a cada 24 horas através de medidor multiparâmetro Sanxin – Modelo SX751A, além da realização de testes rápido (Labcon Test) para o controle de amônia, nitrito e nitrato. Os procedimentos do presente estudo estão em concordância com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Protocolo nº 1.211/2022).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E BIOENSAIO

Após o período de aclimação, os peixes foram divididos em grupos de dez espécimes cada, sendo alojados em caixas de polietileno com capacidade para 30 litros de água declorada, fornecida pela concessionária local. Eles foram expostos a uma concentração subletal de $1,5\mu\text{g/L}$ de LC, conforme a LC_{50} previamente estabelecida por Silva (2021). Os grupos foram categorizados conforme o tempo de exposição: 1 dia (24 horas), 3 dias (72 horas), 6 dias (144 horas) e 12 dias (288 horas). A cada 24 horas, os peixes eram transferidos, para novas caixas com água limpa e declorada, já preparadas com a dose predeterminada de LC, a fim de manter a concentração constante. O produto químico em estudo não provocou alterações nas características físico-químicas do sistema, incluindo a temperatura, o oxigênio dissolvido e o pH.

Para o grupo controle de cada tempo de exposição, 10 espécimes foram separados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura, aeração e alimentação. De forma similar, a cada 24 horas, esses peixes eram transferidos, para caixas com água

100% renovada e sem cloro, a fim de replicar as mesmas condições de possível estresse do grupo tratado causado pela troca de caixas.

Todos os grupos eram alimentados uma vez por dia e mantidos sob um fotoperíodo de 12 horas, com aeração constante através de uma bomba de recirculação, controle de temperatura e proteção com tela antifuga de material sintético.

4.3 COLHEITA DE SANGUE, ENSAIOS DE ANORMALIDADES NUCLEARES ERITROCITÁRIAS E TESTE DE MICRONÚCLEO

Após cada período de exposição, todos os espécimes foram anestesiados com eugenol (50 mg/L) (VIDAL *et al.*, 2008), e realizada a transecção do pedúnculo caudal e grandes vasos para colheita de sangue periférico em uma micropipeta previamente banhada em EDTA 3%. Posteriormente, foram confeccionadas 3 (três) extensões sanguíneas para cada peixe para os ensaios de micronúcleo e anormalidades nucleares.

As extensões em lâmina foram coradas por May-Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW), seguindo o procedimento descrito por Ayllon e Garcia-Vazquez (2000, 2001) e Rodriguez-Cea, Ayllon e Garcia-Vazquez (2003).

Após a montagem das lâminas (Entellan Merck®), foi realizada a contagem de 1000 eritrócitos de cada indivíduo, em microscopia de campo claro (1000x de magnitude) e a classificação das alterações nucleares nas variações: eritrócitos binucleados, núcleos invaginados, brotamento nuclear, núcleos vacuolizados e núcleos lobulados, de acordo com Carrasco, Tilbury e Myers (1990) e Cestari (2014), conforme Figura 1.

Para a realização do teste de micronúcleo, sob uma abordagem de estudo duplo cego, foram analisados núcleos de 3000 eritrócitos de cada indivíduo, divididos em 1000 células por lâmina de acordo com Rocha, Deutschmann e Hollert (2020). A análise foi conduzida em microscopia de campo claro com 1000x de magnitude, seguindo a classificação proposta por Fenech (2000). Os critérios de inclusão utilizados para pontuar micronúcleos foram os seguintes: 1) o micronúcleo deve estar separado e apresentar a mesma coloração do núcleo principal; 2) o tamanho do micronúcleo deve ser menor que 1/3 do núcleo principal; e 3) o micronúcleo não deve ser refrativo, isto é, não deve exibir características ópticas diferentes das do núcleo principal (Figura 1f).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a colheita do sangue, os espécimes foram eutanasiados conforme Conceia (2018) e, em seguida, fixados em solução de Davidson por 24 horas, de acordo com as

técnicas de Fournie, Krol e Hawkins (2000), após a separação da cabeça e corpo. A seguir, foi realizada a disjunção dos arcos branquiais, e transferidos para uma solução de EDTA 10%, onde permaneceram por um período mínimo de 4 dias para descalcificação. Em seguida, os tecidos foram submetidos a desidratação em concentrações crescentes de álcoois, diafanização em xilol, impregnados e incluídos em Paraplast (Sigma Aldrich®). Os cortes foram realizados em um micrótomo (KEDEE® modelo KD-3358) com a espessura de 5 µm e corados com hematoxilina e eosina (LUNA, 1968, *apud* CANTANHÊDE *et al.*, 2014) para descrição histológica.

As análises histopatológicas foram conduzidas em microscopia de campo claro, seguindo a classificação estabelecida por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e Bernet *et al.* (1999). O grau de alteração observado levou em consideração as características da reação padrão (a), bem como seu grau de reversibilidade (w). A Tabela 1 apresenta as alterações histológicas nas brânquias, juntamente com seus graus de reversibilidade. Para estimar o índice de alterações histológicas (IAH), utilizamos a seguinte equação:

$$IAH = \sum alt (a \times w)$$

Onde 'a' representa a distribuição do dano (0 - ausente, 1 - menor, 2 - moderado/focal, 3 - severo/difuso) e 'w' representa o grau de reversibilidade do dano (1 - facilmente reversível, 2 - alterações moderadas com provável reversão após exposição, 3 - alterações irreversíveis).

Tabela 1. Alterações histológicas branquiais de acordo com o grau de reversibilidade. 1. Lesões reversíveis; 2. Parcialmente reversíveis; e 3. Lesões não reversíveis.

Alterações Histológicas	Grau
Hipertrofia e Hiperplasia epitélio lamela primária	1
Descamação epitélio lamela secundária	1
Espessamento epitélio lamela primária	1
Proliferação celular epitelial	1
Hiperplasia de células de muco	1
Hipertrofia de células de muco	1
Hemorragia	1
Edema lamelas secundárias	1
Aneurisma	1
Hiperemia	1

Ruptura epitélio lamelar secundário	2
Fusão de lamelas secundárias	2
Aderência lamelar secundária	2
Fusão completa de lamelas secundárias	2
Cistos parasitários	3
Necrose	3

Fonte: Elaborada pela autora com base em Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e Bernet *et al.* (1999)

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes as anormalidades dos núcleos eritrocitários (AN) e índice de alterações histológicas (IAH) foram comparados entre os grupos controle e tempos de exposição, pela análise de variância não paramétrica (ANOVA) modelo de Kruskal-Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952), com comparações *pairwise* pelo teste de Mann-Whitney (U). As alterações nucleares e a prevalência das lesões teciduais de acordo com o grau de reversibilidade (w_1 , w_2 e w_3) foram analisadas por um modelo multivariado de análise de componentes principais (PCA - *Principal Components Analysis*) com método de correlação entre tempos de expostos. Os *softwares* PAST (Hammer & Harper, Oslo/SW) e GraphPrism 8.0 (San Diego, CA, USA) foram utilizados para as estas análises.

5. RESULTADOS

5.1 ALTERAÇÕES NUCLEARES

Após a realização das análises e contagem dos eritrócitos, foram identificadas as seguintes alterações nucleares: eritrócitos binucleados, núcleos invaginados, brotamento nuclear, núcleo vacuolizado e núcleos lobulados. A representação morfológica dessas anormalidades está exemplificada na Figura 1.

Os resultados dessas análises podem ser observados na Figura 2a, que compara os indivíduos controle (não expostos) com os indivíduos expostos a concentração de 1,5 µg/L de LC em diferentes tempos de exposição. Para as anormalidades nucleares, os resultados indicaram uma frequência maior de alterações nucleares eritrocitárias nos indivíduos expostos à LC nos períodos de 1, 3 e 6 dias. Para os micronúcleos, a diferença foi observada no total de espécimes expostos (Figura 2b).

A análise dos componentes principais para a distribuição das anormalidades e micronúcleos entre grupos (controle e expostos) reteve 73,8% da variância, conforme Figura 3. Para o conjunto CP1, núcleos lobulados (LOB), brotamentos nucleares (BLEB) e núcleos invaginados (NOT) foram os mais representativos (0.88, 0.79 e 0.76, respectivamente). Para o conjunto CP2, foram os núcleos vacuolizados (VAC) e os eritrócitos binucleados (BIN), com -0.71 e 0.70, respectivamente. Todas as anormalidades foram mais evidentes a partir de 3 dias de exposição.

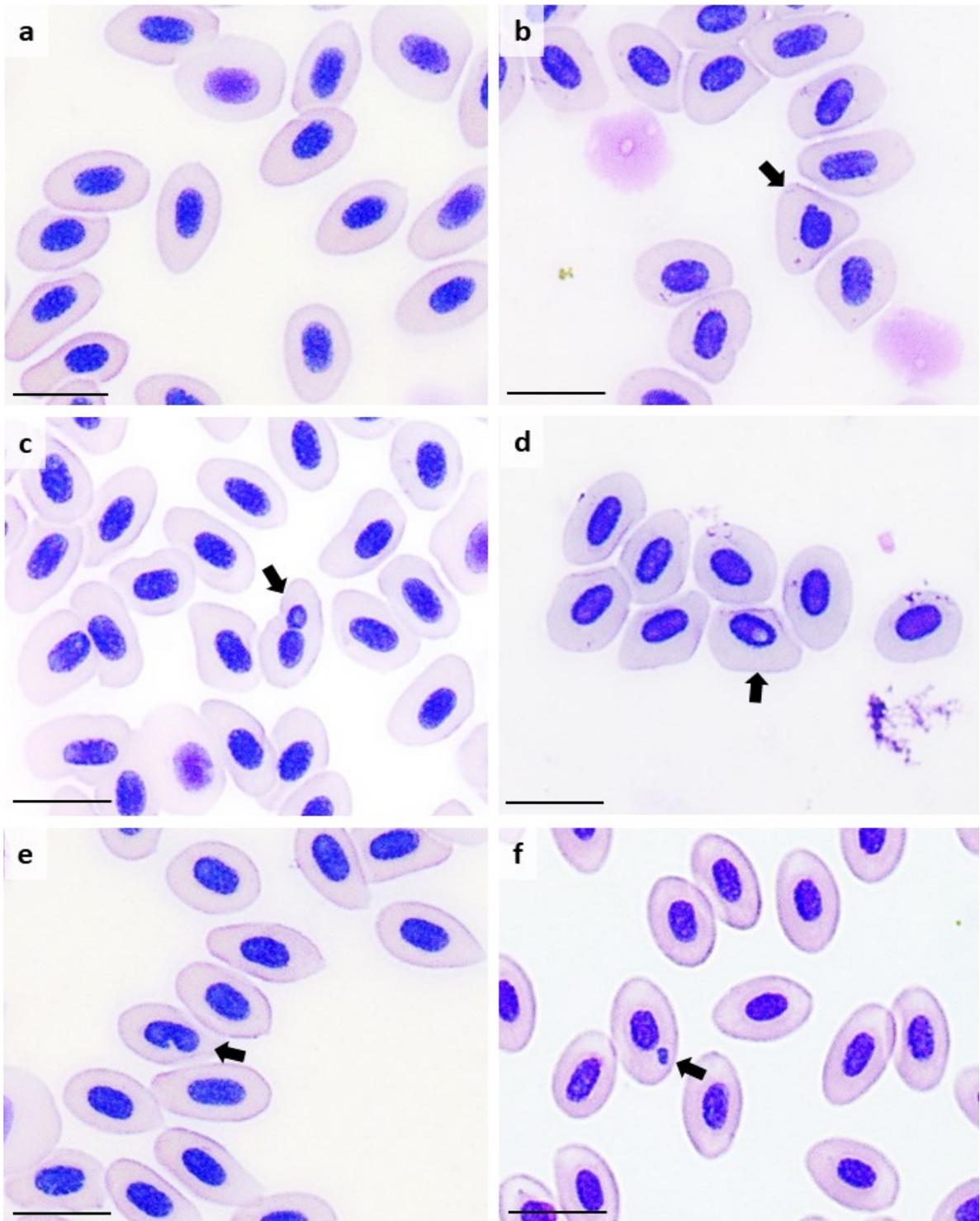


Figura 1. Fotomicrografia de eritrócitos de *Astyanax lacustris* expostos a concentração de 1,5 µg/L de lambda-cialotrina em lâminas coradas com Giemsa. Alterações nucleares. **a)** Eritrócitos normais. **b)** Brotamento nuclear (*bebbled*). **c)** Eritrócito binucleado. **d)** Núcleo vacuolizado. **e)** Núcleo invaginado (*notched*) e **f)** Eritrócito micronucleado. Escala em 10 µm.

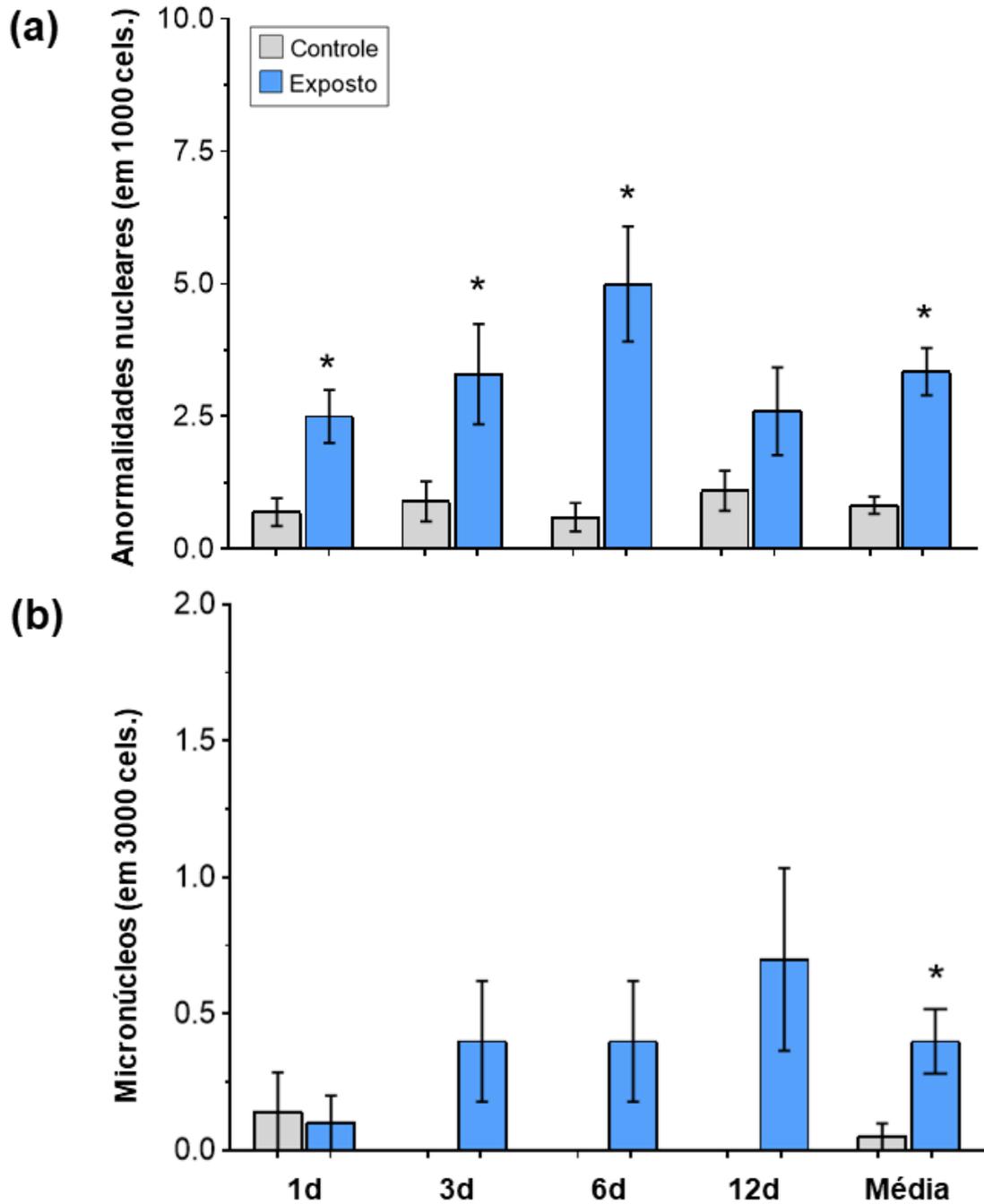


Figura 2. Média e erro padrão da média (\pm epm) das anormalidades nucleares eritrocitárias (a) e micronúcleos (b) observados em *Astyanax* expostos a 1,5 $\mu\text{g/L}$ de lambda-cialotrina. * representa diferença ($p < 0,05$) entre controles e expostos.

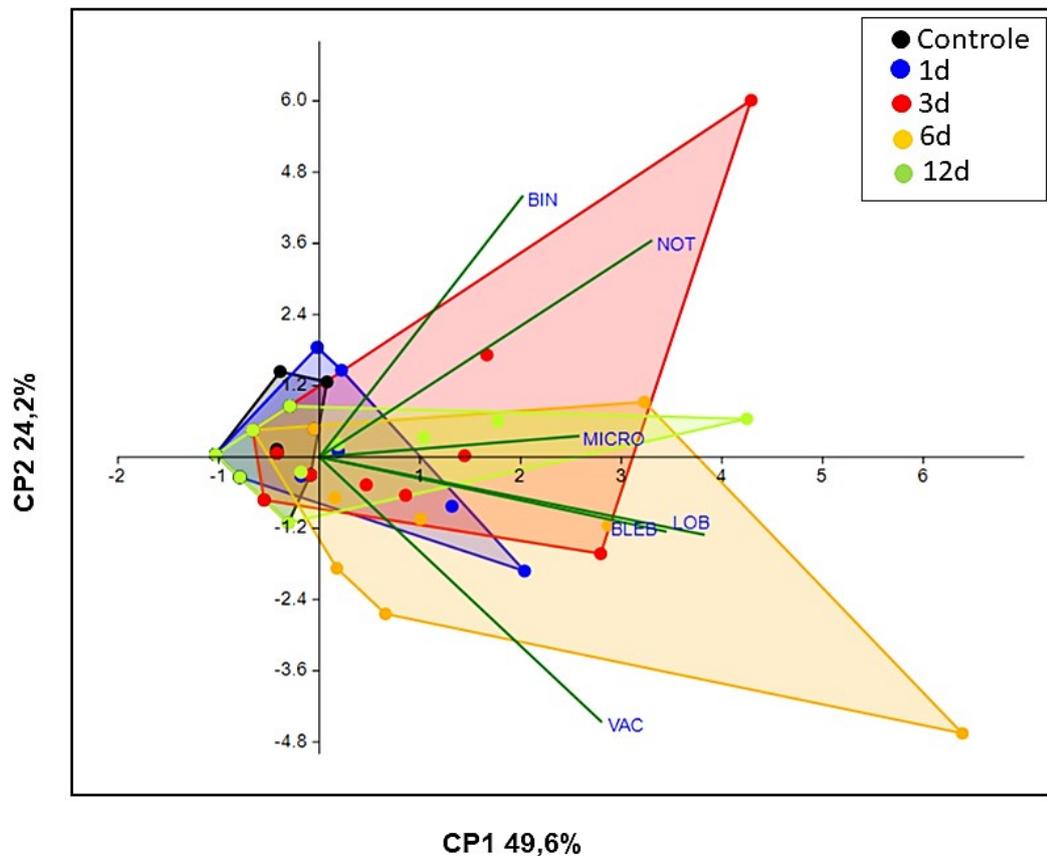


Figura 3. Análise de componentes principais (PCA) das alterações nucleares identificadas após a exposição a 1,5 µg/L de lambda-cialotrina por 1, 3, 6 e 12 dias. Eritrócitos binucleados (BIN), núcleos invaginados (NOT), brotamento nuclear (BLEB), núcleos vacuolizados (VAC), núcleos lobulados (LOB) e micronúcleos (MICRO).

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As alterações histológicas, nas brânquias de *A. lacustris*, classificadas de acordo com o índice de alterações histológicas (IAH) e a ordenação pelo grau de reversibilidade das lesões observadas estão representadas na Figura 4a. O índice de alterações histológicas (IAH) foi superior em todos os períodos de exposição em relação aos controles. Entre os expostos, houve crescimento nos valores médios, com maiores IAHs aos 6 e 12 dias de exposição. No entanto, as lesões nesses períodos foram classificadas pelos escores $w1$ e $w2$, as quais são de fácil reversibilidade após retiradas do agente estressor, conforme a análise de componentes principais. No total, essa análise reteve 88,1% da variância, sendo 66,6 para CP1 e 22,5 para CP2. Destes, $w2$ mostrou maior correlação

com CP1 (0,89) e *w1* com CP2 (0,90). As lesões classificadas com *w3* (irreversíveis) foram de baixa expressão em todos os tempos (Figura 4b).

Exemplos das principais alterações histológicas estão representadas na Figura 5. Nos grupos expostos, foram encontradas lesões como descamação do epitélio e edema nas lamelas secundárias, aderência lamelar, hiperplasia e hipertrofia das células de muco, aneurisma, fusão incompleta de lamelas secundárias e, em casos mais graves, a fusão completa das lamelas secundárias.

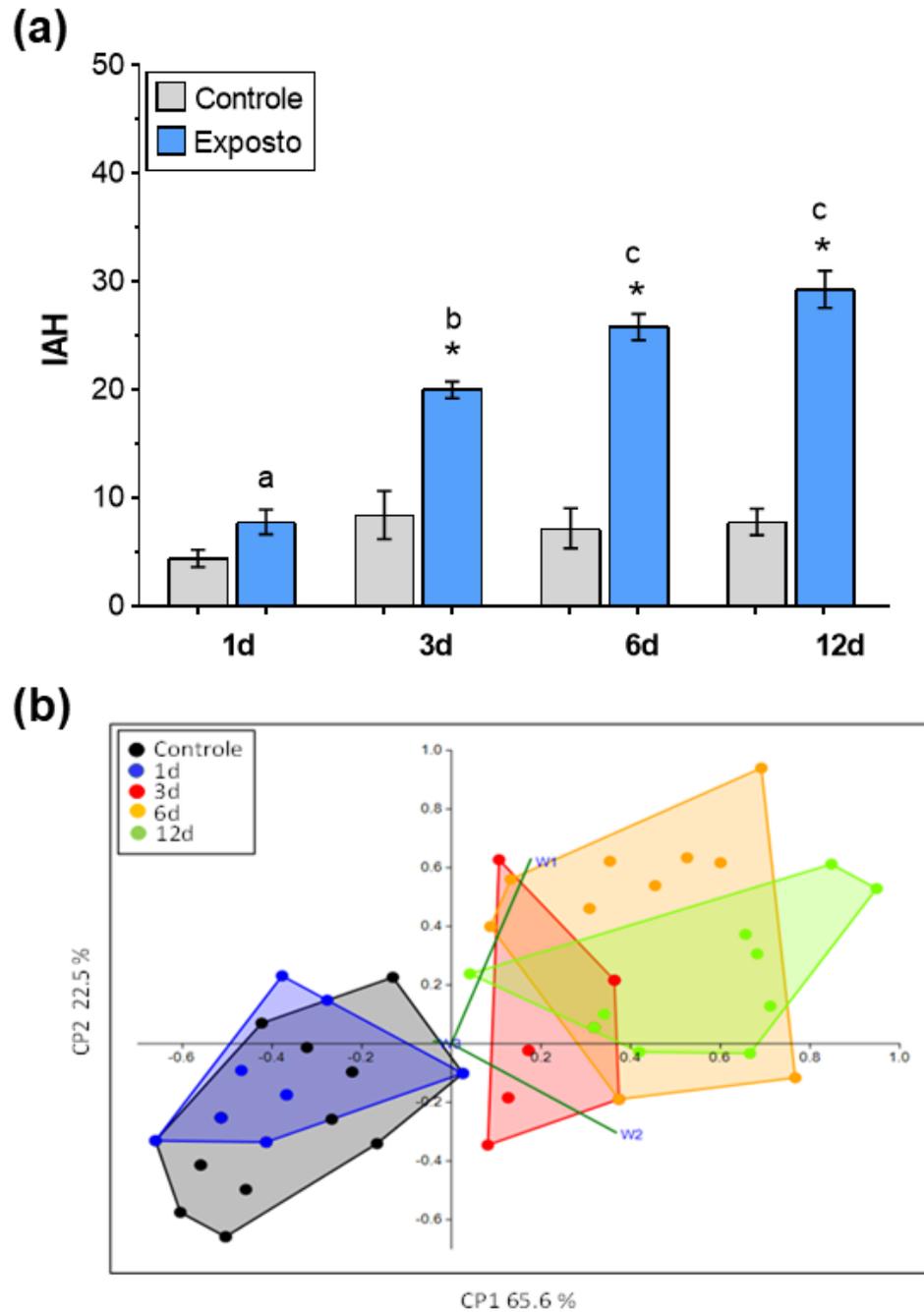


Figura 4. Média (\pm epm) do índice de alterações histológicas (IAH) estimado para espécimes de *Astyanax lacustris* expostos a 1,5 $\mu\text{g/L}$ de lambda-cialotrina (a) e análise de componentes principais considerando a grau de reversibilidade das lesões ($w1$, $w2$ e $w3$) de acordo com o tempo de exposição (b). Letras diferentes representam efeito significativo ($p < 0,05$) entre os tempos de exposição; * representa diferença ($p < 0,05$) entre controles e expostos.

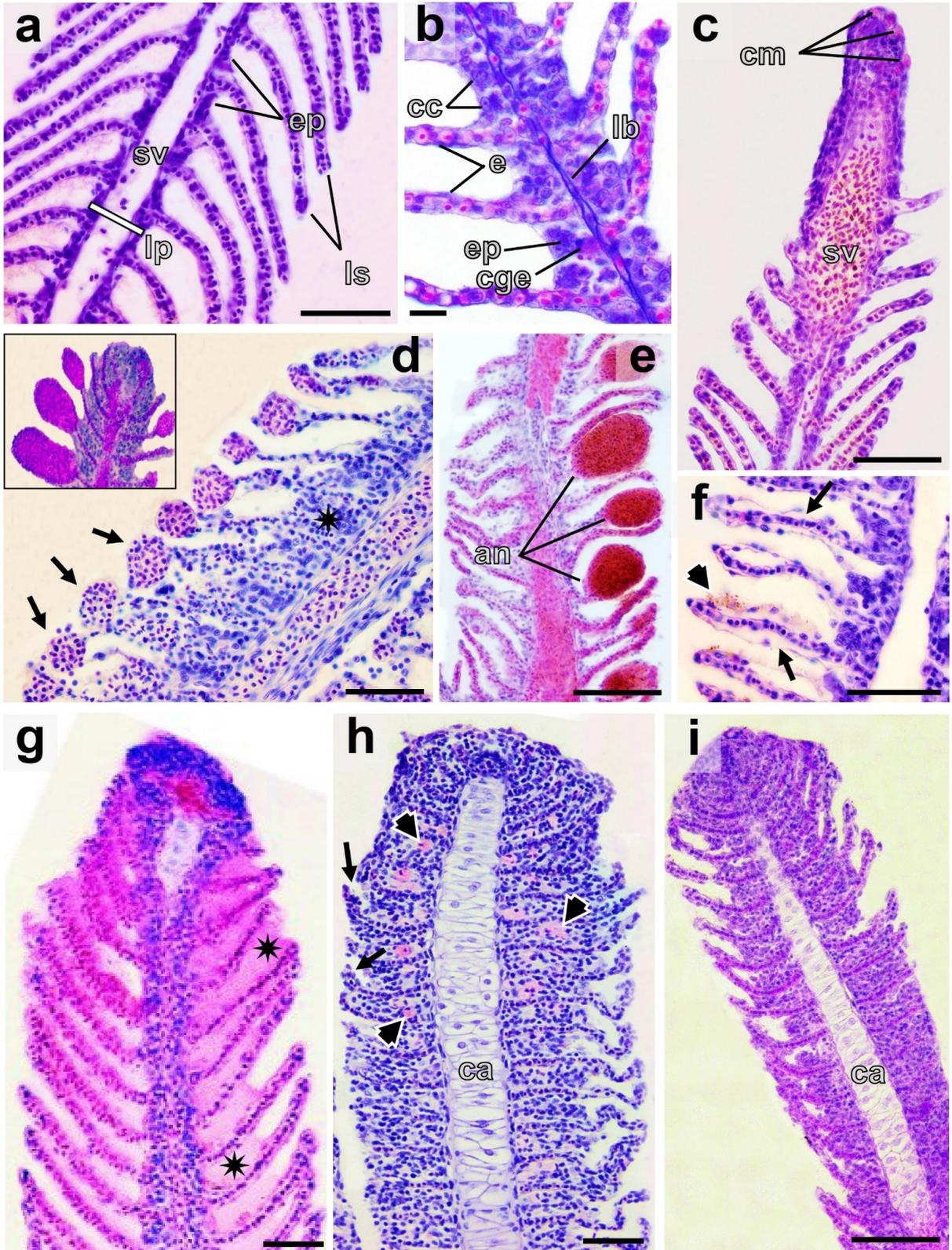


Figura 5. Secções histológicas de amostras branquiais coradas em HE de *Astyanax lacustris* controle e expostos a 1,5 µg/L de lambda-cialotrina. **(a)**, **(b)** e **(c)**, amostras controle; em **(a)**, sv, sulco venoso; lp, lamela primária; ls, lamela secundária; ep, células epiteliais escamosas; barra = 100 µm. **(b)**, cc, células cloreto, cge, célula granulocítica eosinofílica; e, eritrócitos; lb, lâmina basal do sulco venoso; barra = 10 µm. **(c)**, porção distal de uma lamela branquial onde há o término do sulco venoso (sv) revestido por uma fina camada de células epiteliais e células e muco (cm); barra = 100 µm. **(d)**, espécime com 6 dias de exposição; fragmento de lamela branquial apresentando formação inicial de aneurismas lamelares secundárias (seta) junto a hiperplasia de células epiteliais da lamela primária (*); barra = 50 µm; no detalhe um segmento distal com aneurismas consolidados junto a capilares lamelares secundários; **(e)**, espécime com 6 dias de exposição; fragmento branquial demonstrando aneurismas lamelares secundários (an); barra = 100 µm. **(f)**, espécime com 6 dias de exposição; edema ao longo dos capilares lamelares secundários (seta) com a presença de depósitos de hemossiderina extra capilares (cabeça de seta); barra = 50 µm. **(g)**, lamela branquial demonstrando severa hiperemia vascular com deposição de exsudato seroso (*); espécime com 12 dias de exposição. **(h)** e **(i)**, amostras do tempo 12 de exposição; em **(h)**, porção distal lamelar com severa fusão epitelial demonstrando descamação celular (setas) com infiltrado de células granulocíticas eosinofílicas (cabeça de seta); em **(i)** detalhe da fusão lamelar e da descamação epitelial; ca, cartilagem lamelar. **(g)**, **(h)** e **(i)**, barra = 100 µm.

6. DISCUSSÃO

O sangue é considerado um indicador fisiopatológico do organismo, portanto, parâmetros sanguíneos como os eritrócitos são importantes para diagnosticar a condição funcional e estrutural dos peixes expostos a substâncias tóxicas. Os eritrócitos são capazes de responder a várias pressões ambientais, e alterações nesses eritrócitos são um indicador comum da presença de contaminantes em corpos d'água (NEPOMUCENO *et al.*, 1997). Devido ao seu amplo emprego no ambiente agrícola e urbano, corpos d'água constituem um meio importante de contaminação para os piretróides sintéticos.

As atividades clastogênicas dos pesticidas podem levar a ocorrência de distúrbios de ordens genéticas, teratogênese e carcinogênicas (XING *et al.*, 2022). Portanto, a análise das anormalidades nucleares nos eritrócitos e a presença aumentada de micronúcleos tornam-se importantes biomarcadores para se estimar efeitos genotóxicos dos pesticidas em populações vulneráveis (AMAEZE *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2020).

Embora tenham ocorrido em todos os períodos de exposição, o total de alterações foi significativamente superior ao controle já no dia 1, sugerindo um efeito precoce e agudo da LC. As anormalidades mais comuns incluíam núcleos vacuolizados, invaginados, brotamento nuclear, células binucleadas e núcleos lobulados. Embora os processos exatos de origem dessas alterações nucleares ainda não tenham sido completamente elucidados, a interferência dos contaminantes na replicação do DNA e nos estágios tardios da mitose são considerados fatores para o surgimento dessas anormalidades (HANDA; JINDAL, 2020). A formação de células binucleadas geralmente ocorre devido a falhas na citocinese, frequentemente causadas por desregulação cromossômica. Tais falhas no processo de divisão do citoplasma, após a mitose, levam ao surgimento de células com dois núcleos. Weldetinsae *et al.* (2017) apontam que a presença dessas células binucleadas indica anormalidades na divisão celular e contribui para o desequilíbrio genético nas células. Por outro lado, eritrócitos binucleados e invaginados destacaram a partir do dia 3 e sugerindo a presença de aneuploidia (VENTURA; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008) devido à dificuldade de formar fusos mitóticos causados por ações aneugênicas induzidas pela LC (ÖZKAN *et al.*, 2011; MURANLI; GÜNER, 2011).

As alterações típicas de brotamento nuclear foram exclusivamente observadas a partir do dia 3 de exposição. Pampalona *et al.* (2010) demonstram que este processo está diretamente ligado à amplificação genética, uma condição que promove instabilidade no material genético e resulta no aprisionamento do DNA na membrana nuclear, especialmente após a divisão celular. Além disso, Lindberg *et al.* (2007) sugerem que o

brotamento nuclear observado pode ser o resultado de pontes quebradas formadas pelo encolhimento do material nucleoplasmático em direção ao núcleo. Este encolhimento contribui para a formação de estruturas instáveis no núcleo, reforçando a conexão entre alterações nucleares e a instabilidade genômica.

Núcleos lobulados foram notados em todos os períodos de exposição, apresentando maior expressividade nos dias 6 e 12. Embora sejam tipicamente incomuns, podem ser observados em até 20% das células expostas a compostos genotóxicos, incluindo agentes antineoplásicos (ÇAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Conforme descrito por Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007), os núcleos lobulados estão diretamente ligados a dificuldades na acumulação de tubulina durante a formação do fuso mitótico em citocinese, um processo influenciado pela aneugenicidade. Além disso, Ghisi *et al.* (2014) afirmam que, a etiologia de alterações nucleares em eritrócitos de peixes, como a invaginação nuclear, permanece amplamente desconhecida. No entanto, essas modificações parecem estar associadas a variações nas proteínas do citoesqueleto, essenciais para manter a morfologia nuclear.

Os eritrócitos vacuolizados, particularmente evidentes nos períodos 1, 6 e 12 de exposição foram previamente descritos por Ateeq, Ali e Ahmad (2002) como resultantes da interrupção da solubilidade lipídica de suas membranas por efeitos tóxico-químicos. O estudo de Ateeq, Ali e Ahmad (2002) demonstra que substâncias químicas induzem condições hipóxicas, reduzindo o ATP e levando ao desenvolvimento de eritrócitos com formatos anormais. Essa sequência de eventos, frequentemente culmina em apoptose das células afetadas.

Aos 12 dias de exposição, observou-se diminuição na quantidade de alterações nucleares, em comparação aos valores observados nos demais períodos. Uma explicação para isso poderia ser que um maior tempo de exposição pode causar a mortalidade celular ou atraso no ciclo celular. Ou seja, essa variação nas frequências das alterações nos diferentes tempos de exposição pode estar relacionada à cinética das células sanguíneas e à reposição eritrocitária. Estudos indicam que a exposição de peixes a altas doses de pesticidas ou a doses subletais (ADEDEJI; ADEYEMO; AGBEDE, 2009), bem como a metais pesados como níquel (OLOLADE; OGinni, 2010) e chumbo (ADEYEMO, 2007), tende a reduzir significativamente os índices de reposição eritrocitária.

Dessa forma, a diminuição na frequência de alterações nucleares pode estar relacionada à degradação da LC ou a um mecanismo de adaptação em relação ao pesticida. Uma possível explicação para essa resistência dos peixes é a aquisição de tolerância por aclimação fisiológica durante exposições prolongadas a concentrações subletais. Foi

observada uma tendência semelhante em peixes expostos aos poluentes do Rio Lambro, com um aumento na frequência de alterações nucleares em eritrócitos periféricos após 7 dias de exposição, que não se intensificou após 15 e 30 dias. Portanto, a redução das anormalidades nucleares pode ser uma característica intrínseca adaptativa, já que células contaminadas tendem a ser removidas do organismo mais rapidamente que as não danificadas (FLORA; BENNICELLI; BAGNASCO, 1994).

Os micronúcleos são formados durante a divisão celular e refletem efeitos citogénéticos, ou seja, perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não estão incluídos no núcleo principal após a anáfase. O teste de micronúcleo em peixes tem potencial para detectar efeitos clastogênicos e aneugênicos de contaminantes em meio aquático (AL-SABT e METCALFE, 1995). Neste estudo, observou-se a presença de micronúcleos em eritrócitos de *A. lacustris* em todos os intervalos de exposição à LC, e a taxa de ocorrência dessa alteração não apresentou diferenças consideráveis nos intervalos. No entanto, a contagem total de micronúcleos encontrados nos grupos expostos foi significativamente superior em comparação com a contagem total nos grupos de controle.

Uma hipótese para a baixa frequência de micronúcleos nos períodos de exposição, se deve as limitações temporais deste teste como biomarcador ambiental. Os micronúcleos surgem como uma resposta imediata a danos citogénéticos, mas sua presença em organismos é geralmente breve, pois as células afetadas tendem a ser eliminadas mais rapidamente do que as células íntegras (FLORA *et al.*, 1993), um fenômeno previamente observado por Muranli e Güner (2011) ao exporem espécimes de *Gambusia affinis* a diferentes concentrações de LC por 48h. Ademais, deve ser levado em consideração que, segundo revisão de Tamanho, Battisti e Baroni (2022), a frequência de micronúcleos induzida por pesticidas geralmente é relatada como variável de acordo com o tempo de exposição, concentração, condições de exposição dos peixes de água doce e o tipo de poluente empregado. Embora a LC não tenha induzido de forma acentuada a formação de micronúcleos nos intervalos estudados, notamos claramente que a contagem total de micronúcleos nos grupos expostos sugere um indicativo potencial genotóxico desse piretróide para o *A. lacustris*. Assim, a eficácia da aplicação do teste de micronúcleos em espécies de peixes de água doce em ensaios laboratoriais de toxicidade com LC, pode ser confirmada, corroborando resultados prévios de outros estudos utilizando diversos modelos experimentais como, *Cheirodon interruptus interruptus* (CAMPANA *et al.*, 1999), *Garra rufa* (ÇAÇAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003), *G. affinis* (MURANLI; GÜNER, 2011), *Labeo rohita* (GADHAVE *et al.*, 2014), *Oreochromis mossambicus* (NAQVI; SHOIB; ALI, 2016) e o *Clarias gariepinus* (AMAEZE *et al.*, 2020).

As brânquias desempenham funções cruciais, como respiração, regulação osmótica, manutenção do equilíbrio ácido-base e eliminação de resíduos nitrogenados. Esse órgão é extremamente sensível à qualidade da água e à presença de poluentes, devido às suas estruturas filamentosas e lamelares, que proporcionam uma grande área de contato direto e contínuo com a água (ROHANI, 2023). O tecido epitelial branquial, sendo a principal superfície de interação com o ambiente externo, torna-se um alvo significativo para os contaminantes aquáticos. Os compostos piretróides, devido à sua alta lipofilicidade, podem aderir à superfície das brânquias quando presentes na água, levando a danos histopatológicos (BHARDWAJ *et al.*, 2020). Nesse contexto, a análise das alterações histológicas nas brânquias de teleósteos provocadas pela exposição aos piretróides tem ganhado atenção crescente em pesquisas toxicológicas (ALALIBO; PATRICIA; RANSOME, 2019; MAJUMDER; KAVIRAJ, 2022; UVAISH *et al.*, 2023).

No presente estudo, observou-se que o tecido branquial dos peixes expostos à LC sofreu alterações histológicas em todos os períodos avaliados. Essas alterações histopatológicas progrediram e intensificaram-se proporcionalmente à duração da exposição, especialmente nos intervalos de 3, 6 e 12 dias, evidenciando uma resposta prolongada, conforme observado previamente por Fernandes *et al.* (2020) em *Oreochromis niloticus* submetidos à exposição subletal de 0,86 µg/L de LC.

Após 24 horas de exposição, as principais alterações observadas em *A. lacustis* incluíram hipertrofia e hiperplasia das células de muco. De acordo com Díaz *et al.* (2009), estas células, situadas no epitélio das brânquias, produzem muco para defesa contra fatores adversos do meio. De forma excessiva, pode ser considerada uma resposta aguda frente a um estressor ambiental (YANCHEVA *et al.*, 2022).

Os resultados deste estudo estão de acordo com os de Bej *et al.* (2021), que sugerem que a produção aumentada de muco pode ser uma reação defensiva e protetora para atenuar a irritação provocada pelos pesticidas testados. Uchenna, Uka e Obiahu (2022) apontam que as células produtoras de muco podem ser eficazes na apreensão de substâncias tóxicas, contribuindo assim para impedir a penetração de agentes prejudiciais nas brânquias. Porém, a secreção excessiva de muco pelas células branquiais, em resposta a condições estressantes, funciona como uma forma de defesa crônica. Leonardo *et al.* (2001) e Fracácio *et al.* (2003) relataram, no entanto, que a eficiência das brânquias pode ser negativamente afetada dependendo da gravidade desse processo.

Alterações histológicas, incluindo edema intralamelar, hiperemia vascular, hemorragia e proliferação do epitélio nas lamelas primárias, foram frequentemente observadas no grupo exposto ao pesticida no dia 3. Essas lesões denotam processo inflamatório

agudo, como indicado no estudo de Somdare *et al.* (2015), em *Clarias gariepinus* quando expostos ao pesticida organofosforado fenthion.

Nos grupos expostos por 6 e 12 dias, observaram-se lesões, incluindo edema intralamelar, aderência entre lamelas, proliferação do epitélio lamelar primário e fusão parcial e completa lamelar. Tais alterações histológicas atuam como mecanismos de defesa, reduzindo a área de superfície exposta das brânquias e reforçando a barreira contra a difusão de poluentes (KARLSSON-NORRGREN *et al.*, 1985; ERKMEN; KOLANKAYA, 2000). Contudo, essas reações também prejudicam a eficiência das trocas gasosas (MCDONALD; WOOD, 1993). A dilatação dos vasos e o conseqüente aumento do fluxo sanguíneo nas lamelas ocasionalmente causam a ruptura das células pilares e dos capilares sanguíneos, diminuindo sua capacidade de suporte e resultando em aneurismas lamelares, como observado neste estudo. Essas alterações foram previamente reportadas por Al-Ghanbousi, Ba-Omar e Victor (2012) em *Aphanius dispar* expostos ao piretróide tipo II, deltametrina.

No presente estudo, o conjunto das alterações histológicas foram quantificadas pelo índice de alterações histológicas (IAH) conforme os critérios propostos por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e Bernet *et al.* (1999). Assim, as lesões são classificadas pelo seu grau de reversibilidade bem como sua intensidade (distribuição) no tecido. Os períodos 3, 6 e 12 foram bem distintos quanto aos graus $w1$ e $w2$. Os grupos controles e período de 1 dia de exposição foram semelhantes quanto aos achados histopatológicos. Cabe ressaltar que independente do tempo de exposição, as lesões se apresentaram de caráter reversível, ou seja, a retirada dos peixes do ambiente aquático com LC pode resultar em retorno à estrutura e possível funcionalidade normal do tecido branquial. Esse quadro é semelhante ao observados em outras espécies expostos a diferentes compostos piretróides e podem ser considerados com adaptativos (CUNHA *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2020; FARAG *et al.*, 2021).

7. CONCLUSÃO

Este estudo é o primeiro, até onde sabemos, a avaliar os efeitos genotóxicos associados as alterações histopatológicas do tecido das brânquias em *A. lacustris* expostos ao piretróide LC. Nossos resultados indicam que o *A. lacustris*, uma espécie de peixe nativa, apresenta potencial para ser utilizado como bioindicador em programas de monitoramento ambiental. Testes de toxicidade em laboratório com essa espécie podem ser implementados para investigar o efeito da LC e seu potencial tóxico no ambiente aquático dulcícola.

A avaliação das alterações nucleares associadas ao teste de micronúcleo, observadas neste estudo, reflete danos genéticos e cromossômicos que podem ocorrer devido à exposição subletal à LC, destacando seu potencial genotóxico. Os resultados também apontam que a LC, mesmo em doses subletais, é capaz de promover tais alterações até 12 dias de exposição, bem como o surgimento de lesões no tecido branquial de forma progressiva, mas reversível. As consequências dessas alterações podem resultar no comprometimento parcial nas trocas gasosas.

Estudos dos efeitos causados por contaminantes no ecossistema aquático são relevantes do ponto de vista ecológico uma vez que estes, são na sua maioria, constituídos por espécies nativas. Nesse sentido, esforços devem ser continuados no sentido de integrar as melhores práticas de manejo para prevenir ou minimizar a contaminação destes ambientes e, conseqüentemente, prevenir riscos inerentes aos efeitos toxicológicos na ictiofauna.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. R.; SILVA, L. M. J.; FIGUEIREDO-ARIKI, D. G.; SATO, R. T.; KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R. Reproductive performance of lambari (*Astyanax altiparanae*) in a semina-tural system using different protocols. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 2, p. 471-483, 2021.
- ACAR, Ü.; SAOCA, C.; KESBIÇ, O. S.; YILMAZ, S.; YIGIT, M.; İNANAN, B. E.; FAZIO, F. Comparative study on haematological and biochemical parameters of two wild sparid fish spe-cies. **Cahiers de Biologie Marine**, v. 60, n. 1, p. 51-57, 2019. DOI: 10.21411/CBM.A.39A890F1.
- ADEDEJI, O. B.; ADEYEMO, O. K.; AGBEDE, S. A. Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3940, 2009.
- ADEYEMO, O. K. Haematological profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to lead. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 7, n. 2, 2007.
- AKAISHI, F. M.; ASSIS, H. C. S.; JAKOBI, S. C. G.; EIRAS-STOFELLA, D. R.; ST-JEAN, S. D.; COURTENAY, S. C.; RIBEIRO, C. A. O. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 46, p. 244-253, 2004.
- AL-GHANBOUSI, R.; BA-OMAR, T.; VICTOR, R. Effect of deltamethrin on the gills of *Aphanius dispar*: A microscopic study. **Tissue and Cell**, v. 44, n. 1, p. 7-14, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2011.09.003>.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Muta-tion Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2-3, p. 121-135, 1995. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0).
- ALALIBO, K.; PATRICIA, U. A.; RANSOME, D. E. Effects of Lambda Cyhalothrin on the be-haviour and histology of gills of *Sarotherodon melanotheron* in brackish water. **Scientific Af-rican**, v. 6, p. e00178, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00178>.
- ALVIM, T. T.; MARTINEZ, C. B. R. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost Prochilodus lineatus exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagen-esis**, v. 842, p. 85-93, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.011>.
- AMAEZE, N. H.; KOMOLAFE, B. O.; SALAKO, A. F.; AKAGHA, K. K.; BRIGGS, T. M. D.; OLATINWO, O. O.; FEMI, M. A. Comparative assessment of the acute toxicity, haematological and genotoxic effects of ten commonly used pesticides on the African Catfish, *Clarias gariepi-nus* Burchell 1822. **Heliyon**, v. 6, n. 8, 2020.
- AMIN, M.; YOUSUF, M.; ATTAULLAH, M.; AHMAD, N.; AZRA, M. N.; LATEEF, M.; BUNERI, I. D.; ZEKKER, I.; BATIHA, G. E.; ABOELENIN, S. M.; ZAHOOR, M.; IKRAM, M.; NAEEM, M. Cholinesterase activity as a potential biomarker for neurotoxicity induced by pesticides in vivo exposed *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia): assessment tool for organophosphates and

synthetic pyrethroids. **Environmental Technology**, v. 44, n. 14, p. 2148-2156, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.2024276>.

ANDERSON, T. A.; SALICE, C. J.; ERICKSON, R. A.; MCMURRY, S. T.; COX, S. B.; SMITH, L. M. Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. **Chemosphere**, v. 92, n. 1, p. 84-90, 2013.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil, publicado em 04/07/2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2017/listas-de-ingredientes-ativos-com-uso-autorizado-e-banidos-no-brasil>. Acesso em: 11/11/2023.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias Autorizadas**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>. Acesso em: 20/10/2023.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: 22/10/2023.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. D.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.

ASSIS, C. B.; BRANCO, G. S.; MOREIRA, R. G.; PINHEIRO, J. P. S. Aluminum at environmental concentrations affects the sperm quality of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae*: An in vitro study. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 243, p. 108983, 2021.

ATEEQ, B.; ALI, M. N.; AHMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, n. 2, p. 135-144, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00075-X).

AYLLON F.; GARCIA-VAZQUEZ E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 467, n. 2, p. 177-186, 2000.

AYLLON F.; GARCIA-VAZQUEZ E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, n. 3, p. 221-225, 2001.

AZNAR-ALEMANY, Ò.; ELJARRAT, E. Introduction to pyrethroid insecticides: chemical structures, properties, mode of action and use. *In.*: Eljarrat, E. **Pyrethroid Insecticides**. Springer Nature, p. 1-16, 2020.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, p. 172-175, 2001.

BEJ, S.; GHOSH, K.; CHATTERJEE, A.; SAHA, N. C. Assessment of biochemical, hematological and behavioral biomarkers of *Cyprinus carpio* on exposure to a type-II pyrethroid insecticide Alpha-cypermethrin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, p. 103717, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103717>.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>.

BHARDWAJ, K.; SHARMA, R.; ABRAHAM, J.; SHARMA, P. A natural product for crop protection. **Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture**, p. 113-130, 2020.

BOTELHO, R. G.; MONTEIRO, S. H.; CHRISTOFOLETI, C. A.; MOURA-ANDRADE, G. C. R.; TORNISIELO, V. L. Environmentally Relevant Concentrations of Atrazine and Ametrine Induce Micronuclei Formation and Nuclear Abnormalities in Erythrocytes of Fish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, n. 4, p. 577–585, 2015.

BOWNIK, A.; KOWALCZYK, M.; BAŃCZEROWSKI, J. Lambda-cyhalothrin affects swimming activity and physiological responses of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 216, p. 805-811, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.192>.

BRAGA, A. R. C.; ROSSO V. V.; HARAYASHIKI, C. A. Y.; JIMENEZ, P. C.; CASTRO, I. B. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 312-314, 2020. DOI: doi.org/10.1038/s43016-020-0100-3.

BRASIL. **Decreto Nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2002.

BRASIL. **Decreto Nº 5.360, de 31 de janeiro de 2005**. Promulga a Convenção sobre Procedimento de Consentimento Prévio Informado para o Comércio Internacional de Certas Substâncias Químicas e Agrotóxicos Perigosos, adotada em 10 de setembro de 1998, na cidade de Roterdã. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. **Portaria MTE Nº 86, de 03 de março de 2005**. Aprova a Norma Regulamentadora de Segurança e Saúde no Trabalho na Agricultura, Pecuária, Silvicultura, Exploração Florestal e Aquicultura – NR 31. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. **Lei Nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, de produtos de controle ambiental, de seus produtos técnicos e afins. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2023.

BURRIDGE, L.; WEIS, J. S.; CABELLO, F.; PIZARRO, J.; BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 7-23, 2010.

CARMELLO, C. S.; COWPER, C. F.; JORGE, M. J.; PÉREZ, J. E.; JORGE, L. C. Anormalidades morfológicas nucleares en hematíes del pez *Prochilodus linneatus* expuesto al clorpirifos. **Revista Veterinária**, v. 30, n. 2, p. 64-71, 2019.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1139/f90-237>.

CAMPANA, M. A.; PANZERI, A. M.; MORENO, V. J.; DULOUT, F. N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 438, n. 2, p. 155-161, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00167-3).

CANEDO, A.; JESUS, L. W. O.; BAILÃO, E. F. L. C.; ROCHA, T. L. Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. **Environmental Pollution**, v. 290, p. 118019, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118019>.

CANTANHÊDE, S. M.; MEDEIROS, A. M.; FERREIRA, F. S.; FERREIRA, J. R. C.; ALVES, L. M. C.; CUTRIM, M. V. J.; SANTOS, D. M. S. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís-MA. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 593-601, 2014.

CARAZO-ROJAS, E.; PÉREZ-ROJAS, G.; PÉREZ-VILLANUEVA, M.; CHINCHILLA-SOTO, C.; CHIN-PAMPILLO, J. S.; AGUILAR-MORA, P.; ALPÍZAR-MARÍN, M.; MASÍS-MORA, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; VRYZAS, Z. Pesticide monitoring and ecotoxicological risk assessment in surface water bodies and sediments of a tropical agro-ecosystem. **Environmental pollution**, v. 241, p. 800-809, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.020>.

CARROLA, J. S.; RIBEIRO, O.; PINTO, M. Q. A morfologia e função da brânquia de peixes teleósteos. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. 11, p. 6-6, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34624/captar.v11i0.29824>.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1–2, p. 93-99, 2003.

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic toxicology**, v. 74, n. 3, p. 264-271, 2005. DOI: [10.1016/j.aquattox.2005.06.001](https://doi.org/10.1016/j.aquattox.2005.06.001).

CENGİZ, E. I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 200-204, 2006.

- CENGIZ, E. I.; UNLU E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 246-253, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.08.005>.
- CESTARI, M. M. Genotoxicity and Mutagenicity. *In.*: ALMEIDA, E. A.; RIBEIRO, C. A. O. **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystem**. CRC Press, p.132-163, 2014.
- CHEHADE, C.; AMARAL, F. G.; BRANCO, G. S.; CASSEL, M.; JESUS, L. W.; COSTA, F. G.; BORDIN, S. A.; MOREIRA, R. G.; BORELLA, M. I. Molecular characterization of different pre-proGnRHs in *Astyanax altiparanae* (Characiformes): Effects of GnRH on female reproduction. **Molecular reproduction and development**, v. 87, n. 6, p. 720-734, 2020.
- CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. Hematologic disorders of fish. **Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice**, v. 11, n. 3, p. 445-462, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.007>.
- CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretriz da prática de eutanásia** (Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018). Brasília, DF, 2018.
- CORT, C. C. W. D.; GHISI, N. C. Uso de alterações morfológicas nucleares em *Astyanax spp.* para avaliação da contaminação aquática. **O Mundo da Saúde**, v. 38, n. 1, p. 31-39, 2014.
- COSTA, F. G.; GOMES, C. C.; ADOLFI, M. C.; CARVALHO, M. C. C. G.; ZANONI, M. A.; SEIVA, F. R. F.; BORELLA, M. I. New approaches concerning the testis of *Astyanax lacustris* (Characidae): immunohistochemical studies. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1-14, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10695-023-01194-5>.
- CUNHA, F. D. S.; SOUSA, N. D. C.; SANTOS, R. F. B.; MENESES, J. O.; COUTO, M. V. S.; ALMEIDA, F. T. C.; FILHO, J. G. S.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A. N.; FUJIMOTO, R. Y. Deltamethrin-induced nuclear erythrocyte alteration and damage to the gills and liver of *Colossoma macropomum*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 15102-15110, 2018. DOI: [10.1007/s11356-018-1622-1](https://doi.org/10.1007/s11356-018-1622-1).
- DEL-GUERCIO, A. M. F.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; FONTANETTI, C. S. Avaliação da eficiência do tratamento de esgoto doméstico pelo teste do micronúcleo em *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, p. 1121-1128, 2017.
- DÍAZ, A. O.; CASTRO, M. G.; GARCÍA, A. M.; ASTARLOA, J. M. D.; FIGUEROA, D. E. Gross morphology and surface ultrastructure of the gills of *Odontesthes argentinensis* (Actinopterygii, Atherinopsidae) from a Southwestern Atlantic coastal lagoon. **Tissue and cell**, v. 41, n. 3, p. 193-198, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2008.10.001>.
- DONG, K.; DU, Y.; RINKEVICH, F.; NOMURA, Y., XU, P., WANG, L., SILVER, K.; Zhorov, B. S. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 50, p. 1-17, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>.
- DOURADO, P. L. R.; ROCHA, M. P. D.; ROVEDA, L. M.; RAPOSO, J. L.; CÂNDIDO, L. S.; CARDOSO, C. A. L.; MORALES, M. A. M.; OLIVEIRA, K. M. P.; GRISOLIA, A. B. Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal

and plant bioassays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, p. 123-133, 2017. DOI: 10.1590/1678-4685-gmb-2015-0223.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kızılırmak River, Turkey. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 418-425, 2000. DOI: 10.1007/s001280000017.

EZENWOSU, S. U.; NNAMONU, E. I.; ODO, G. E.; IKELE, B. C.; ANI, O. C. Evaluation of lambda-cyhalothrin oxidative stress and gonad histoarchitecture toxicity potency in *Clarias gariepinus*. **The journal of basic and applied zoology**, v. 82, p. 1-11, 2021. DOI: 10.1186/s41936-020-00201-y.

FÁNGE, R. 1 Fish Blood Cells. *In: Fish physiology*. Academic Press, p. 1-54, 1992.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M.; BILAL, R. M.; GEWIDA, A. G.; DHAMA, K.; ABDEL-LATIF, H. M.; AMER, M. S.; RIVERO-PEREZ, N.; ZARAGOZA-BASTIDA, A.; BINNASER, Y. S.; BATIHA, G. E.; NAIEL, M. A. An overview on the potential hazards of pyrethroid insecticides in fish, with special emphasis on cypermethrin toxicity. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1880, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11071880>.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Pesticides use and trade, 1990-2021. **FAOSTAT Analytical Briefs Series**. n. 70. Roma, Itália. 2023. DOI: <https://doi.org/10.4060/cc6958en>.

FAZIO, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 500, p. 237-242, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FEO, M. L. Analytical methods for determining pyrethroid insecticides in environmental and food matrices. *In: ELJARRAT, E. Pyrethroid Insecticides*. Springer Nature, p. 17-45, 2020.

FERNANDES, C. E.; SILVEIRA, A. W.; SILVA, A. L. N.; SOUZA, A. I.; POVH, J. A.; JAQUES, J. A. S.; SANTOS, E. A.; YONEKAWA, M. K. A.; PENTEADOALL, B. B.; FRANCO-BELUSSI, L. Osmoregulatory profiles and gill histological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to lambda-cyhalothrin. **Aquatic Toxicology**, v. 227, p. 105612, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105612>.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.12.003.

FERREIRA, M. L. P. C. A pulverização aérea de agrotóxicos no Brasil: cenário atual e desafios. **Revista de Direito Sanitário**, v. 15, n. 3, p. 18-45, 2014.

FIORIN, R. A.; STÜRMER, G. R.; GUEDES, J. V. C.; COSTA, I. F. D.; PERINI, C. R. Métodos de aplicação e inseticidas no controle de percevejos na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 139-145, 2011.

FLORA, S.; VIGANO, L.; D'AGOSTINI, F.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 319, n. 3, p. 167-177, 1993.

FLORA, S.; BENNICELLI, C.; BAGNASCO, M. Genotoxicity of mercury compounds. A review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 317, n. 1, p. 57-79, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0165-1110(94)90012-4).

FRACÁCIO, R.; VERANI, N. F.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; ROCHA, O.; RIGOLIN-SÁ, O.; ANDRADE, C. A. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) exposed to the toxic sediments. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 685-695, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000400023>.

FRANCISCO, C. D. M.; BERTOLINO, S. M.; OLIVEIRA, R. J.; MORELLI, S.; PEREIRA, B. B. Genotoxicity assessment of polluted urban streams using a native fish *Astyanax altiparanae*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 82, n. 8, p. 514-523, 2019. DOI: [10.1080/15287394.2019.1624235](https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1624235).

FREITAS, C. E. C.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 2, 2009.

FOURNIE, J. W.; KROL, R. M.; HAWKINS, W. E. Fixation of fish tissues. *In: The laboratory fish*. Academic Press, p. 569-578, 2000.

FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, p. 241-249, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9541-2>.

GADHAVE, P. D.; BRAR, R. S.; BANGA, H. S.; DHAWAN, A. λ -cyhalothrin induced genotoxicity in freshwater fish *Labeo rohita*. **Veterinary World**, v. 7, n. 6, p. 412-415, 2014. DOI: [10.14202/vetworld.2014.412-415](https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.412-415).

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; FÁVARO, L. F.; ASSIS, H. C. S.; PRIOLI, A. J. In situ assessment of a neotropical fish to evaluate pollution in a river receiving agricultural and urban wastewater. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 93, p. 699-709, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1403-6>.

GODOI, F. G. A.; MUÑOZ-PEÑUELA, M.; GOMES, A. D. O.; TOLUSSI, C. E.; BRAMBILA-SOUZA, G.; BRANCO, G. S.; NOSTRO, F. L. L.; MOREIRA, R. G. Endocrine disruptive action of diclofenac and caffeine on *Astyanax altiparanae* males (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 231, p. 108720, 2020.

GONÇALVES, C.; MARINS, A. T.; AMARAL, A. M. B.; NUNES, M. E. M.; MÜLLER, T. E.; SEVERO, E.; FEIJÓ, A.; RODRIGUES, C. C. R.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; CLASEN, B.; LORO, V. L. Ecological impacts of pesticides on *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) from the Uruguay river, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, p. 111314, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111314>.

HANDA, K.; JINDAL, R. Genotoxicity induced by hexavalent chromium leading to eryptosis in *Ctenopharyngodon idellus*. **Chemosphere**, v. 247, p. 125967, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125967>.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187-190, 1973.

HESS, S. C.; NODARI, R. O. Agrotóxicos no Brasil: Panorama dos produtos aprovados entre 2019 e 2022. **AMBIENTES EM MOVIMENTO**, v. 2, n. 2, 2022.

HOLLAND, M. Insecticides: Organic Chlorines, Pyrethrins/Pyrethroids, and Insect Repellents. **Goldfrank's toxicologic emergencies**, 10e. New York: McGraw Hill Medical, p. 1435-58, 2015.

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

HUGHES, G. M. Species variation in gas exchange. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 59, n. 6, p. 494-500, 1966.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Perfil Ambiental Lambda-cialotrina CAS 91465-08-06 Versão aprovada em: 16/08/2019**. Disponível em <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/2019-08-16-Ibama-Perfil-Ambiental-Lambda-cialotrina.pdf>. Acesso em 17/10/2023.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation-Focussing on apples. **Química Nova**, v. 32, p. 996-1012, 2009. DOI: doi.org/10.1590/S0100-40422009000400031.

JINDAL, R.; VERMA, S. In vivo genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and Environmental safety**, v. 118, p. 1-10, 2015. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2015.04.005](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.005).

KAN, Y.; CENGIZ, E. I.; UGURLU, P.; YANAR, M. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 170-179, 2012.

KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; HAUX, C.; FÖRLIN, L. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton–Buchanan), and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v. 27, n. 1, p. 81-95, 1985.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952.

LAHNSTEINER, F. Erythrocyte morphometry in teleost fish—Species-specific, inter-individual and environmental-related differences. **Acta Zoologica**, v. 102, n. 3, p. 237-249, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/azo.12330>.

LANGHEANI, F.; RÊGO, A. C. L. **Guia ilustrado dos peixes da bacia do rio Araguari**. Grupo de Mídia Brasil Central, Uberlândia, 2014.

LEONARDO, J. M. L. O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; NATALI, M. R. M.; VOLSKI, T.; CAVICHIOLO, F. Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 23, p. 863-870, 2001. DOI: <https://doi.org/10.4025/actas-cianimsci.v23i0.2637>.

LI, M.; WANG, J.; LU, Z.; WEI, D.; YANG, M.; KONG, L. NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*). **Aquatic Toxicology**, v. 146, p. 82-92, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.024>.

LI, L.; LIU, S.; YIN, Y.; ZHENG, G.; ZHAO, C.; MA, L.; SHAN, Q.; DAI, X.; WEI, L.; LIN, J.; XIE, W. The toxicokinetics and risk assessment of pyrethroids pesticide in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) upon short-term water exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 241, p. 113751, 2022.

LIMA, L. B. D.; MORAIS, P. B.; ANDRADE, R. L. T.; MATTOS, L. V.; MORON, S. E. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 611-624, 2018.

LINDBERG, H. K.; WANG, X.; JÄRVENTAU, H.; FALCK, G. C. M.; NORPPA, H.; FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 617, n. 1-2, p. 33-45, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.12.002>.

LOPES, C. A. É possível produzir alimentos para o Brasil sem agrotóxicos?. **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 4, p. 52-55, 2017. DOI: doi.org/10.21800/2317-66602017000400016.

LUCENA, C. A.; SOARES, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* "caudal peduncle spot" subgroup *sensu* Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 4072, n. 1, p. 101-125, 2016. DOI: [10.11646/zootaxa.4072.1.5](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4072.1.5).

MAIER, D.; BLAHA, L.; GIESY, J. P.; HENNEBERG, A.; KÖHLER, H.; KUCH, B.; OSTERAUER, R.; PESCHKE, K.; RICHTER, D.; SCHEURER, M.; TRIEBSKORN, R. 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 Research**, v. 72, p. 127-144, 2015.

MAJUMDER, R.; KAVIRAJ, A. Histopathological alterations of gills, liver and kidney of freshwater fish, *Oreochromis niloticus*, exposed to cypermethrin. **Journal of Aquatic Biology & Fisheries**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2022.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) - Consulta de Ingrediente Ativo**. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 22/10/2023.

MARTINS, S. E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 7, p. 1866-1875, 2011. DOI: 10.1039/c0em00787k.

MAUND, S. J.; HAMER, M. J.; WARINTON, J. S.; KEDWARDS, T. J. Aquatic ecotoxicology of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin: Considerations for higher-tier aquatic risk assessment. **Pesticide science**, v. 54, n. 4, p. 408-417, 1998.

MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. *In: Fish ecophysiology*. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 297-321, 1993.

MILANI, G. B.; OLIVEIRA, L. G.; BÜHLER, J.; GUIMARÃES, M. C. M.; GONÇALVES, F. F. Avaliação da presença de resíduos de piretróides em amostras de água, sedimento e pescado na Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí (Rio Grande do Sul). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 10, n. 2, 2022.

MITKOVSKA, V.; CHASSOVNIKAROVA, T. Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 7, p. 7166-7176, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07408-9>.

MORAES, G.; MORAES, F. D.; VENTURINI, F. P.; ROSSI, P. A.; AVILEZ, I. M.; SOARES, C. A. P. CAPÍTULO 28 - O USO DE PIRETROIDES NA PISCICULTURA: PERSPECTIVAS E RESTRIÇÕES. *In: Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. [Vol. 2]*. São Carlos: Pedro & João Editores, p. 601, 2015.

MORELLO, L.; OLIVEIRA, S. V. D.; OLIVEIRA, K. S. D.; SILVA, B. F. D.; SIEGLOCH, A. E.; AGOSTINETTO, L. Disposal of pesticide wastes in apple orchards in the south of Brazil and its compliance with current legislation. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 10, p. 140, 2019. DOI: 10.5539/jas.v11n10p140.

MURANLI, F. D. G.; GÜNER, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 2, p. 104-108, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.004>.

MYERS, M. S.; JOHNSON, L. L.; OLSON, O. P.; STEHR, C. M.; HORNESS, B. H.; COLLIER, T. K.; MCCAIN, B. B. Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the Northeast and Pacific Coasts, USA. **Marine Pollution Bulletin**, v. 37, n. 1-2, p. 92-113, 1998.

NAHAS, A. F. E.; ABDEL-RAZEK, M. A. S.; HELMY, N. M.; MAHMOUD, S.; GHAZY, H. A. Impaired antioxidant gene expression by pesticide residues and its relation with other cellular biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Burullus. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 137, p. 202-209, 2017.

NAQVI, G.; SHOAIB, N.; ALI, A. M. Genotoxic potential of pesticides in the peripheral blood erythrocytes of fish (*Oreochromis mossambicus*). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 48, n. 6, 2016.

NEPOMUCENO, J. C.; FERRARI, Í.; SPANÓ, M. A.; CENTENO, A. J. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 30, n. 3, p. 293-297, 1997.

NUNES, V. J.; JESUS, T. B. Determinação de metais pesados (Mn, Cd, Cr, Cu, Pb) em peixes das espécies *Astyanax bimaculatus*, *Hoplias malabarcius* e *Oreochromis niloticus* presente na Lagoa Salgada–Rio Subaé-Feira de Santana (Bahia). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 5, n. 1, 2019.

RIBEIRO, C. A. O.; NARCISO, M. F. Histopathological markers in fish health assessment. *In: Pollution and fish health in tropical ecosystems*. CRC Press, p. 216-252, 2016

LOLADE, I. A.; OGinni, O. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol*, v. 2, n. 2, p. 014-019, 2010.

ÖZKAN, F.; GÜNDÜZ, S. G.; BERKÖZ, M.; HUNT, A. Ö. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cadmium doses. **Turkish Journal of Zoology**, v. 35, n. 4, p. 585-592, 2011.

PAMPALONA, J.; SOLER, D.; GENESCA, A.; TUSELL, L. Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 683, n. 1-2, p. 16-22, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.10.001>.

PARANÁ. Governo do Estado do Paraná. Secretaria da Saúde. **Material Técnico de Intoxicações Agudas por Agrotóxicos – Atendimento Inicial do Paciente Intoxicado**, 2018.

PEREIRA, J. N.; CORRÊA, J. A. J. Análise das intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola no Brasil entre 2009 e 2014. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 6, p. 159-168, 2018. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2018.006.0017>.

PERRY, S.F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. *In: Fish ecophysiology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 231-264.

PIMPÃO, C. T. Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: estudo bioquímico e imunotóxico. **Doutorado [tese] Curitiba: Universidade Federal do Paraná**, 2006.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**, p. 339-352, 1994.

PRESTES, R. M.; VINCENCI, K. L. Bioindicadores como avaliação de impacto ambiental/Bioindicators as environmental impact assessment. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 4, p. 1473-1493, 2019.

RISTOW, L. P.; BATTISTI, I. D. E.; STUMM, E. M. F.; MONTAGNER, S. E. D. Fatores relacionados à saúde ocupacional de agricultores expostos a agrotóxicos. **Saúde e sociedade**, v. 29, p. e180984, 2020.

ROCHA, P. S.; DEUTSCHMANN, B.; HOLLERT, H. *In situ* determination of genotoxic effects in fish erythrocytes using comet and micronucleus assays. *In: In Situ Bioavailability and Toxicity of Organic Chemicals in Aquatic Systems*. New York, NY: Springer US, p. 115-129, 2020. DOI: 10.1007/7653_2019_40.

RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 56, n. 3, p. 442-448, 2003.

ROHANI, M. F. Pesticides toxicity in fish: Histopathological and hemato-biochemical aspects– A review. **Emerging Contaminants**, p. 100234, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.em-con.2023.100234>.

SACHI, I. T. C.; BONOMO, M. M.; SAKURAGUI, M. M.; MODENA, P. Z.; PAULINO, M. G.; CARLOS, R. M.; FERNANDES, M. N. Biochemical and morphological biomarker responses in the gills of a Neotropical fish exposed to a new flavonoid metal-insecticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 208, p. 111459, 2021. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111459.

SALAKO, A. F.; AMAEZE, N. H.; SHOBAJO, H. M.; OSUALA, F. I. Comparative acute toxicity of three pyrethroids (Deltamethrin, cypermethrin and lambda-cyhalothrin) on guppy fish (*Poecilia reticulata* peters, 1859). **Scientific African**, v. 9, p. e00504, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00504>.

SAMANTA, S.; DEY, P. **Micronucleus and its applications. Diagnostic cytopathology**, v. 40, n. 1, p. 84-90, 2012.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F.G. R. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição Araraquara** 18, p. 339-349, 2007.

SANTOS, R. L. C.; FAYAL, A. D. S.; AGUIAR, A. E. F.; VIEIRA, D. B. R.; PÓVOA, M. M. Avaliação do efeito residual de piretróides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, p. 276-283, 2007.

SCHLENK, D.; HANDY, R.; STEINERT, S.; DEPLEDGE, M. H.; BENSON, W. 16. Biomarkers *In: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (Ed.). The Toxicology of fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, p. 683-713, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780203647295>.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975. DOI:10.1016/0165-1161(75)90058-8.

SCORZA JÚNIOR, R. P. Pesticidas, agricultura e recursos hídricos. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. **Circular Técnica**, v. 12, p. 9, 2006.

SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, Â. T.; NAPOLEÃO, S. R. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 1, p. 107-112, 2011.

SHARMA, M.; THAKUR, J.; VERMA, S.; SHARMA, P. Cytotoxic and genotoxic effect of oxytetracycline on fish *Cyprinus carpio* after acute exposure. **Asian J Pharm Chem Res**, v. 12, p. 134-137, 2019.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **The Journal of cell biology**, v. 140, n. 6, p. 1307-1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMUARA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 448, n. 1, p. 81-90, 2000.

SILVA, T. V. **Perfil histométrico hepático em lambaris (*Astyanax lacustris*) expostos ao inseticida lambda-cialotrina**. 59f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2021.

SILVA, J.; BRAMBI-SOUZA, G.; ARAUJO, D. M.; MOREIRA, R. G. Effects of vitamin A supplementation on ovarian development of *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) during the non-breeding season. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 265, p. 111132, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111132>.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; BERTOLINI, R. M.; LEVY-PEREIRA, N.; NASCIMENTO, N. F.; SENHORINI, J. A.; PIVA, L. H.; FERRAZ, J. B.; YASUI, G. S. Factors affecting secondary sex characteristics in the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 737-746, 2021.

SOMDARE, P. O.; NWANI, C. D.; NWADINIGWE, A. O.; NWANI, J. C.; ODO, G. E.; UGBOR, O. N.; EZEIBE, A. B. C. A. Fenthion induced toxicity and histopathological changes in gill tissue of freshwater African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 25, p. 2103-2113, 2015. DOI: 10.5897/AJB2015.14696.

STEHLE, S.; SCHULZ, R. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5750-5755, 2015.

TAMANHO, N.; BATTISTI, I. D. E.; BARONI, S. Eficácia do uso do micronúcleo em peixes como marcador de exposição a agrotóxicos: uma revisão integrativa. **Concilium**, v. 22, n. 7, p. 733-749, 2022. DOI: 10.53660/CLM-693-741.

TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic toxicology**, v. 37, n. 1, p. 51-70, 1997.

UCHENNA, U. B.; UKA, A.; OBIAHU, O. H. The impact of sub-lethal concentrations of glyphosate on growth and haematology of African catfish under aquatic ecological micro-climate. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 4, p. 164-170, 2022. DOI: 10.1016/j.eneco.2022.06.001.

ULLAH, S.; LI, Z.; HASAN, Z.; KHAN, S. U.; FAHAD, S. Malathion induced oxidative stress leads to histopathological and biochemical toxicity in the liver of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton) at acute concentration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 270-280, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.002>.

ULLAH, S.; LI, Z.; ZUBERI, A.; ARIFEEN, M. Z. U.; BAIG, M. M. F. A. Biomarkers of pyrethroid toxicity in fish. **Environmental chemistry letters**, v. 17, p. 945-973, 2019.

- UVAISH, M.; SALEEM, S.; MEENU, K.; MADDHESHIYA, R. Histopathological assessment of a pyrethroid insecticide with special reference to bifenthrin 10% EC on some vital organs of a freshwater teleost, *Channa Punctatus*. **Journal of Experimental Zoology India**, v. 26, n. 2, 2023.
- VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018. DOI: 10.1111/raq.12164.
- VAN GEEST, J. L.; BURRIDGE, L. E.; KIDD, K. A. Toxicity of two pyrethroid-based anti-sea lice pesticides, AlphaMax® and Excis®, to a marine amphipod in aqueous and sediment exposures. **Aquaculture**, v. 434, p. 233-240, 2014.
- VELMURUGAN, B.; SELVANAYAGAM, M.; CENGIZ, E. I.; UNLU, E. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 286-291, 2007.
- 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**, v. 90, n. 1, p. 42-51, 2008.
- VIANA, L. F.; KUMMROW, F.; LIMA, N. A.; CRISPIM, B. A.; BARUFATTI, A.; FLORENTINO, A. C. Genotoxicity biomarkers on native fish species from the Araguari River (Amazon biome). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 110, n. 4, p. 76, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-023-03713-9>.
- VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; LIRA, A. D. D.; ALMEIDA, T. R. D.; SANTOS, G. B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1069-1074, 2008.
- VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; CABRERA, L. C.; PRIMEL, E. G.; FILLMANN, G.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C. B. R. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 598-609, 2017.
- VIRAN, R.; ERKOÇ, F. Ü.; POLAT, H.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 55, n. 1, p. 82-85, 2003.
- XING, S. Y.; LI, Z. H.; LI, P.; YOU, H. A mini-review of the toxicity of pollutants to fish under different salinities. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 108, n. 6, p. 1001-1005, 2022. DOI: 10.1007/s00128-022-03528-0.
- WELDETINSAE, A.; DAWIT, M.; GETAHUN, A.; PATIL, H. S.; ALEMAYEHU, E.; GIZAW, M.; ABATE, M.; ABERA, D. Aneugenicity and clastogenicity in freshwater fish *Oreochromis niloticus* exposed to incipient safe concentration of tannery effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, p. 98-104, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.026>.
- WERNER, I.; YOUNG, T. M. Pyrethroid Insecticides - Exposure and Impacts in the Aquatic Environment. **Encyclopedia of the Anthropocene**, 119-126. 2018. DOI: 10.1016/b978-0-12-809665-9.09992-4.

WITESKA, M. Erythrocytes in teleost fishes: a review. **Zoology and Ecology**, v. 23, n. 4, p. 275-281, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/21658005.2013.846963>.

YANCHEVA, V.; VELCHEVA, I.; STOYANOVA, S.; GEORGIEVA, E. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. **Applied ecology and environmental research**, v. 14, n. 1, p. 47-75, 2016.

YANCHEVA, V.; GEORGIEVA, E.; VELCHEVA, I.; ILIEV, I.; STOYANOVA, S.; VASILEVA, T.; BIVOLARSKI, V.; TODOROVA-BAMBALDOKOVA, D.; ZULKIPLI, N.; ANTAL, L.; NYESTE, K. Assessment of the exposure of two pesticides on common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758): Are the prolonged biomarker responses adaptive or destructive?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 261, p. 109446, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109446>.

YANG, C.; LIM, W.; SONG, G. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 234, p. 108758, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108758>.