



## Avaliação dos efeitos do Roundup® e da hipóxia sobre os parâmetros hematológicos e histologia branquial de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

Julie Andrez Ramos de Andrade Vieira<sup>1</sup>, Grazyelle Sebrenski da Silva<sup>2</sup>

Lorena Vieira de Matos<sup>3</sup>, Maria Inês Braga de Oliveira<sup>2</sup>, Vera Maria Fonseca de Almeida e Val<sup>4</sup>

### Resumo

Na Amazônia o Roundup® (RD) é um herbicida que vem sendo utilizado no combate as ervas daninhas que crescem ao redor dos tanques de piscicultura. O RD é lixiviado para o ambiente aquático, podendo comprometer a saúde dos peixes. Além do impacto dos herbicidas, os peixes precisam desenvolver estratégias para lidar com as oscilações nas concentrações de oxigênio na água. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do RD e posterior hipóxia nos parâmetros hematológicos e na histologia das brânquias de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Para a realização do experimento os peixes (n = 40) foram separados em aquários de vidro individuais e divididos em quatro tratamentos (n = 10), Normóxia (N), Normóxia mais RD (NRD) (75% da CL<sub>50</sub> de RD- concentração nominal de 15 mg.L<sup>-1</sup>), Hipóxia (H) (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) e Hipóxia mais RD (HRD). Após 96 h de experimento, os animais foram individualmente retirados dos aquários e amostras de sangue foram coletadas por punção da veia caudal, com ajuda de seringas heparinizadas para as análises hematológicas, em seguida os animais foram anestesiados em gelo, pesados, mensurados e eutanasiados por secção transversal da medula para a coleta das brânquias e análise histopatológica. Nos parâmetros hematológicos o efeito combinado da hipóxia mais o RD (HRD) levou a uma diminuição nos níveis de hematócrito (Ht) em comparação com a hipóxia (H). A hipóxia amplificou os danos histológicos causados pelo RD, pois os peixes expostos a hipóxia mais RD apresentaram danos branquiais irreparáveis de acordo com o método de análise utilizado.

**Palavras-Chave:** herbicida, *Colossoma macropomum*, hipóxia.

**Evaluation of the effects of Roundup® and hypoxia on hematological parameters and gill histology of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818).** In the Amazon, Roundup® (RD) is an herbicide that has been used to control weeds that grow around fish ponds. The RD is leached to the aquatic environment, which can compromise the health of the fish. In addition to the impact of herbicides, fish need to develop strategies to cope with oscillations in oxygen concentrations in water. The present study aimed to evaluate the effects of RD and posterior hypoxia on hematological parameters and gill histology of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). For the experiment, the fish (n = 40) were separated into individual glass aquariums and divided into four treatments (n = 10), Normoxia (N), Normoxia plus RD (NRD) (75% of LC<sub>50</sub> of RD - nominal concentration of 15 mg.L<sup>-1</sup>), Hypoxia (H) (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) and Hypoxia plus RD (HRD). After 96 h of the experiment, the animals were individually removed from the aquaria and blood samples were collected by caudal vein

<sup>1</sup>Graduada em Ciências Biológicas, ICB, Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Av. Gen. Rodrigo Otávio, 3000, CEP: 69077-000, Coroado II, Manaus, Amazonas - Brasil. [juliandradev@hotmail.com](mailto:juliandradev@hotmail.com)

<sup>2</sup>Professora efetiva do Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Av. Gen. Rodrigo Otávio, 3000, CEP: 69077-000, Coroado II, Manaus, Amazonas - Brasil. [maryabraga@hotmail.com](mailto:maryabraga@hotmail.com), [grazysebrenski@hotmail.com](mailto:grazysebrenski@hotmail.com)

<sup>3</sup>Graduada em Ciências Biológicas e aluna do curso de Mestrado em Zoologia da Universidade Federal do Amazonas-Brasil. [loh.bio@hotmail.com](mailto:loh.bio@hotmail.com)

<sup>4</sup> Pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA), Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69.067-375 - Manaus - Amazonas-Brasil. [veraval30@gmail.com](mailto:veraval30@gmail.com)



puncture using heparinized syringes for hematological analyzes, then the animals were anesthetized on the ice, measured and euthanized by cross-section in the medulla for the collection of the gills and histopathological analysis. In the hematological parameters, the combined effect of hypoxia plus RD (HRD) led to a decrease in hematocrit (Ht) levels compared to hypoxia (H). Hypoxia amplified the histological damage caused by RD, as fish exposed to hypoxia plus RD had irreparable gill damage according to the analysis method used.

**Key-words:** herbicide, *Colossoma macropomum*, hypoxia.

## 1. Introdução

Na Amazônia o herbicida Roundup® (RD), um formulado com glifosato de isopropilamina ( $C_6H_{17}H_2O_5P$ ) vem sendo utilizado no combate às ervas daninhas que crescem ao redor dos tanques de piscicultura e que é lixiviado para o ambiente aquático, podendo comprometer a saúde dos peixes. Estudos recentes demonstraram os efeitos potencialmente negativos dessa categoria de herbicida nos peixes: danos hepáticos, cerebrais e musculares, devido as alterações na atividade da acetilcolinesterase (MODESTO & MARTINEZ, 2010), alterações histopatológicas branquiais e hepáticas (BRAZ-MOTA et al., 2015) e alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo (TEIXEIRA et al, 2018) dentre outros relatos (PIRES et al, 2018; WEBSTER et al, 2014; MARTINEZ & CÓLUS, 2006; BRAZ-MOTA et al., 2015).

Além do impacto dos herbicidas, o efeito do estresse causado pelas oscilações nas concentrações de oxigênio na água precisa ser avaliados. A hipóxia ocorre quando o oxigênio dissolvido na água fica abaixo de um nível que pode sustentar a vida de um organismo (GILMORE et al., 2018). Na Amazônia é comum épocas de oscilação do nível dos rios, onde as concentrações de oxigênio dissolvido na água tornam-se um fator crítico, principalmente nos ambientes recém-alagados de várzea e igapó, quando os rios atingem seus níveis máximos (JUNK et al., 1989). A condição de hipóxia também é um problema generalizado na aquicultura, onde a densidade de estocagem é alta, exigindo o gasto de grandes quantidades de energia na aeração (WANG et al., 2009).

Apesar de o RD ser amplamente utilizado no Brasil, apenas uma quantidade limitada de informações está disponível sobre seus efeitos tóxicos para peixes de água doce nativos e respostas morfofisiológicas (ARAÚJO et al., 2005; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). Além disso, a

hipóxia é um fenômeno natural na Amazônia e precisa ser melhor compreendida, especialmente em áreas onde a biota aquática recebe influência de contaminantes, como o RD. Entre os componentes presentes no RD, estão: 360 g/L de glifosato (N-fosfonometil glicina), um ingrediente ativo formado por  $C_3H_8NO_5P$ ; 480 g.L<sup>-1</sup> de sal de isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina e ingredientes inertes que são relatados com uma mistura de surfactantes contendo 684 g.L<sup>-1</sup> de Amino Polietoxileno (PEOA).

O tambaqui *Colossoma macropomum*, é um peixe nativo da região amazônica e o peixe nativo mais cultivado no Brasil (IBGE, 2016). Alterações histopatológicas branquiais foram relatadas em *Colossoma macropomum* expostos ao RD (BRAZ-MOTA et al., 2015). A brânquia é o órgão mais externo dos peixes, responsável pelas trocas gasosas e iônicas. Devido o seu contato direto com a água, qualquer modificação no seu funcionamento pode provocar lesões no organismo, tornando-a ótima ferramenta para indicação de toxicidade e/ou estresse ambiental (SCHWAIGER et al., 1997; FERREIRA, 2004; CAVALCANTE et al., 2008). Nesse sentido, a histologia é uma ferramenta útil, pois as características teciduais dos órgãos internos podem expressar possíveis efeitos tóxicos de substâncias às quais o animal é exposto (SCHWAIGER et al., 1997).

Não há relatos sobre os efeitos da hipóxia combinada à contaminação por RD para as espécies de peixes amazônicos cultivados. Com isso, o presente trabalho avaliou os potenciais efeitos do emprego do herbicida Roundup® e hipóxia nas respostas hematológicas e histopatológicas do tambaqui *Colossoma macropomum*.

## 2. Material e Método

### 2.1. Coleta e manutenção de peixes



Espécimes de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram adquiridos através de um lote da fazenda Santo Antônio, Rodovia BR-174, km 47 (MD) Presidente Figueiredo-Amazonas (02°02'46,95701" S 059°37'31,23703" W). Após a aquisição, os espécimes foram transportados até o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LEEM-INPA). Os peixes (n = 40) foram separados e aclimatados (30 dias) até o peso ideal ( $81,10 \pm 11,8$  g e  $15,11 \pm 0,30$  cm) para o início do experimento. Os espécimes foram mantidos em um tanque com circulação de água aberta e aeração constante. Todos os procedimentos experimentais foram autorizados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA 011/2013-INPA).

## **2.2. Desenho experimental**

### **2.2.1. Experimento agudo com Roundup® e Hipóxia**

Após o período de aclimação, os peixes foram realocados em aquários de vidro individuais com capacidade de 5 L. O experimento foi dividido em quatro tratamentos com 10 aquários cada: normóxia (N), hipóxia (H), normóxia mais RD (NRD) e hipóxia mais RD (HRD). Para os tratamentos com RD, a concentração subletal escolhida corresponde a 75% da  $CL_{50}$  (concentração nominal de  $15 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de acordo Miyazaki e colaboradores (2004). A concentração de oxigênio para hipóxia (concentração de  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $O_2$ ) foi previamente estabelecida por Silva (2016). Para atingir tal concentração de oxigênio, injetou-se nitrogênio gasoso na água restando apenas 6 horas para o término do experimento.

Após 96 horas de exposição, os animais foram individualmente retirados dos aquários e amostras de sangue foram coletadas por punção da veia caudal, com ajuda de seringas heparinizadas, para análises hematológicas. Em seguida os peixes foram anestesiados em gelo, pesados, mensurados e eutanasiados por secção transversal na medula para a coleta das brânquias e análise histopatológica.

Durante o experimento foi feita diariamente a troca de dois litros de água de cada aquário, a medição de parâmetros como temperatura, oxigênio e pH, e as concentrações de RD restabelecidas.

## **2.3. Procedimentos analíticos**

### **2.3.1. Análise hematológica e glicose plasmática**

Parâmetros sanguíneos como hematócrito (Ht), hemoglobina [Hb], contagem total de eritrócitos (RBC) e concentração de glicose plasmática foram analisados. Os valores de [Hb], RBC e Ht foram utilizados para o cálculo das constantes corpusculares: volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM).

Os níveis de hemoglobina foram mensurados utilizando-se  $10 \mu\text{l}$  de sangue diluído em 2 ml do reagente Drabkin segundo protocolo estabelecido por Kampen e Zijlstra (1964) em um espectrofotômetro (modelo UV-Visible Recording Spectrophotometer-Graphicord) a 540 nm. Para determinar o hematócrito, amostras de sangue foram transferidas para tubos de microhematócrito e centrifugadas durante 10 minutos sendo a leitura do porcentual (%) de sedimentação feita com o auxílio de uma escala padronizada (NAVARRO & PACHALY, 1994). A contagem dos eritrócitos totais (RBC) foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico (Leica DM2015), aumentado em 40x (NAVARRO & PACHALY, 1994). A concentração de glicose plasmática foi mensurada através do método colorimétrico sem desproteinização (GOD-PAP) usando o kit InVitro®. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (modelo Spectra Max Plus 384) a 500nm.

### **2.3.2. Análise histopatológica branquial**

Após a coleta do segundo arco branquial direito de cada peixe, as brânquias foram imediatamente fixadas em solução ALFAC (etanol 80%, formol 37% e ácido acético) por 24 horas. As amostras de brânquias preservadas foram processadas seguindo protocolo proposto por Culling e colaboradores (1985), que consiste em etapas de bateria crescente de desidratação em etanol, diafanização em xilol, impregnação e inclusão do material em parafina e posterior preparação dos cortes histológicos para as análises histopatológicas em microscopia de luz, realizadas no Laboratório de Morfologia Funcional e Histologia - Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os cortes foram realizados seguindo o padrão de espessura de  $5 \mu\text{m}$  no micrótomo semiautomático (Leica RM2245), no plano de



corte transversal e sagital. Em seguida passaram por duas baterias de coloração, a Hematoxilina de Herris e Eosina (H&E) para visualização geral da estrutura do órgão (BANCROFT & GAMBLE, 2002) e o Ácido Periódico-Schiff (PAS) para marcação das células mucosas (PINKY et al. 2008). Após essas etapas, a análise histopatológica foi feita analisando dois cortes para cada espécime (MICHALANI, 1980).

Os danos do tecido branquial foram mensurados semiquantitativamente por meio do índice de alterações histológicas (IAH). O índice não leva em consideração a frequência de ocorrência das alterações, mas sim o grau de severidade das lesões de acordo com seu estágio (Estágio I, II ou III), seguindo os protocolos estabelecidos por Poleksic e Mitrovic – Tutundzic (1994) adaptado por Silva (2004).

No estágio I as alterações não são consideradas muito severas, não afetando o funcionamento do órgão. No estágio II as alterações são moderadas comprometendo o funcionamento do órgão, as alterações são lesões reversíveis, mas se mantidas em exposição crônica podem levar a alterações graves. No estágio III as alterações são severas comprometendo o funcionamento do órgão sendo, irreversíveis.

### 2.3.3. Análise estatística

Os dados obtidos com as análises dos parâmetros hematológicos e das alterações histopatológicas estão expressos como média e erro padrão da média para cada tratamento. A análise estatística foi executada usando o teste ANOVA de dois fatores, as médias foram comparadas pelo teste Tukey tendo como fatores a concentração de oxigênio (normóxia e hipóxia) e a contaminação ou não por Roundup® para determinar as diferenças entre os tratamentos e o grupo controle. As diferenças foram consideradas significativas para os valores de  $P < 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando o programa Sigma Stat 3.5 (ZAR, 1984).

## 3. Resultados e Discussão

No presente estudo, não houve mortalidade dos peixes durante a exposição subletal ao RD no tratamento em normóxia e normóxia e RD (N x NRD). Já no tratamento em hipóxia e em hipóxia e RD (H x HRD) a mortalidade observada foi de um e quatro peixes respectivamente.

Os peixes submetidos a normóxia não apresentaram diferença em relação aos peixes em normóxia e RD (N x NRD) na comparação entre as variáveis hematológicas (Hb, Ht, RBC, HCM, VCM e CHCM) (Tabela 1). Em um trabalho recente sobre o efeito de RD em parâmetros histopatológicos e sanguíneos de *C. macropomum* sem influência da hipóxia (BRAZ-MOTA et al., 2015), os valores obtidos para Hb, HCM e CHCM aumentaram em relação ao grupo controle, e nenhuma diferença significativa entre as variáveis RBC, Ht e VCM foi observada entre todos os grupos. Num estudo com carpa (*Cyprinus carpio*) quando exposta as concentrações de 3, 5, 7 e 12 ppm de RD por 16 dias houve diminuição nos parâmetros Hb, Ht e RBC, e aumento nos valores das constantes corpusculares VCM, HCM e CHCM (GHOLAMI-SEYEDKOLAEI et al., 2013). Os níveis de Ht não apresentaram alteração no bagre (*Rhamdia quelen*) submetido à concentração subletal de glifosato ( $0,730 \text{ mg.L}^{-1}$ ), nome comum do produto comercial Roundup®, correspondente a 10% da  $CL_{50}$  por 96h (KREUTZ et al., 2011). Já a piava (*Leporinus obtusidens*) exposta a diferentes concentrações de RD (2, 6, 10 ad  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ) apresentou uma diminuição nos parâmetros hematológicos avaliados (Hb, Ht e RBC) (GLUSCZAK et al., 2006). A análise hematológica é uma ferramenta eficaz que permite verificar a saúde do animal estressado em curto espaço de tempo (ZHYDENKO, 2008) no entanto, em peixes os estudos evidenciam que as respostas hematológicas estão relacionadas à espécie de peixe, ou seja, é espécie específica, tendo relação com as concentrações do contaminante, tipo de surfactante e tempo de exposição.

Também não houve diferença nos valores dos parâmetros Hb, RBC, HCM, VCM e CHCM na comparação entre os peixes expostos a hipóxia (H x HRD). A concentração de Hb foi maior nos peixes submetidos à hipóxia (H) quando comparados com os peixes em normóxia (N) ( $P = 0,008$ ). O Ht diminuiu nos animais do tratamento HRD quando comparados com os do tratamento H ( $P = 0,006$ ). No presente trabalho, o número de eritrócitos (RBC) aumentou nos peixes em hipóxia (H) quando comparados com os expostos a normóxia (N) ( $P = 0,040$ ), o mesmo ocorreu com o HCM ( $P = 0,047$ ). Os níveis de Ht, Hb, e VCM também aumentaram em *C. macropomum* expostos somente a hipóxia (H), quando comparados com normóxia (N). O tambaqui é uma espécie de peixe

Amazônico com a capacidade de regular os níveis de Ht e Hb se adaptando a baixas concentrações de oxigênio (VAL, 1996). Em teleósteos, o aumento do hematócrito pode surgir de contrações esplênicas, aumentando assim o número total de hemácias em circulação (Lai et al. 2006 ); o aumento do nível de Ht observado no tambaqui pode ser decorrente da contração esplênica, pois a concentração de Hb também aumentou seguida do HCM. O aumento do RBC possivelmente resulta no aumento na circulação de eritrócitos imaturos (SARAVANAN et al., 2011). Evento semelhante foi registrado em carpas (*Cirrhinus mrigala*) sob exposição por 72 h à hipóxia crônica (0,5 mg L<sup>-1</sup> de oxigênio dissolvido) sendo suficiente para potencializar fisiologicamente com valores de RBC, Hb e Ht aumentados (P < 0,05) (VARGHESE et al, 2018).

Peixes expostos a hipóxia mais RD (HRD) apresentaram um aumento nos níveis de glicose plasmática quando comparados com os animais do tratamento H (P < 0,005). Já a concentração de glicose plasmática foi maior nos espécimes contaminados com RD (NRD) quando comparados com os peixes em normóxia sem o contaminante (P = 0,005). Em resposta ao estresse, o organismo se prepara para minimizar os efeitos do agente estressor. Hormônios como catecolaminas e cortisol são liberados, seguidos do aumento dos níveis de glicose (VAL et al., 2004). No presente trabalho, os peixes expostos a normóxia mais RD

(NRD) apresentaram maiores níveis de glicose plasmática do que os expostos somente a normóxia (N). *C. macropomum* submetidos à hipóxia mais RD (HRD) também apresentaram maiores níveis de glicose quando comparados com os peixes do tratamento em hipóxia (H). O contaminante RD teve um efeito estressor em *C. macropomum*, que combinado com a hipóxia foi ainda mais evidente.

Langiano e Martinez (2008) observaram um aumento nos níveis de glicose plasmática em *P. lineatus* exposto a 10 mg.L<sup>-1</sup> de RD por 24h e 96 h. Existem outros herbicidas já identificados na literatura que afetam os níveis de glicose, por exemplo, juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) cronicamente expostas ao verapamil (0,5, 27 e 270 µg.L<sup>-1</sup>), com cloridrato de verapamila (80 mg), apresentaram aumento nos níveis de glicose (LI et al., 2011). *Rhandia quelen* exposto ao herbicida clomazone (0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), com ingrediente ativo clomazona (500 g.L<sup>-1</sup>) também apresentaram aumento nos níveis de glicose.

De acordo com Almeida-Val e colaboradores (2006), a maioria dos peixes Amazônicos está sujeita a oscilações nos níveis de oxigênio da água, apresentando alteração nos níveis de glicose. O ciclídeo *Astronotus crassipinnis*, por exemplo, apresentou aumento na glicose plasmática quando em baixas concentrações de oxigênio, provavelmente devido à ativação da glicogenólise hepática, demonstrada pela queda dos níveis de glicogênio no fígado.

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos do tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidos a diferentes concentrações de O<sub>2</sub> e contaminação por RD. Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). Letras minúsculas representam diferenças significativas (p < 0,05) entre os diferentes tratamentos (N x NRD e H x HRD). O asterisco representa diferença significativa (p < 0,05) entre os tratamentos N x H e NRD e HRD.

Tratamento	[Hb] (g/dL)	Ht (%)	RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	VCM (µm <sup>3</sup> )	HCM (pg)	CHMC (%)	Glicose (mg/dL)
Normóxia (N)	6,41 ± 0,5 <sup>a</sup>	28,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,07 <sup>a</sup>	187,2 ± 4,8 <sup>a</sup>	43,3 ± 2,8 <sup>a</sup>	23,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	54,0 ± 6,4 <sup>a</sup>
Normóxia e RD (NRD)	6,80 ± 0,6 <sup>a</sup>	27,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,03 <sup>a</sup>	187,4 ± 5,9 <sup>a</sup>	47,1 ± 3,3 <sup>a</sup>	25,1 ± 1,7 <sup>a</sup>	96,2 ± 7,5 <sup>b</sup>
Hipóxia (H)	8,27 ± 0,3 <sup>a*</sup>	32,0 ± 0,9 <sup>a*</sup>	1,69 ± 0,08 <sup>a*</sup>	197,6 ± 6,9 <sup>a</sup>	50,8 ± 1,8 <sup>a*</sup>	25,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	35,4 ± 6,8 <sup>a</sup>
Hipóxia e RD (HRD)	7,71 ± 0,2 <sup>a</sup>	27,6 ± 1,0 <sup>b</sup>	1,52 ± 0,09 <sup>a</sup>	182,9 ± 8,6 <sup>a</sup>	51,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	27,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	144,2 ± 20,0 <sup>b*</sup>

Na avaliação histopatológica das brânquias de *C. macropomum*, os peixes do tratamento em hipóxia mais o RD (HRD) foram os mais afetados, pois apresentaram danos irreparáveis do órgão, de acordo com o índice de alterações histopatológicas

(IAH = 117,87 ± 33,87). Os peixes dos tratamentos em NRD e em H apresentaram danos histológicos das brânquias classificados como alterações severas no órgão (Tabela 2), sendo elas: hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, descolamento



epitelial, proliferação de células cloreto e edema, consideradas respostas ao agente estressor, pois indicam a ativação funcional do órgão de osmorregulação.

Sakuragui e colaboradores (2003) afirmam que hipertrofia no epitélio lamelar aumenta a barreira de difusão entre a água e o sangue, reduzindo a capacidade de difusão do tecido quando submetidos ao estresse (Figura 1 e 2). De acordo com Wegner e Graham (2010) em sua revisão

sobre os trabalhos de respiração branquial de George M. Hughes, a ventilação branquial em ambientes com pouco oxigênio ou sob demandas energéticas altas, os peixes necessitam de grandes áreas de superfície branquial para aumentar o consumo de oxigênio e evitam comprometer o equilíbrio entre resistência e custo ventilatório através do espessamento dos filamentos branquiais e das lamelas secundárias seguido da diminuição da área de superfície dos mesmos.

Tabela 2 – Alterações histológicas branquiais com seus respectivos estágios de comprometimento funcional (I, II e III), e a média e desvio padrão de ocorrência destas alterações em *C. macropomum* expostos a hipóxia e/ou Roundup®, durante período de 96 h.

Classificação das lesões	Estágio	Tratamentos			
		Normóxia	Normóxia + RD	Hipóxia	Hipóxia + RD
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	+	++	++	+
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	+	++	+	++
Fusão das lamelas	I	0+	0+	+	+
Dilatação capilar	I	0	0	0	0
Descolamento epitelial	I	0+	++	+	+
Constricção capilar	I	+	+	+	++
Proliferação de células cloreto	I	0+	++	+	++
Proliferação de células mucosas	I	++	0	0	0
Edema	I	0	0	0+	+
Parasitas	I	0	0	0	0
Ruptura epitelial (hemorragia)	II	0+	++	+	+
Aneurisma Lamelar	II	0	0+	+	+
Necrose	III	0	+	+	+
Índice de alterações histológicas (IAH)		4,58 ± 1,03	61,41 ± 1,35	65 ± 1,99	117,87 ± 33,87
Nível de alteração do órgão		Funcionamento normal do órgão	Alterações severas no órgão	Alterações severas no órgão	Danos irreparáveis no órgão

Nota: 0 = ausente; 0+ = pouco frequente; ++ = frequência moderada; +++ = muito frequente.

Segundo Cengiz e Unlu (2002), a fusão lamelar pode constituir um mecanismo de proteção do peixe, pois decorre do aumento da adesão entre as células epiteliais e o sistema de sustentação das células pilares, associado ao colapso da integridade da estrutura da lamela secundária, diminuindo a área de exposição das lamelas ao agente tóxico. Outras alterações, como a ruptura do epitélio lamelar, aneurisma e necrose, correspondem aos danos mais graves causados pela exposição ao herbicida sobre o tecido e, portanto, representam lesões que podem culminar no comprometimento do órgão.

A proliferação de células cloreto no tratamento com o contaminante (NRD) pode ser um dos possíveis desencadeadores das alterações mais

severas, como mostra a Figura 1. Essa célula é responsável pelas trocas iônicas, absorvendo os íons  $Cl^-$  e  $Ca^{2+}$  e sua proliferação nas brânquias causa um aumento na distância de difusão água-sangue, menor absorção de água e trocas gasosas (PERRY, 1997).

O sargo de Wuchang (*Megalobrama amblycephala*) exposto a hipóxia ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) por 4 e 7 dias, foi capaz de alterar a área de superfície respiratória em resposta à hipóxia e à variação nas temperaturas (10 e 25 °C). Wu e colaboradores (2017) relataram constricção capilar no ciprinídeo em hipóxia. Assim como, redução significativa na concentração de cloreto plasmático ( $[Cl^-]$ ) e aumento significativo ( $P < 0,01$ ) na contagem de eritrócitos (RBC) e Hb.

O peixe-gato listrado (*Pangasianodon hypophthalmus*) foi exposto a diferentes temperaturas (27 e 33 °C) e diferentes níveis de saturação de ar (de 92% até 35%) de PO<sub>2</sub> 55 mmHg durante seis semanas no trabalho de Phuong e colaboradores (2017), para estimar o impacto negativo da temperatura sob hipóxia. As

concentrações revelaram aumento de dilatação capilar na maior saturação, isso se deve para a manutenção do peixe através da ventilação constante. O mesmo ocorreu no presente trabalho pelo aumento significativo de Hb nos espécimes expostos ao tratamento Hipóxia.

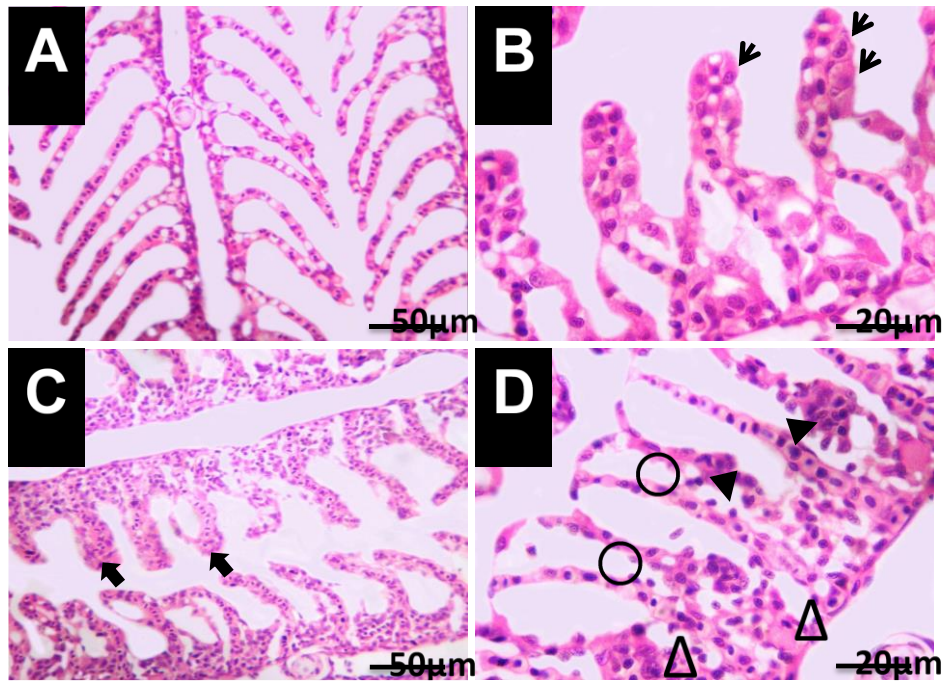


Figura 1 - Alterações histopatológicas das brânquias de *C. macropomum* expostos a Normóxia (N) e Normóxia + RD (NRD). A- Normóxia. Coloração: H&E; B- Proliferação de células cloreto (seta fina) em NRD, H&E; C- Constrição capilar em NRD (seta grossa), H&E; D- Edema (cabeça de seta branca), descolamento epitelial com fusão lamelar (círculo) e hipertrofia de células epiteliais em NRD (cabeça de seta preta), H&E.

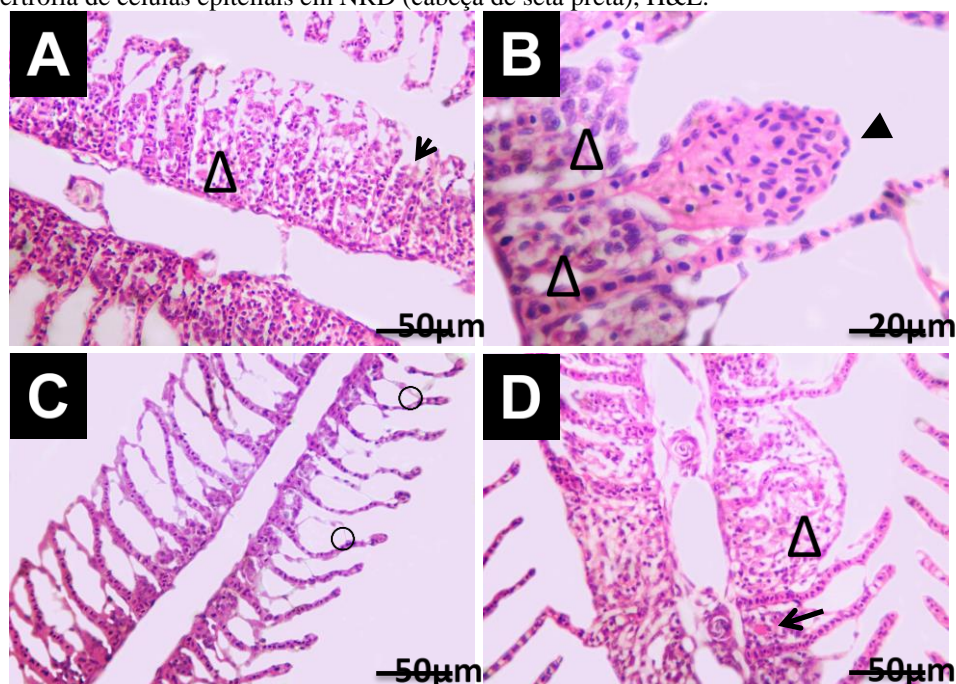


Figura 2 - Alterações histopatológicas das brânquias de *C. macropomum* expostos a Hipóxia (H) e Hipóxia e RD (HRD). A- Hiperplasia do epitélio lamelar (seta fina) e edema (cabeça de seta branca) em Hipóxia. B- Aneurisma lamelar (cabeça de seta preta) e edema (cabeça de seta branca) nos dois tratamentos. C- Descolamento epitelial (círculo) em HRD. D- Edema (cabeça de seta branca), constrição capilar (seta grossa) e aparecimento de célula mucosa (seta fina longa) em HRD. Coloração: H&E.

Shiogiri e colaboradores (2012) verificaram um aumento nas células cloreto e outras alterações de estágio I, na menor concentração de RD-Ready (3,0, 3,5 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>), em *Piaractus mesopotamicus* após exposição em curto prazo (48h). Neste caso, a utilização de outro tipo de RD (RD Ready) influenciou as respostas da morfologia das brânquias pela maior concentração de glifosato e surfactante respectivamente (480 e 648 g.L<sup>-1</sup>) na sua formulação, enquanto o presente trabalho possui 360 e 480 g. L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Jiraungkoorskul e colaboradores (2002) encontraram alterações, como hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, edema e aneurisma em tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a CL<sub>50</sub> de Roundup® em jovens (17,5, 17,1, 16,9 e 16,8 mg.L<sup>-1</sup>) e adultos (46,9, 44,4, 40,0 e 36,8 mg.L<sup>-1</sup>) por 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente. Comparando os valores encontrados no presente trabalho com os espécimes de tambaqui, as alterações histopatológicas apresentaram

similaridades aos encontrados em tilápia quando estes foram expostos por 48h, como edema e aneurisma. Thophon e colaboradores (2003) referem-se a presença de edema acompanhado pelo descolamento do epitélio lamelar como sendo um primeiro sinal patológico em peixes.

Os peixes expostos ao tratamento controle (Normóxia) apresentaram proliferação de células mucosas nas lamelas secundárias, responsáveis pela secreção de mucossubstâncias, fato esse que não foi observado no tratamento em hipóxia. Este último apresentou proliferação de células de cloreto como prioridade para o peixe, sugerindo que qualquer aumento na produção do muco dificultaria a regularização osmótica. Essas alterações foram identificadas utilizando o método do Ácido Periódico-Schiff (PAS), que evidencia a presença de mucossubstâncias com hexoses neutras, açúcares e/ou ácidos siálicos, como mostra a figura 3A.

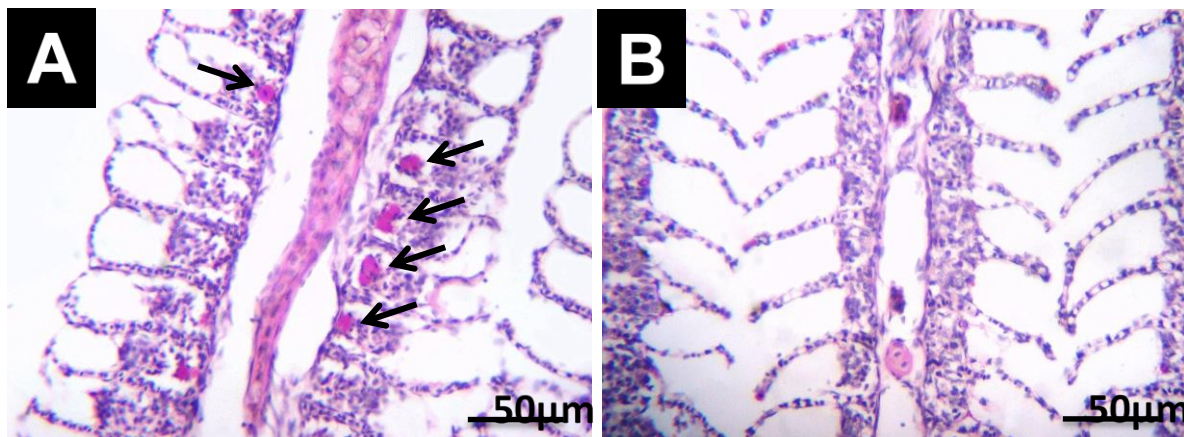


Figura 3 - Visão geral de brânquias de *C. macropomum* com reação positiva de células mucosas pelo método de PAS (Periódico de Schiff). A- Normóxia, com proliferação de células produtoras de muco (\*); B- Hipóxia.

A presença de ruptura epitelial, aneurisma e necrose encontrada nos grupos expostos à hipóxia e Roundup® apresentou maior intensidade em relação ao tratamento Normóxia (Tabela 2). E a análise quantitativa das lesões branquiais (Figura 4) mostrou que os animais expostos ao Roundup® em todos os tratamentos foram os mais afetados, com valores médios de IAH de  $61,41 \pm 1,35$  (NRD) e de  $117,87 \pm 33,87$  (HRD), indicando a ocorrência de alterações severas e danos irreparáveis no órgão, respectivamente. Já o valor médio de IAH para o tratamento somente em hipóxia ( $65 \pm 1,99$ ) indicou a ocorrência de alterações severas no órgão.



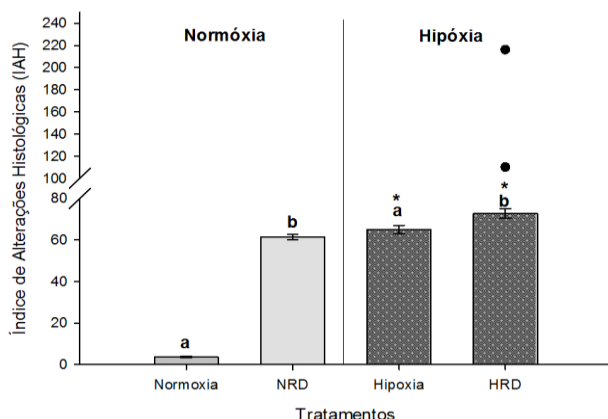


Figura 4 - Índice de danos histopatológicos das brânquias de *C. macropomum* submetidos à Normóxia (N); Normóxia e Roundup® (NRD); Hipóxia (H); Hipóxia e Roundup® (HRD). As letras indicam diferença estatística na comparação pela presença do RD. (\*) indica diferença estatística na comparação considerando concentração de O<sub>2</sub>. (●) significa outliers que não entraram na estatística e não passaram no teste de normalidade e variância.

De acordo com Karlsson-Norrgrén e colaboradores (1985), hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, fusão lamelar, constrição capilar e proliferação de células cloreto funcionam como mecanismos de defesa, pois diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentam a barreira de difusão ao poluente. Tais respostas dificultam o acesso do contaminante ao sangue prejudicando, contudo, a realização de trocas gasosas (MCDONALD & WOOD, 1993).

Lesões histopatológicas similares, mas em maior frequência, foram encontradas nos peixes expostos a hipóxia com 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub> (Figura 1 e 3), como hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar, fusão lamelar, constrição capilar, proliferação de células cloreto, edema e principalmente as de estágios II e III (Tabela 2). Essas lesões influenciam na manutenção metabólica do organismo, na qual o peixe pode apresentar em casos severos a presença de aneurismas. Em outros casos, as alterações significam o extravasamento de sangue no interior da lamela, causando um rompimento das células pilares e consequente dilatação dos canais sanguíneos (WINKALER et al., 2008).

Mustafa e colaboradores (2011) relataram essas alterações quando expuseram carpas (*Cyprinus carpio*) às condições de normóxia, com hipóxia e hiperóxia nas concentrações de 7,10 ± 1,04, 1,80 ± 1,10 e 12,30 ± 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub>, respectivamente,

por 30 dias, com a concentração de hipóxia maior que a usada no presente trabalho. Ambos os peixes usados como objeto de estudo têm tolerância a hipóxia e apresentaram mudanças branquiais na tentativa de regularizar as trocas gasosas e sanguíneas, como espessamento da lamela primária e aneurismas resultando em fusão da lamela secundária e consequente bloqueio na absorção, bioconcentração e excreção de substâncias tóxicas (AMEUR, 2015).

Não há trabalho descrevendo os efeitos da hipóxia combinada ao RD nas espécies de peixes da Amazônia. Somente o experimento recente de Braz-Mota e colaboradores (2015) que analisaram os parâmetros hematológicos e histopatológicos do RD sem hipóxia corroboram as observações realizadas no presente trabalho, registrados como: hiperplasia, aneurisma e ruptura do epitélio lamelar e proliferação das células de cloreto causadas por 75% de RD (15 mg L<sup>-1</sup> de glifosato).

#### 4. Conclusão

O presente estudo demonstrou os efeitos tóxicos do herbicida Roundup® em *C. macropomum*, sendo intensificado pela hipóxia, exigindo gasto de energia para tentativa de constante proteção contra o contaminante, além do aumento de células responsáveis pelo transporte de oxigênio disponível no momento. As alterações teciduais confirmam o impacto de ambos os agentes, principalmente em conjunto, os quais causaram danos irreparáveis nas brânquias pelo aumento e modificação de células reguladoras do sistema fisiológico, na tentativa de minimizar os efeitos do contaminante.

O trabalho teve como finalidade desenvolver uma análise prática e aprofundada de um organismo afetado sob estresse, indicando a necessidade de pesquisas mais acentuadas acerca dos mecanismos respiratórios em função da disponibilidade de oxigênio e da presença de contaminante, como o Roundup®.

#### Agradecimentos

Agradecemos à equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo apoio na realização do experimento, e à equipe do Laboratório de Morfologia Funcional e Histologia da Universidade Federal do Amazonas pela contribuição com o preparo do material histológico. Agradecemos também o apoio



financeiro da FAPEAM e CNPq através do INCT-ADAPTA concedido ao Dr. Adalberto Luis Val (ALV).

### Divulgação

Este artigo é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

### Referências

- ALMEIDA-VAL, V.M.F., CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P. **Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon.** In: VAL, A.L., ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (eds) *The Physiology of Tropical Fishes*, Series Fish Physiology. Elsevier, London, v. 21, p. 443-500, 2006.
- AMEUR, W.B. **Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia.** *Chemosphere*, v. 135, p. 67-74, 2015.
- ARAÚJO, R.S. **Toxicidade água do herbicida Glifosato para *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), em condições tropicais.** In: Jornada de Iniciação Científica/Programa PIBIC/CNPq – Embrapa Amazônia Ocidental, 2005.
- BANCROFT, J. D. & GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques.** 5th. Ed. Edinburgh. Churchill Livingstone Pub. v. 172-5, p. 593-620, 2002.
- BRAZ-MOTA, S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; DUARTE, R.M.; VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. **Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*.** *Chemosphere*, v. 135, p. 53-60, 2015.
- CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. **Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*.** *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 655, p. 41-46, 2008.
- CENGIZ, E.I. & UNLU, E. **Histopathological changes in the gills of mosquito fish *Gambusia affinis* exposed to endo sulfan.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 68, p. 290-296, 2002.
- CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR W.T. **Cellular Pathology Technique.** 4<sup>th</sup> ed. Butterworth, London, p.214-255, 1985.
- FERREIRA, C.M. **Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática.** In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds). *Sanidade de organismos aquáticos*. SP: Varela, p. 273-284, 2004.
- GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S.J.; MIRVAGHEFI, A.; FARAHMAND, H.; KOSARI, A.A.; GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S. J.; GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S.J. **Optimization of recovery patterns in common carp exposed to Roundup using response surface methodology: evaluation of neurotoxicity and genotoxicity effects and biochemical parameters.** *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 98, p. 152-161, 2013.
- GILMORE, K.L.; DOUBLEDAY, Z.A.; GILLANDERS, B.M. **Testing hypoxia: physiological effects of long-term exposure in two freshwater fishes.** V.186, pp 37-47, 2018.
- GLUSCZAK, L.; DOS SANTOS MIRON, D.; CRESTANI, M.; DA FONSECA, M.B.; DE ARAÚJO PEDRON, F.; DUARTE, M.F.; VIEIRA, V.L.P. **Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*).** *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 65, n. 2, p. 237-241, 2006.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal.** Rio de Janeiro, Brasil, v. 44, p.51, 2016.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASIGRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. **Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Science Asia*, v. 28, p. 121-127, 2002.
- JUNK, W.J.; BAILEY, P.B.; SPARKS, R.E. **The flood-pulse concept in river-floodplain systems.** In: DODGE, D. (Ed), **Proceedings of the International Larger River.** Symposium Canadian. Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences, p. 106-127, 1989.



- KAMPEN, E.J. & ZIJLSTRA, W.G. **Standardization of haemoglobinometry.** In: BOROVICZÉNY, C.G. (Ed.) **Erythrocytometric Methods and their standardization.** Bibliotheca Haematologica, p. 68-72, 1964.
- KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; HAUX, C. **Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton- uchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson.** Journal of Fish Biology, v. 27, p. 81-95, 1985.
- KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; DE FARIA VALLE, S.; DE OLIVEIRA SILVA, T.; ANZILIERO, D.; DOS SANTOS, E. D.; ...; ZANATTA, R. **Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate.** Fish & shellfish immunology, v. 30, n. 1, p. 51-57, 2011.
- LANGIANO, C.V. & MARTINEZ, C.B. **Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 147, n. 2, p. 222-231, 2008.
- LAI, J. C; KAKUTA, I; MOK, H. O; RUMMER, J. L; RANDALL, D. **Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen.** J. Exp. Biol. 209(14): 2734-2738, 2006.
- LI, Z.H.; VELISEK, J.; ZLBEK, V.; GRABIC, R.; MACHOVA, J.; KOLAROVA, J.; ...; RANDAK, T. **Chronic toxicity of verapamil on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on morphological indices, hematological parameters and antioxidant responses.** Journal of Hazardous Materials, v. 185, n. 2, p. 870-880, 2011.
- MARTINEZ, C.B.R. & CÓLUS, I.M.S. **Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi.** In: Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.A.; Pimenta, J.A. (Eds.). A bacia do Rio Tibagi. Londrina, 2006.
- MCDONALD, D.G. & WOOD, C.M. **Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish.** In: RANKIN, J.C.; JENSEN, F.B., editors. Fish Ecophysiology. London, UK: Chapman & Hall, p. 297-321, 1993.
- MODESTO, K.A. & MARTINEZ, C.B.R. **Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*.** Chemosphere, v. 78, p. 294-299, 2010.
- MICHALANI, Y.J. **Técnica histológica em Anatomia Patológica, com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico.** SP: EPU, p. 277, 1980.
- MIYAZAKI, D.M.Y.; MACHADO NETO, J.G.; CASTAGNOLLI, N. **Toxicidade aguda de triclofon, paration metílico e glifosato para alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e tambacu (*C. macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*).** In: Anais Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, Laguna. Maringá: Biblioteca Setorial da UEM, v. 8, p. 203, 2004.
- MUSTAFA, S.A.; AL-SUBIAI, S.N.; DAVIES, S.J.; JHA, A.N. **Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L.** Ecotoxicology, v. 20, n. 6, p. 1455-1466, 2011.
- NAVARRO, C.E.K.G. & PACHALY, J.R. **Manual de hematologia veterinária.** São Paulo: Varela, p. 74-75, 1994.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. **Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France.** Aquatic Toxicology. v. 74, p. 53-69, 2005.
- PERRY, S.F. **The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes.** Annual Review Physiology, v. 59, p. 325-347, 1997.
- PHUONG, L.M.; NYENGAARD, J.R.; BAYLEY, M. **Gill remodelling and growth rate of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* under impacts of hypoxia and temperature.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, n. 203, p. 288-296, 2017.
- PINKY; MITTAL, S.; MITTAL, A.K. **Glycoproteins in the epithelium of lips and associated structures of a hill stream fish *Garra lamta* (Cyprinidae, Cyprinoformes): a histochemical investigation.** Anatomy of Histology and Embryology, n. 37, p. 101-113, 2008.
- PIRES, A.A.; MANELLI-OLIVEIRA, R.; BOSCHINI-FILHO, J. **Evaluation of Micronuclei**



**frequencies and other nuclear alterations in Erythrocytes of *Tilapia rendalli* (Perciformes: cichlidae) induced by Roundup® herbicide.**

Journal of Fisheries Sciences, v.12, p. 029-032, 2018.

POLEKSIC, V. & MITROVIC-TUTUNDŽIC, V. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution.** IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish.** Oxford: Fishing News Books, v. 30, p. 339-352, 1994.

SAKURAGUI, M.M.; SANCHES, J.R.; FERNANDES, M.N. **Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*.** Journal of Comparative Physiology, v. 173, p. 309-317, 2003.

SARAVANAN, M.; KARTHIKA, S.; MALARVIZHI, A.; RAMESH, M. **Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses.** Journal of hazardous materials, v. 195, p. 188-194, 2011.

SCHWAIGER, J.; WANDE, R.; ADM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN R. **The use of histopathologic indicators to evaluate contaminant related stress in fish.** Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, v. 6, pp. 75-86, 1997.

SHIOGIRI, N.S.; PAULINO, M.G.; CARRASCHI, S.P.; BARALDI, F.G.; CRUZ, C.; FERNANDES, M.N. **Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 34, n. 2, p. 388-396, 2012.

SILVA, A.G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática.** Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Londrina, 2004.

SILVA, G.S.D. **Influência dos contaminantes ambientais Benzo[a]pireno e Roundup® sobre *Colossoma macropomum* submetida à hipóxia e mudanças climáticas: respostas genéticas, fisiológicas e histológicas.** Tese (Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEv)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, p. 184, 2016.

TEIXEIRA, J.M.S.; LIMA, V.S.; MOURA, F.R.; MARISCO, P.C. **Acute toxicity effects of Roundup Original® on pintado da Amazônia.** Environmental Science and Pollution Research. V.25, p. 25383-25389, 2018.

THOPHON, S.; KRUAETRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, A. **Histopathological alterations of white seabass *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure.** Environmental Pollution, v. 121, p. 307-320, 2003.

VAL, A.L. **Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon.** In VAL, A.L., ALMEIDA-VAL, V.M.F. & RANDALL, D.J. (Eds.). **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon.** Manaus: INPA. p. 59-73, 1996.

VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. **Estresse em peixes- Ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos.** In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M.A.P. (Orgs.). **Sanidade de Organismos Aquáticos, Varela, São Paulo, p. 75-78. 2004.**

VARGHESE, T.; PAL, A.K.; MISHAL, P.; SAHU, N.P.; DASGUPTA, S. **Physiological and Molecular Responses of a Bottom Dwelling Carp, *Cirrhinus mrigala* to Short-Term Environmental Hypoxia.** Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 18, n. 3, p. 483-490, 2018.

WEBSTER, T.M.U.; LAING, L.V.; FLORENCE, H.; SANTOS, E.M. **Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*).** Environmental Science Technology, v. 48, p. 1271-1279, 2014.

WINKALER, E.U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. **Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, PR.** Acta

Scientiarum. Biological Sciences, v. 23, p. 507-514, 2008.

WU, C.B.; LIU, Z.Y.; LI, F.G.; CHEN, J.; JIANG, X.Y.; ZOU, S.M. **Gill remodeling in response to hypoxia and temperature occurs in the hypoxia sensitive blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*).** Aquaculture, n. 479, p. 479-486, 2017.

WANG, T.; LEFEVRE, S.; THANH HUONG, D.T.; CONG, N.V.; BAYLEY, M. **The**



Ciências Ambientais

**Scientia Amazonia, v. 8, n.2, CAm16-CAm28, 2019**

Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910

**effects of hypoxia on growth and digestion  
Fish Physiol.**, v.27 , p. 361-396, 2009.

WEGNER, N. C. & GRAHAM, J. B. **George Hughes  
and the history of fish ventilation: From Du  
Verney to the present.** Comparative  
Biochemistry and Physiology, Part A v. 1-6, p. 157,  
2010.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis.** 2nd Edition,  
Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, p. 718, 1984.

ZHYDENKO, A.O. **Dynamics of the Juvenile  
Carps' Hematological Parameters under the  
Impact of Herbicides.** Hydrobiological Journal,  
v. 44, n. 5, 2008.