



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

PERFIL ELETROLÍTICO E MORFOLOGIA BRANQUIAL EM TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS À LAMBDA CIALOTRINA

Alexandre Welzel da Silveira

CAMPO GRANDE, MS

2019



Lombada

ANO 2019

PERFIL ELETROLÍTICO E MORFOLOGIA BRANQUIAL EM TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS À LAMBDA CIALOTRINA

AUTOR SILVEIRA



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**PERFIL ELETROLÍTICO E MORFOLOGIA BRANQUIAL EM TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS A LAMBDA CIALOTRINA**

Electrolytic profile and branchial morphology in tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposed
lambda cialotrina

Alexandre Welzel da Silveira

Orientador: Professor Dr. Carlos Eurico Fernandes

Dissertação a ser apresentada à Universidade Federal de Mato grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Anima /Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2019

Certificado de aprovação

Alexandre Welzel da Silveira

Perfil eletrolítico e morfologia branquial em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*)
expostos a lambda cialotrina

Electrolytic profile and gill morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
exposed to lambda cyhalothrin

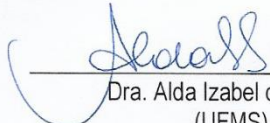
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovado(a) em: 15-08-2019

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
Orientador (UFMS)



Dra. Alda Izabel de Souza
(UFMS)



Dr. Fernando de Almeida Borges
(UFMS)



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Dedicatória

“A deus, a minha mãe e pai e irmãos, pelos apoio de todos dias,

A minha família pelo alicerce,

Aos amigos que me ajudaram neste trabalho,

e ao meu orientador pelos conselhos” ...

...Dedico este trabalho”



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Irdo e Iolanda, e aos meus irmãos Alexsandro e Elaine. O amor de vocês é a força que impulsiona meus objetivos.

Ao meu orientador Prof. Carlos Eurico, pelos ensinamentos compartilhados neste tempo de convivência. Os diálogos no laboratório fazendo que o trabalho rendesse muito mais, auxiliando no meu crescimento profissional.

Aos amigos do no Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX): André, Bruna, Taynara, Lilian e Karine.

Ao Sr. Eliser, pelo cuidado diário com os peixes.

Ao Profa. Dr. Alda Izabel de Souza, por ter aberto as portas de seu laboratório para minhas análises.

Ao Prof. Dr. Jeandre, por ter aberto as portas de seu laboratório para minhas análises.

Ao Prof. Dr. Jayme, por ter aberto as portas das pisciculturas para meu experimento e pelo fornecimento das tilápias do nilo ao nosso laboratório.

À banca avaliadora, pelas valiosas contribuições.

À secretária da PPGcianial, pela gentileza e eficiência.

Este trabalho foi financiado pela CAPES

Obrigado!



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Epigrafo

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”,

(Arthur Schopenhauer)



Resumo

Autor, Alexandre Welzel da Silveira. Perfil eletrolítico e morfologia branquial em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a lambda cialotrina. Ano 2019. Dissertação- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

A lambda cialotrina é um piretroíde sintético que mimetiza a estrutura e as propriedades inseticidas da piretrina, um inseticida natural derivado das flores do crisântemo. Esse princípio ativo tem sido extensivamente empregado na agropecuária para controle de pragas tendo um alto potencial de contaminação nos corpos d'água. Nos peixes, seu mecanismo de ação é semelhante ao dos piretróides, atua como um disruptor do sistema nervoso, causando paralisia motora associada a várias outras alterações com níveis variados de mortalidade. O objetivo deste estudo foi determinar a CL-50 ($\mu\text{g/L}^{-1}$) bem como avaliar as respostas da Acetilcolinesterase ($\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg ptn}^{-1}$), do perfil eletrolítico e das alterações histológicas branquiais em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes períodos de exposição (24, 96, 168 e 240 horas pós exposição - *hpe*). Para isso, foram conduzidos dois experimentos. No primeiro, determinou-se a CL-50 que resultou em $22,6 \pm 4,1 \mu\text{g/L}^{-1}$. No segundo, identificou-se alterações no perfil eletrolítico em espécimes submetidos a essa concentração. Houve efeito da lambda-cialotrina na função motora neuronal as 24 *hpe*, seguido de elevação nos níveis de potássio (mmol/L), cálcio (mmol/L), hidrogênio (mmol/L) e glicose (mg/dL) em relação ao grupo controle. Lactato (mg/dL) e hidrogênio foram superiores aos controles as 168 e 240 *hpe*, respectivamente. Bicarbonato (mmol/L), sódio (mmol/L) e cloreto (mmol/L) aumentaram seu níveis as 240 *hpe*, embora não tenham havido diferença nos níveis de pH. Houve aumento no índice de alterações histológicas (IAH) em todos os períodos estudados em relação aos controles, não havendo diferenças entre os espécimes expostos. As alterações variaram desde hiperemia do epitélio branquial com fusão parcial de lamelas secundárias as 24 *hpe* até necrose do epitélio lamelar com a formação de aneurismas vasculares as 240 *hpe*. Os resultados demonstraram que a lambda-cialotrina quando aplicada no ambiente aquático na concentração de $22,6 \mu\text{g/L}^{-1}$ causa efeito tóxico em Tilápias do Nilo, embora não seja letal. Alterações osmorregulatórias decorrentes da exposição à lambda-cialotrina estão associadas a alterações na morfologia branquial em todos os períodos de exposição.

Palavras-chave: piretróides, peixes, osmorregulação, histopatologia



Abstract

Autor, Alexandre Welzel da Silveira. Electrolytic profile and gill morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to lambda cyhalothrin. Ano 2019. Dissertação- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

Lambda-cyhalothrin is a synthetic pyrethroid that mimics the structure and insecticidal properties of pyrethrin, a natural insecticide derived from chrysanthemum flowers. This active principle has been extensively used in agriculture for pest control and has a high potential for contamination in water bodies. This active principle has been extensively used in agriculture for pest control and has a high potential for contamination in water bodies. In fish, its mechanism of action is similar to that of pyrethroids; it acts as a disruptor of the nervous system, causing motor paralysis associated with several other alterations with varying levels of mortality. The aim of this study was to determine CL-50 ($\mu\text{g} / \text{L-1}$) as well as to evaluate the responses of Acetylcholinesterase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg ptn}^{-1}$), electrolyte profile and histological gill changes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to different exposure periods (24, 96, 168 and 240 hours post- exposure - *hpe*). For this, two experiments were conducted. In the first, CL-50 was determined, which resulted in $22.6 \pm 4.1 \mu\text{g} / \text{L-1}$. In the second, changes in the electrolyte profile were identified in specimens submitted to this concentration. There was an effect of lambda-cyhalothrin on neuronal motor function at 24 *hpe*, followed by elevated levels of potassium (mmol / L), calcium (mmol / L), hydrogen (mmol / L) and glucose (mg / dL) group control. Lactate (mg / dL) and hydrogen were higher than controls at 168 and 240 *hpe*, respectively. Bicarbonate (mmol / L), sodium (mmol / L) and chloride (mmol / L) increased their levels to 240 *hpe*, although there was no difference in pH levels. There was an increase in the index of histological changes (AHI) in all the periods studied to the controls, and there were no differences between the exposed specimens. The changes ranged from hyperemia of the branchial epithelium with partial melting of secondary lamellae at 24 h to necrosis of the lamellar epithelium with the formation of vascular aneurysms at 240 hp. The results demonstrated that lambda-cyhalothrin when applied in the aquatic environment at $22.6 \mu\text{g} / \text{L-1}$, causes a toxic effect on Nile Tilapia, although it is not lethal. Osmoregulatory changes due to exposure to lambda-cyhalothrin are associated with changes in gill morphology at all periods of exposure.

Key-words: pyrethroids, fish, osmoregulation, histopathology



Lista de ilustrações

Figura 1 – Taxa de mortalidade em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à diferentes concentrações de lambda-cialotrina e respectiva curva para cálculo da $CL_{50}96h$ (IC 95% 7,3 – 15,1 $\mu g/L^{-1}$)	35
Figura 2 – Box plot (mediana, 1º e 3º quartil) para o perfil sérico do sódio, potássio, cloreto e cálcio em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à lambda-cialotrina (11,2 $\pm$ 3,9 $\mu g/L^{-1}$) em diferentes períodos.....	36
Figura 3 – Box <i>plot</i> (mediana, 1º e 3º quartil) para o pH e perfil sérico do lactato, hidrogênio, bicarbonato e glicose em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à lambda-cialotrina (11,2 $\pm$ 3,9 $\mu g/L^{-1}$) em diferentes períodos.....	37
Figura 4 – Box <i>plot</i> (mediana, 1º e 3º quartis) representando os valores medianos e respectivos quartis (1º e 3º) para o perfil da Acetilcolinesterase em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à lambda-cialotrina (22,6 $\mu m/L^{-1}$) em diferentes períodos.....	38
Figura 5 – Box plot (mediana, 1º e 3º quartil) para os índice de alterações histológicas (IAH) branquiais em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à lambda-cialotrina (22,6 $\mu m/L^{-1}$) em diferentes períodos.....	39
Figura 6 – Secções histológicas sagitais branquiais de <i>Oreochromis niloticus</i> expostas à lambda cialotrina.....	40



Lista de tabelas

Tabela 1 – Classificação* das alterações histológicas da brânquia, quanto ao tipo de lesões e dos estágios em que se inserem nos respectivos órgãos.....	34
--	----



Sumario

INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS.....	6
ARTIGO	12
Perfil eletrolítico e histologia branquial em Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas à lambda-cialotrina.....	12
Resumo.....	12
Palavras-chave:	13
Abstract	13
Key-words:	14
Introdução	14
Material e métodos.....	17
Animais e condições experimentais.....	17
Teste de toxicidade aguda (concentração letal 50 - $CL_{50.96h}$)	17
Teste de toxicidade crônica.....	18
Perfil osmorregulatório	18
Histologia branquial.....	18
Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE).....	19
Análise estatística.....	20
Resultados	20
Teste de toxicidade aguda ($CL_{50.96h}$).....	20
Teste de toxicidade crônica e perfil osmorregulatório.....	20
Histologia branquial.....	21
Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE).....	22

Discussão	22
Referências.....	28
APÊNDICE.....	34
Tabela 1. Classificação* das alterações histológicas da brânquia, quanto ao tipo de lesões e dos estágios em que se inserem nos respectivos órgãos.	34
Figura 1. Taxa de mortalidade em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à diferentes concentrações de lambda-cialotrina e respectiva curva para cálculo da $CL_{50}96h$ (IC 95% 7,3 – 15,1 $\mu g/L^{-1}$).	35
Figura 2. Box plot (mediana, 1º e 3º quartil) para o perfil sérico do sódio, potássio, cloreto e cálcio em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à lambda-cialotrina (22,6 $\mu m/L-1$) em diferentes períodos.	36
Figura 3. Box plot (mediana, 1º e 3º quartil) para o pH e perfil sérico do lactato, hidrogênio, bicarbonato e glicose em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à lambda-cialotrina (22,6 $\mu m/L-1$) em diferentes períodos.	37
Figura 4. Box plot (mediana, 1º e 3º quartis) representando os valores medianos e respectivos quartis (1º e 3º) para o perfil da Acetilcolinesterase em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à lambda-cialotrina (22,6 $\mu m/L-1$) em diferentes períodos.	38
Figura 5. Box plot (mediana, 1º e 3º quartil) para os índice de alterações histológicas (IAH) branquiais em <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à lambda-cialotrina (22,6 $\mu m/L-1$) em diferentes períodos.....	39
Figura 6. Secções histológicas sagitais branquiais de <i>Oreochromis niloticus</i> expostas à lambda cialotrina.	41

INTRODUÇÃO

Piretróides são compostos químicos sintéticos derivados das piretrinas, ésteres isolados das flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium* (VALENTIN, 1990). O seu emprego ganhou destaque na agricultura a partir da sua mudança estrutural com o objetivo de conferir maior estabilidade e potencial inseticida à molécula, ainda na década de 70. Devido suas vantagens, sua utilização foi ampliada além da agricultura, incluindo organismos não alvo aos seus efeitos tóxicos (ELLIOTT et al., 1976; EXOBICHON, 1996).

Quimicamente, os piretróides são compostos quirais com número variável de isômeros. São divididos em dois grandes grupos. Grupo 1, são compostos de baixo poder biológico e análogos à piretrina, resmetrina e fenotrin; e os do grupo 2, aqueles que apresentam alto poder biológico por apresentarem um grupamento ciano tais como a cipermetrina, ciflutrin, deltametrina e lambda-cialotrina. Estes são mais potentes e com meia vida maior (ELLIOTT et al., 1976; SUDERLUND et al., 2002; GOULDING et al., 2013 HARVERIN & VORNANEN, 2014).

A lambda-cialotrina ou simplesmente cialotrina (3-(2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil) -2,2-dimetil-ciano(3-fenoxifenil) metil ciclopropanecarboxilato) é um pesticida amplamente utilizado na agricultura e em ambientes urbanos uma vez que controla uma extensa variedade de artrópodes (HART et al., 1997). O seu principal mecanismo de ação está na disrupção da permeabilidade dos canais de sódio e cálcio nas células nervosas que possuem uma voltagem-dependente. Essa ação modifica tanto a cinética de ativação quanto a de inativação das moléculas, provocando despolarização nas membranas celulares (VIJVERBERG & VAM DEM BERCKEM, 1990; NARAHASHI., 1996; SUDERLUND et al., 2002).

Em geral, os piretróides são biotransformados de forma similar nos organismos aquáticos e nos mamíferos, embora esse processo seja altamente variável em função da dose de exposição e da espécie

alvo (COATS, 2008). Biotransformação é um processo catalisado por enzimas cuja função é aumentar a polaridade e subsequente excreção de compostos xenobiótico (SCHLENK et al. 2008). Todos os compostos xenobióticos são biotransformados em duas fases. A fase I, reúne os processos de oxidação, redução e hidrólise, cujo objeto é conferir polaridade ao xenobiótico por expor ou inserir grupamentos sulfidríla, hidroxila, amina ou carboxila, resultando no aumento de sua hidrofiliabilidade. A fase II, compreende os processos de glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com a glutatona e aminoácidos, caracterizando a incorporação de cofatores endógenos às moléculas provenientes das reações de fase I (GEORGE, 1994; SHLENK et al., 2008). Estudos no rato e no camundongo mostram que os piretróides são metabolizados por oxidação e clivagem das cadeias ésteres, as quais são mediadas por diferentes isoformas da citocromo P450 (CYP) e carboxilase, respectivamente. Em *Oreochromis niloticus* e *Prochilodus lineatus*, a lambda-cialotrina é capaz de estimular a glutatona-S-transferase (GST), uma importante enzima do processo de biotransformação na fase II, responsável pela prevenção do estresse oxidativo (DINU et al., 2010; VIEIRA et al., 2018). Como resposta, os peixes intoxicados podem apresentar alterações hematológicas (PIMPAO et al., 2007; EL-SAYED et al., 2007), histopatológicas (CENGIZ, 2006; KAM et al., 2012), bioquímicas e metabólicas (VELISEK et al., 2007; GUARDIOLA et al., 2013), neurotóxicas (KUMAR et al., 2009) e genotóxicas (VELMUGUGAM et al., 2006; MURANLI & GUNER, 2011). O somatório desses efeitos leva à mudanças no comportamento natural nas populações afetadas tais como letargia e paralisia muscular além de maior vulnerabilidade à predação. A maioria dos sintomas de intoxicação provocados pelos piretróides do grupo II são derivados dos seus efeitos no sistema nervoso central, enquanto os piretróides do grupo I causam desregulação nervosa nos sistemas nervoso central e periférico (COATS, 2008).

Os efeitos neurotóxicos causados pela exposição aos piretróides, podem ser avaliados pela atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE) presente no sistema nervoso. A AChE catalisa e hidrolisa a acetilcolina, liberando a sinapse nervosa na junção neuromuscular (PAYNE et al., 1996; STENESH, 1998; PINER & UNER, 2014). Ao ligar-se ao receptor nicotínico da membrana pós-sináptica haverá liberação dos canais de sódio e despolarização na membrana, gerando um novo potencial de ação. (STENESH, 1998). Quando há inibição da AChE haverá bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos resultando na paralização das funções motoras do sistema nervoso (STENESH, 1998). Segundo Wolansky e Harril (2008) todas as categorias de piretróides podem inibir as funções motoras dos peixes independente da espécie, o que os torna bons bioindicadores para estudos toxicológicos e de biomonitoramento em locais contaminados. *Cyprinus carpio*, *Poecilia reticulata* e *Oreochromis niloticus* são espécies sensíveis e apresentam sinais nervosos de perda da função motora quando expostas aos piretróides. (BALINT et al., 1997; MOREIRA et al., 2010; PINER & UNER, 2014). Incoordenação motora, alterações nos movimentos branquiais, natação circular próximo a superfície da água, convulsões e hiperatividade, são prontamente observados, além da hiperexcitabilidade do sistema nervoso e hipóxia cerebral (GOLOW & GODZI, 1994; VIRAN et al., 2003; SAYEED et al., 2003).

O tempo de exposição assim como a dosagem são determinantes para o aparecimento de sintomas e predizer níveis de toxicidade nas populações aquáticas. Além disso, permite estabelecer padrões lesivos no sistema nervoso, respiratório, hepático, renal e no equilíbrio iônico, (CARLSON & ZELIKOFF, 2008; KLEINOW et al., 2008). Na Truta-Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*) a biotransformação e bioexcreção dos piretróides ultrapassa 48 horas, sendo que em aves e mamíferos ocorre em torno de 6 a 12 horas após a exposição (VELISEK et al., 2006). Recentemente foi demonstrado em juvenis de *Prochilodus lineatus* que doses acima de 50 ng⁻¹ são nocivas para a função e morfologia

branquial. As lesões branquiais estão associadas a subta redução da ATPase braquial, resultando no desequilíbrio das bombas de cálcio, sódio-potássio e manganês (NANDA ET AL., 2017; VIEIRA & MARTINEZ, 2018). Além das brânquias, o rim e o fígado tem sido incluídos como órgãos alvo dos piretróides, embora não sejam tão expressivos quanto as brânquias. Degeneração e vacúolos nas células do epitélio tubular, núcleos picnóticos em células do tecido hematopoiético, dilatação dos capilares glomerulares, degeneração glomerular foram descritas na Carpa (*Cyprinus carpio*) enquanto que degeneração hidrópica e necrose foram observadas no fígado (CENGIZ, 2006; YILDIRIN et al., 2006).

Osmorregulação refere-se ao processo pelo qual a pressão osmótica dos fluídos corporais e o volume da água mantem-se relativamente constantes no organismo animal (HEATH, 1995). Nos peixes, a manutenção dos níveis séricos dos eletrólitos responsáveis pelo equilíbrio eletrolítico e homeostasia está na dependência direta da integridade branquial (KLEINOW et al., 2008). As brânquias compõem o sítio primário das trocas gasosas, equilíbrio ácido-base e osmorregulação. O epitélio lamelar branquial é permeável ao O_2 , CO_2 e NH_3 (amônia dissolvida), cuja transferência depende unicamente da difusão passiva (RANDALL, 1990). Em peixes de água doce, a absorção branquial de Na^+ e Cl^- em um meio ambiente hiposmótico, compensa a perda constante de íons a partir da difusão corporal. O mecanismo para ambos é independente embora o Na^+ extruse o Cl^- , H^+ (NH_4^+) e HCO_3^- , para o meio externo, respectivamente (LIN & RANDALL, 1995). Algumas respostas iônicas em peixes exposto aos piretróides já foram descritas. Suvetha et al. (2010) observaram redução na concentração sérica de Na^+ , K^+ e Cl^- em carpas expostas à deltametrina. Em *Clarias batrachus*, Kumar (2012) observou redução nesses mesmos íons. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), assim como a grande maioria dos teleósteos, apresentam cinco arcos branquiais de cada lado da cabeça. Cada arco é composto por lamelas primárias que se dividem em lamelas secundárias. Essas, são responsáveis pelas trocas gasosas. O epitélio das lamelas primárias é do tipo estratificado e não exerce a função respiratória. Porém, o epitélio

das lamelas secundárias é composto por células adaptadas à troca gasosa, é altamente vascularizado e constituído por duas camadas de células epiteliais separadas das células pilares por uma membrana basal (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995). Modificações da arquitetura branquial podem resultar na perda da eficiência respiratória e dos mecanismos de troca com o meio ambiente (REZENDE et al., 2014). Essas alterações foram pouco reportadas em peixes submetidos a longos períodos de exposição.

O uso indiscriminado dos piretróides na agricultura, pecuária e no meio urbano está associado a contaminação dos meios aquáticos como rios, riachos, lagos e lagoas, resultando em significativo impacto ambiental. Os danos ao meio ambiente causados pelo uso excessivo de inseticidas gera danos nocivos à saúde de diferentes organismos aquáticos. Neste sentido, os peixes podem ser usados com bioindicadores ambientais assim como de modelos experimentais para estudos dose-resposta a fim de se estabelecer critérios mais seguros para o uso desses compostos químicos na produção agrícola e pecuária.

REFERÊNCIAS

- ABDULL, N.; VENKATESHWARLU, P.; JANAIHAH, C. Impact of fresh water fish *Channa Puntatus* (bloch). **Journal of pharmacology and toxicology**, v.2, p. 113-119, 2011.
- BADIOU, A.; BELZUNCES, L.P. Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? A study case with deltamethrin. **Chemico Biological Interactions.**, v.175, p. 406-409, 2008.
- BÁLINT, T., et al. Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995. **Ecotoxicology Environmental Safety.**, v.37, p. 17-23, 1997.
- BORGES, A., et al. Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. **Chemosphere**, v.69, n. 6, p. 920-926, 2007.
- BRADBURY, S.P.; COATS, J.R. Comparative toxicology of pyrethroid insecticides. **Reviews Environmental Contamination Toxicology**, v. 108, p. 133-177, 1989.
- CARLSON, E.; ZELIKOFF, J. T. The Immune System of Fish: A Target Organ of Toxicity. In.: Di Giulio, R. T.; Hinton, D. E. **The Toxicology of Fishes**. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, USA, p. 489-529. 2008.
- CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide research: past, present or future? **Annual Review Entomology.**, v.43, p. 1-16, 1998.
- CENGIZ, E. I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n.22, p. 200-204, 2006.
- COATS, J.R. Toxicology of Synthetic Pyrethroid Insecticides in Fish: a Case Study. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, Boca Raton, p. 805-817. 2008.
- COSTIN, D. et al. Effect biochimice si histologice ale expunerii la deltametrin asupra branhiilor de *carassius auratus gibelio*. Lucrări științifice. **Zootehnie și Biotehnologii**, v. 40, n. 1, p. 65-72, 2007.
- DINU, D.; MARINESCU, D.; MUNTEANU, M.C.; STAICU, A.C.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. Modulatory effects of deltamethrin on antioxidant defense mechanisms and lipid peroxidation in *Carassius auratus gibelio* liver and intestine. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 58, n.3, p. 757-764. 2010.
- ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, v.160, p. 27-33, 2001.
- EISLER, R. AND P.H. EDMUNDS. Effect of endrin on blood and tissue chemistry of a marine fish. **Transactions American Fisheries Society**, v. 95, p. 153-159, 1966.
- ELLIOTT, M. Properties and applications of pyrethroids. **Environmental Health Perspectives**, v.14, p.3-13, 1976.

EL-SAYED, Y. S.; SAAD, T. T. Subacute intoxication of a deltamethrin-based preparation (butox® 5% EC) in monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Journal Compilation Nordic Pharmacological Society. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, n.102, p. 293-299, 2007.

EL-SAYED, Y.S; SAAD, T.T.; EL-BAHR, S.M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.24, n.3, p. 212-217, 2007.

ENSIBI, C., et al. 2012. Effects of carbofuran and deltamethrin on acetylcholinesterase activity in brain and muscle of the common carp. **Environmental Toxicology**, v.29, n. 4, p. 386-393, 2014.

EVANS, D.H. An emerging role for cardiac peptide hormone in fish osmoregulation. **Annual Review Physiology**, n. 52, p. 43-60, 1990.

GEORGE, S.G. Enzymology and Molecular Biology of Phase II: Xenobiotic-Conjugating Enzymes in Fish. In.: MaLINS, D.C.; OSTRANDER, G.K. **Aquatic Toxicology**. CRC PRESS, USA, p.37-85. 1994.

GOLOW, A.A; GODZI, T.A. Acute toxicity of deltamethrin and dieldrin to *Oreochromis niloticus* (LIN). **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**., v.52, p.351-354, 1994.

GOULDING, A.T., et al. Reduction in swimming performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.157, n.3, p. 280-286, 2013.

GUARDIOLA, F.A., et al. Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish and Shellfish Immunology**., v.36, p. 120-129, 2014.

HART J.L.; et al. Novel cypermethrin formulation for the control of sea lice on salmon (*Salmo salar*). **Veterinary Record**, v.140, p.179-181, 1997.

HAVERIN, J.; VORNANEN, M. Effects of deltamethrin on excitability and contractility of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 159, p. 1-9, 2014.

HAYA, K. Toxicity of pyrethroids insecticide to fish. **Environmental Toxicology Chemical**., n.8, p. 381-391, 1989.

HEATH, A. G. Osmotic and Ionic Regulation. In. HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. Second Edition. Lewis Publishers, USA, p. 141-170. 1995.

HUGHES, G. M. An introduction to the study of gills. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. Gills. Cambridge: **Cambridge University Press**, p.1-24, 1982.

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

IANG, I.R; IZAH, S.C; JOHNSON, D.T; EJOMARIE, O.O.A. Effects of lambda cyhalothrin on some electrolytes and metabolites in organs of *Parpohiocephalus obscurus*. **Journal bioethanol Research**, v. 3, p. 6-10, 2017.

KAN, Y., et al. 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, p. 170-179, 2012.

KLEINOW, K. M.; NICHOLS, J. W.; HAYTON, W. E.; McKIM, J. M.; BARRON, M. G. Toxicokinetics in Fishes. In.: **The Toxicology of Fishes**. Taylor & Francis Group, LLC, Boca. Raton, FL, US, p. 55-152. 2008.

KÖPRÜCU, K.; AYDIN, R. The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp *Cyprinus carpio* embryos and larvae. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 80, p. 47-53, 2004.

KUMAR, A., et al. λ -cyhalothrin and cypermethrin induced in-vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 93, p. 96-99, 2009.

KUMAR, S. Mode of action of pyrethroid on energy dependent molecules and inorganic ions in *Clarias batrachus*. **International Journal of Biology, Ecology and Environmental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 21-24, 2012.

LIN, H. RANDALL, D. Proton Pumps in Fish Gills. In: WOOD, C. M.; SHUTTLEWORTH, T.J. **Cellular and Molecular Approaches to Fish Regulation**. Academic Press, USA. 229-255. 1995.

McDONALD, D. G.; CAVDEK, V.; ELLIS, R. Gill design in freshwater fishes: interrelationships among gas exchange, ion regulation, and acid-base regulation. **Physiological Zoology**, v. 64, n. 1, p. 103-123, 1991.

MOREIRA, S.M., et al. Ecotoxicological tools for the tropics: Sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.73, p. 893-899, 2010.

MURANLI, F.D.; GÜNER, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambdacyhalothrin. **Mutation Research**, v.726, n. 2, p. 104-108, 2011.

NANDA, J.S.S.; CR MAHAPATRA, C.R.; PANDA, D.; KUND, G.C. Lethal toxicity of deltamethrin and histological changes in the vital organs of fingerlings of *Labeo rohita*. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 5, n.3, p. 506-513. 2017.

NARAHASHI, T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. **Pharmacology Toxicology**, v.78, p. 1-14, 1996.

PAYNE, J.F., et al. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland **Marine Pollution Bulletin.**, v.32, n.2, p. 225-231, 1996.

PIMPÃO, C.T.; ZAMPRONIO, A.R.; SILVA DE ASSIS, H.C. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). **Pesticide Biochemistry Physiology.**, v.88, p. 122-127, 2007.

PINER, P.; ÜNER, N. Neurotoxic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonil butoxide in the brain of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 11, p. 1275-1282, 2014.

POLAT, H.; ERKOÇ, F. U.; VIRAN, R.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 49, p. 39-44, 2002.

REZENDE, K.F.O.; SANTOS, R.M.; BORGES, C.S.; SALVO, L.M. SILVA, J.R.M.C. Histopathological and genotoxic effects of pollution on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) in the Billings Reservoir (Brazil). **Toxicology Mechanisms Methods**, v. 24, n. 6, p. 404-411. 2014.

SARAVANAN, R.; REVATHI, K.; MURTHY, P.B. Lambda cyhalothrin induced alterations in *Clarias batrachus*. **Journal Environmental Biology**, v. 30, n.2, p. 265-270, 2009.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: TAVAREZ-DIAS, M. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. **Macapá: Embrapa Amapá**, 2009.

SATHYA, V., et al. Acute and sublethal effects in an Indian major carp *Cirrhinus mrigala* exposed to silver nitrate: gill Na⁺/K⁺-ATPase, plasma electrolytes and biochemical alterations. **Fish and Shellfish Immunology.**, v.32, p. 862-868, 2012.

SAYEED, I., et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology Environmental Safety.**, v.56, p. 295-301, 2003.

SCHLENK, D.; CALANDER, M.; GALLAGHER, E.P.; GORGE, S.; JAMES, M.; KULMAN, S.W.; Van Den HURK, P.; WILLET, K. Biotransformation in fishes. In.: Di GIULIO, R. T.; HINTON, D.E. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, USA, p.154-234. 2008.

SHASTRY, K.V. AND A. DASGUPTA. Effect of nuvacron on the nutritive value of freshwater teleost fish, *Channa punctatus*. **Journal Environmental Biology**, v. 12, p. 243-395 248, 1991.

SILVA, A.O.F; MARTINES, C.B.R. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the fresh water teleost *Prochilodus lineatus*. **Journal Aquatic Toxicology**, v. 156, p. 161-168, 398 2014.

SINHORIN, V.D.G., et al. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Ecotoxicology Environmental Safety.**, v.106, p. 181-187, 2014.

SODERLUND, D.M., et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v.171, p. 3-59, 2002.

STENESH, J. Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR), **Biochemistry** 1998.

SUVETHA, L.; RAMESH, M.; SARAVANAN, M. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 29, p. 44-49, 2010.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. Second Edition. Kondansha Ltd. Tokyo. 195 p. 1995.

TILAK K.S; SATYAVARDHAN K. Effect of fenvalerate on oxygen consumption and haematological parameters in the fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Journal of Aquatic Biology**., v.17, p. 81-86, 2002.

VALENTINE, W. M. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. **Veterinary Clinic of North America. Small Anim. Practice**, v.20, n.2, p.375-382, 1990.

VELISEK, J., et al. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Medical**, v.51, n.10, p. 469-476, 2006.

VELISEK, J., et al. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.23, n.3, p. 297-301, 2007.

VELMURUGAN. B.; AMBROSE, T.; SELVANAYAGAM, M. Genotoxic evaluation of lambda-cyhalothrin in *Mystus gulio*. **Journal Environmental Biology**., v.27, n.2, p. 247-250, 2006.

VIEIRA; C.E.D.; CLAUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ, C.B. DOS R. The pyrethroid lambda-cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 210, p. 958-967. 2018.

VIJVERBERG, H.P.M.; Van Den BERCKEN, J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. **Critical Reviews in Toxicology**, v.21, p. 105-126, 1990.

VIRAN, R.L. et al. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*poecilia reticulata*). **Ecotoxicology Environmental Safety**., v.55, p.82-85, 2003.

WHEELOCK, C.E., et al. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v.74, n.2, p. 172-192, 2005.

WOLANSKY, M.J.; HARRIL, J.A. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. **Neurotoxicology and Teratology**, v.30, p. 55-78, 2008.

YILDIRIM, M.Z., et al. Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. **Environmental Toxicology**, v.21, n. 6, p. 614-620, 2006.

ARTIGO

Perfil eletrolítico e histologia branquial em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas à lambda-cialotrina

SILVEIRA, A.W.¹; SILVA, A. L. N.²; SOUZA, A. I.³; POVH, J. A.⁴; JAQUES, J. A. S.;
FERNANDES, C. E.⁵.

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Anima/FAMEZ/UFMS;

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Anima/FAMEZ/UFMS;

³Laboratório de Patologia Clínica, FAMEZ/UFMS;

⁴Estação Experimental de Piscicultura/FAMEZ/UFMS;

⁵Laboratório de Patologia Experimental/INBIO/UFMS

Resumo

A lambda cialotrina é um piretroíde sintético que mimetiza a estrutura e as propriedades inseticidas da piretrina, um inseticida natural derivado das flores do crisântemo. Esse princípio ativo tem sido extensivamente empregado na agropecuária para controle de pragas tendo um alto potencial de contaminação nos corpos d'água. Nos peixes, seu mecanismo de ação é semelhante ao dos piretróides, atua como um disruptor do sistema nervoso, causando paralisia motora associada a várias outras alterações com níveis variados de mortalidade. O objetivo deste estudo foi determinar a CL-50 ($\mu\text{g/L}^{-1}$) bem como avaliar as respostas da Acetilcolinesterase ($\mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg-ptn}^{-1}$), do perfil eletrolítico e das alterações histológicas branquiais em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes períodos de exposição (24, 96, 168 e 240 horas pós exposição - *hpe*). Para isso, foram conduzidos dois experimentos. No primeiro, determinou-se a CL-50 que resultou em $11,2 \pm 3,9 \mu\text{g/L}^{-1}$. No segundo, identificou-se alterações no perfil eletrolítico em espécimes submetidos a essa concentração. Houve

efeito da lambda-cialotrina na função motora neuronal as 24 *hpe*, seguido de elevação nos níveis de potássio (mmol/L), cálcio (mmol/L), hidrogênio (mmol/L) e glicose (mg/dL) em relação ao grupo controle. Lactato (mg/dL) e hidrogênio foram superiores aos controles as 168 e 240 *hpe*, respectivamente. Bicarbonato (mmol/L), sódio (mmol/L) e cloreto (mmol/L) aumentaram seu níveis as 240 *hpe*, embora não tenham havido diferença nos níveis de pH. Houve aumento no índice de alterações histológicas (IAH) em todos os períodos estudados em relação aos controles, não havendo diferenças entre os espécimes expostos. As alterações variaram desde hiperemia do epitélio branquial com fusão parcial de lamelas secundárias as 24 *hpe* até necrose do epitélio lamelar com a formação de aneurismas vasculares as 240 *hpe*. Os resultados demonstraram que a lambda-cialotrina quando aplicada no ambiente aquático na concentração de $11,2 \mu\text{g/L}^{-1}$ causa efeito tóxico em Tilápias do Nilo, embora não seja letal. Alterações osmorregulatórias decorrentes da exposição à lambda-cialotrina estão associadas a alterações na morfologia branquial em todos os períodos de exposição.

Palavras-chave: piretróides, peixes, osmorregulação, histopatologia

Abstract

Lambda-cyhalothrin is a synthetic pyrethroid that mimics the structure and insecticidal properties of pyrethrin, a natural insecticide derived from chrysanthemum flowers. This active principle has been extensively used in agriculture for pest control and has a high potential for contamination in water bodies. This active principle has been extensively used in agriculture for pest control and has a high potential for contamination in water bodies. In fish, its mechanism of action is similar to that of pyrethroids; it acts as a disruptor of the nervous system, causing motor paralysis associated with several other alterations with varying levels of mortality. The aim of this study was to determine CL-50 ($\mu\text{g} / \text{L}^{-1}$) as well as to evaluate the responses of Acetylcholinesterase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg ptn}^{-1}$), electrolyte profile and histological gill changes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to different

exposure periods (24, 96, 168 and 240 hours post- exposure - *hpe*). For this, two experiments were conducted. In the first, CL-50 was determined, which resulted in $11,2 \pm 3,9 \mu\text{g/L}^{-1}$. In the second, changes in the electrolyte profile were identified in specimens submitted to this concentration. There was an effect of lambda-cyhalothrin on neuronal motor function at 24 *hpe*, followed by elevated levels of potassium (mmol / L), calcium (mmol / L), hydrogen (mmol / L) and glucose (mg / dL) group control. Lactate (mg / dL) and hydrogen were higher than controls at 168 and 240 *hpe*, respectively. Bicarbonate (mmol / L), sodium (mmol / L) and chloride (mmol / L) increased their levels to 240 *hpe*, although there was no difference in pH levels. There was an increase in the index of histological changes (AHI) in all the periods studied to the controls, and there were no differences between the exposed specimens. The changes ranged from hyperemia of the branchial epithelium with partial melting of secondary lamellae at 24 h to necrosis of the lamellar epithelium with the formation of vascular aneurysms at 240 hp. The results demonstrated that lambda-cyhalothrin when applied in the aquatic environment at $11,2 \mu\text{g} / \text{L}^{-1}$, causes a toxic effect on Nile Tilapia, although it is not lethal. Osmoregulatory changes due to exposure to lambda-cyhalothrin are associated with changes in gill morphology at all periods of exposure.

Key-words: pyrethroids, fish, osmoregulation, histopathology

Introdução

O Brasil vem se destacando no cenário mundial pelo uso de agroquímicos na produção agrícola e pecuária. Considerando a extensão das áreas destinadas à produção deste setor, o emprego de vários agentes químicos têm impactado nas matrizes ambientais e vem se tornando um problema de saúde pública (HÉNAULT-ETHIER, 2015; PIGNATI et al., 2017). Converging com esse cenário, o emprego de compostos químicos direcionados ao controle e proliferação de patógenos na aquicultura brasileira,

vem sendo adotado como uma prática comum de manejo com riscos elevados de contaminação ambiental (MAXIMIANO et al., 2004; CYRINO et al., 2010).

Dentre os principais agroquímicos empregados na aquicultura comercial, destacam-se os piretróides sintéticos (WERNER & YOUNG, 2017). Estes compostos foram concebidos para proporcionar maior atividade residual, maior fotoestabilidade e alta rentabilidade. Segundo Kilgore & Mingyuli (1975), o impacto é maior no meio aquático uma vez que os pesticidas piretróides podem ser transportados para longas distâncias na hidrosfera, afetando em maior escala organismos não-alvos. Os piretróides sintéticos, classificados como tipo II, possuem um grupamento alfa-ciano na sua estrutura, conferindo-lhes alto coeficiente de partição octanol-água e, portanto, elevada hidrofobicidade (LASKOWSKI, 2002).

Como resultado, apresentam maior dissolução na matéria orgânica, maior sedimentação em superfícies aquosas e alta partição no tecido lipídico dos organismos aquáticos (HILL, 1988; WERNER & YOUNG, 2017). Nos peixes, os piretróides induzem efeitos hematológicos (PIMPAO et al., 2007; EL-SAYED et al., 2007), bioquímicos e metabólicos (VELISEK et al., 2007; GUARDIOLA et al., 2013), neurotóxicos (KUMAR et al., 2009), genotóxicos (VELMUGUGAM et al., 2006; MURANLI & GUNER, 2011) além de alterações morfofuncionais em diversos tecidos (CENGIZ, 2006; KAM et al., 2012).

A lambda-cialotrina ou simplesmente cialotrina (*3-(2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil) -2,2-dimetil-ciano(3-fenoxifenil) metil ciclopropanecarboxilato*) é um piretróide do tipo II, amplamente utilizado na agricultura e em ambientes urbanos, uma vez que controla uma extensa variedade de artrópodes (HART et al., 1997). Altas concentrações na água e no sedimento de cipermetrina e lambda-cialotrina já foram reportados na Argentina, Brasil e Paraguai (JERGENTZ et al., 2005; HUNT et al., 2016). O seu principal mecanismo de ação está na disruptura da permeabilidade dos canais de sódio e

cálcio nas células nervosas. Essa ação modifica tanto a cinética de ativação quanto a de inativação das moléculas, provocando despolarização nas membranas celulares (VIJVERBERG & Van Den BERCKEM, 1990; NARAHASHI, 1996; SUDERLUND et al, 2002). Assim, o principal sintoma no início da intoxicação por esses compostos se dá no sistema nervoso central (PINER & UNER, 2014). Os efeitos neurotóxicos causados pela exposição aos piretróides, podem ser avaliados pela atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE) presente no sistema nervoso.

A AChE catalisa e hidrolisa a acetilcolina, liberando a sinapse nervosa na junção neuromuscular (PAYNE et al., 1996). Nos peixes, a inibição da AChE bloqueia a transmissão dos impulsos nervosos resultando na paralização das funções motoras, independente da espécie, o que os torna bons bioindicadores para estudos toxicológicos e de biomonitoramento em locais contaminados. (STENESH, 1998; WOLANSKY & HARRIL (2008).

Além das alterações nervosas, a homeostasia dos íons sódio, potássio, cálcio e magnésio é prontamente alterada em peixes submetidos a tratamentos pela lambda-cialotrina ou por outros piretróides (SUVETHA et al., 2010; KUMAR, 2012; VIEIRA et al., 2018). A osmorregulação dos níveis séricos desses eletrólitos, das trocas gasosas além do equilíbrio ácido-base, depende da integridade branquial (KLEINOW et al., 2008). O epitélio lamelar branquial é permeável ao oxigênio, gás carbônico e amônia dissolvida, cuja transferência depende unicamente de difusão passiva (RANDALL, 1990). Portanto, alterações morfológicas brânquias podem alterar esses mecanismos de troca, levando a efeitos sistêmicos imediatos. Por outro lado, a redução das adenosinatrifosfatases relacionadas ao cálcio, magnésio e sódio, estão associadas à elevação da peroxidação lipídica nas brânquias, fígado, rim, cérebro e músculo indicando possíveis transtornos morfofuncionais (VIEIRA et al., 2018).

Contudo, os efeitos crônico-lesivos branquiais além dos efeitos sobre a osmorregulação sérica não tem sido completamente investigados em peixes submetidos à lambda-cialotrina em diferentes

tempos de exposição. Os objetivos deste estudo foram determinar a CL₅₀ ($\mu\text{g/L}^{-1}$) bem como avaliar as respostas da Acetilcolinesterase ($\mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg-ptn}^{-1}$), do perfil eletrolítico e das alterações histológicas branquiais em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes períodos de exposição

Material e métodos

Animais e condições experimentais

Foram utilizados 170 espécimes de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), de ambos os sexos, oriundas da mesma desova, provenientes da Estação Experimental de Piscicultura da FAMEZ/UFMS. Todos os espécimes foram previamente aclimatados por 15 dias em aquários de 1500 L com sistema semi-estático, temperatura variando entre 23 a 27°C, aeração artificial com renovação de 25% do volume de água a cada 48 horas.

Os animais foram divididos em dois experimentos. No primeiro verificou-se a concentração letal 50 (CL₅₀) e no segundo, espécimes foram expostos a diferentes períodos com a CL₅₀ obtida. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental do INBIO/UFMS. Durante os dois experimentos, a qualidade da água foi monitorada duas vezes ao dia considerando o pH, oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), temperatura (°C), condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}$), nitrito e nitrato (mg L^{-1}). Todos os procedimentos e cuidados experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética e Uso Animal (CEUA/UFMS, protocolo n. 919/2017).

Teste de toxicidade aguda (concentração letal 50 - CL_{50.96h})

Noventa espécimes ($22,2 \pm 1,5$ g) foram aleatoriamente divididos e alocados em seis aquários ($n = 5$ peixes/aquário/3 réplicas) de 110 L. Posteriormente, foram submetidos a uma formulação comercial de lambda-cialotrina (Trinca Caps®, UPL do Brasil, 25% (m/v); [-ciano-3-phenoxibenzil-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil) -2,2-dimethyl-ciclopropanecarboxila]). As concentrações nominais de 0,0,

4,0, 8,0, 16,0, 32,0 e 64,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram aplicadas nos aquários que permaneceram tampados, em sistema estático, como aeração artificial por 96 horas sem incidência de luz solar (APHA-AWWA-WEF, 1998). De hora em hora, os aquários eram examinados para a retirada dos espécimes mortos. Ao final do período, calculou-se a $CL_{50}96h$, pela análise de regressão não linear, método binomial, transformado para o Log. da concentração nominal ($\mu\text{g.L}^{-1}$), com intervalo de confiança de 95%. O *software* GraphPrism 7.0 (Inc. San Diego, CA, USA) foi usado para essa análise.

Teste de toxicidade crônica

Para esse teste foram utilizados 80 espécimes ($139,8 \pm 24,2$ g) divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais que se mantiveram em jejum por até 240 horas em aquários de 1500 L. Durante esse período, não houve renovações parciais de água, porém o monitoramento da qualidade manteve-se conforme as mesmas variáveis reportadas anteriormente. O grupo exposto ($n = 40$) foi submetido a concentração de $11,2 \mu\text{g L}^{-1}$ por 24 ($n = 10$), 96 ($n = 10$), 168 ($n = 10$) e 240 horas ($n = 10$). Para cada período, 10 espécimes aleatórios do grupo não exposto eram avaliados e compuseram o grupo controle.

Perfil osmorregulatório

Após anestesia em solução de eugenol (50 mg/L^{-1}), o sangue foi colhido por punção na veia caudal com seringas (3 ml) e agulhas (21G x 1”) previamente banhadas com solução de heparina (1000 UI/ml). As amostras foram refrigeradas a (5°C) e processadas até 4 horas após a colheita. Uma amostra de sangue total (250 μl) foi obtida para análise dos valores séricos de potássio, sódio, cloro, cálcio, bicarbonato, hidrogênio, pH, lactato e glicose foram determinados por automação, método de eletrodo seletivo, (Cobas TM Auto-Trol Plus B; COBAS 221, Roche[®]).

Histologia branquial

Após a colheita do sangue os animais foram eutanasiados em solução de eugenol (450 mg L^{-1}) seguindo Kildea et al. (2004). Em seguida, fragmentos de brânquias de todos os indivíduos dos respectivos grupos experimentais (expostos e controles), foram fixados em solução tamponada de formol 10% por 24 horas e, posteriormente, transferidos para solução de álcool 70% até processamento histológico. Foram realizados cortes histológicos de $3 \text{ }\mu\text{m}$ em micrótomo rotativo e as secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Os cortes foram analisados em microscopia de campo claro.

As alterações encontradas foram classificadas de acordo com o índice de alteração tecidual (IAH), segundo Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994) e Bernet et al. (1999). O IAH baseou-se no grau de importância (1-3), que considera a reversibilidade das lesões, bem como na distribuição e frequência das mesmas (0-3). A tabela 1 representa as alterações histológicas e seus respectivos graus de importância. A seguinte fórmula foi usada para a estimativa do IAH.

$$\text{IAH} = \sum_{\text{alt}} (\mathbf{a} \times \mathbf{w});$$

Onde: **a**, representa o respectivo grau de importância das lesões (1, reversível; 2, reversíveis após neutralização do agente; 3, irreversível) e **w**, representa a distribuição e frequência das alterações: (0, ausente; 1, pouca; 2, moderada; 3, acentuada).

Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE)

Após a retirada das brânquias, fragmentos do encéfalo foram acondicionados em tubos de ensaio com tampão Tris HCl 10 mM [pH 7,2] resfriado, na proporção de 1:10 (massa: volume). Em seguida, foram homogeneizados e centrifugados a 1000 g (2500 rpm) por 15 min. O sobrenadante foi separado em microtubos e congelado à -20°C , para quantificação e inibição da acetilcolinesterase (AChE).

Para a análise da atividade enzimática utilizou-se 20 μL de sobrenadante adicionados a 150 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH= 7,0), 80 μL de água destilada e 20 μL de Iso-OMPA (inibidor da BChEi) e foram incubados por 30 min. Em seguida, adicionou-se 30 μL de ACh (10 mM) por 10 min

à 37°C. Essa reação foi bloqueada pela adição de 20 µL de brometo de neostigmina 51 mM. Para a revelação da reação, adicionou-se 20 µL de DTNB 8,5 mM (*ácido 5,5- ditio-bis-(2-nitrobenzóico)*). A hidrólise do iodeto da ACh catalisada pela AChE forma o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), o qual foi determinado por espectrofotometria ($\lambda_{\text{máx}} = 412 \text{ nm}$) em temperatura ambiente. A atividade da AChE foi expressa em µmol de ACh hidrolisada/minuto/miligramma de proteína.

Análise estatística

Os dados do perfil eletrolítico e do perfil da AChE foram submetidos à análise de variância, modelo misto generalizado, para efeito fixo de tratamento (período de exposição x controle) com comparação par a par pelo teste DMS (diferença mínima significativa). O IAH foi comparado entre os tempos de exposição pela análise de variância não paramétrica, modelo de Kruskal-Wallis e comparação par a par pelo teste de Mann-Whitney U. O *software* SPSS 23.0 (IBM®) foi usado para as análises. *Box Plot* considerando a mediana, 1º e 3º quartil e o intervalo entre os valores mínimos e máximos interquartis foram usados para expressar os valores das variáveis séricas, IHA e atividade da AChE.

Resultados

Teste de toxicidade aguda (CL_{50.96h})

A CL_{50.96h} calculada foi de $11,2 \pm 3,9 \mu\text{g/L}^{-1}$ (IC 95% entre 7,30 e 15,1) de acordo com as taxas de mortalidade representadas na Figura 1. A mortalidade para os espécimes expostos às concentrações entre 4,0 e 16,0 ocorreram a partir das 48 entre 72 horas pós-exposição (*hpe*), enquanto que os expostos às concentrações de 32,0 e 64,0 a.i. (µg) morreram entre 6 entre 48 *hpe*. A CL_{50.96h} calculada foi usada para o experimento subsequente onde verificou-se os perfis eletrolíticos e bioquímicos séricos bem como as alterações histológicas branquiais entre 24 e 240 *hpe*.

Teste de toxicidade crônica e perfil osmorregulatório

Não houve mortalidade durante o período de exposição no teste de toxicidade crônica. Sódio e potássio apresentaram perfis distintos. Enquanto o sódio foi diferente apenas às 96 horas pós-exposição (*hpe*) com os espécimes controles e superior às 240 *hpe* em comparação aos demais períodos, o potássio foi diferente em todos os animais controles de todos os períodos. Ademais, este eletrólito foi superior às 24 *hpe* e inferior nos demais períodos. Ao contrário, o cloreto não sofreu efeito quanto aos tempos de exposição enquanto que o cálcio foi inferior às 24 *hpe* e superior às 240 *hpe* às 24, 96 e 168 *hpe*, respectivamente (Figura 2). O pH, o lactato e o bicarbonato séricos mostraram perfis semelhantes. O pH e o bicarbonato foram superiores às 240 *hpe*, enquanto o lactato aumentou às 168 e 240 *hpe*, respectivamente. O íon hidrogênio não variou entre os controles, mas foi inferior às 240 *hpe* em relação aos demais períodos. Ao contrário, a glicose foi superior em relação aos respectivos controles mas não variou entre os períodos de exposição (Figura 3).

Histologia branquial

Todos os períodos apresentaram alterações histológicas mas não houve diferença entre estes quanto ao IAH (Figura 5). Às 24 e 96 *hpe* os valores foram referentes as alterações de caráter circulatório, tais como hiperemia vascular, aumento da espessura do epitélio das lamelas primárias (proliferação epitelial lamelar – PEL) e edema de lamela secundária, associados ou não a fusões lamelares secundárias focais (Figura 4, b e c). Nos períodos subsequentes, houve aumento no grau de importância das alterações histológicas, especialmente para lesões classificadas no estágio II. PEL associada à necrose com subsequente fibrose focal, infiltrado granulocítico e atrofia lamelar, foram observadas com maior frequência às 168 e 240 *hpe* (Figura 4, c, d, e). A hipertrofia proliferativa das células de muco foi observada em todos os períodos, porém, a frequência foi maior nos dois últimos períodos (Figura 4, g). A necrose lamelar, com fusão completa de lamelas secundárias associadas a

presença de aneurismas trombóticos fibrosados ou não, ocorreram exclusivamente às 240 *hpe* em apenas dois espécimes (Figura 4, f e h). Neste período houve aumento da amplitude do IAH.

Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE)

Houve redução ($P < 0,05$) dos níveis da Acetilcolinesterase (AChE) apenas às 24 e 240 *hpe*. Às 96 e 168 *hpe* os valores foram semelhantes aos respectivos controles e não diferiram entre si (Figura 4).

Discussão

Vários experimentos tem mostrado os efeitos adversos da lambda-cialotrina em espécies de peixes comerciais com base na determinação da $CL_{50,96h}$ (Piner & Ünner, 2013; Moraes et al., 2013; Kutluyer et al., 2015). No geral, as dosagens elencadas para obtenção das curvas de ajuste são discrepantes o que resulta numa maior amplitude nas concentrações letais mínimas (Maund et al., 1998; Werner & Moran, 2008; Ahmad et al., 2012). Por outro lado, sensibilidade das espécies, formulações comerciais (veículos e estabilizantes), categoria dos espécimes, toxicidade seletiva, entre outras, podem ser apontados como fatores que afetam a resposta nos testes de toxicidade aguda (He et al., 2008; Vassiliou, 2016). O teste de toxicidade aguda revelou uma $CL_{50,96h}$ nominal com intervalo de confiança (IC 95%) entre 7,30 e 15,1 μgL^{-1} , valores superiores a vários estudos, mas semelhante ao reportado em *Danio rerio* (Wang et al. 2007) e em *Channa punctatus* (Kumar et al. 2007). Cabe ressaltar que estes valores foram obtidos a partir de um sistema estático, onde não há renovação da solução teste (Adams & Rowland, 2003; Moraes et al., 2018). Esse método foi adotado uma vez que a lambda-cialotrina apresenta alto valor para o fator de bioconcentração orgânica (Yamauchi, 1985), é estável em pH 7,0 com relativa baixa solubilidade, e com meia-vida de até 28 dias para degradação em sistemas aquáticos aeróbicos (Laskowski, 2002). Assim, foi possível obter uma concentração satisfatória subletal, capaz de alterar a osmorregulação e a histologia branquial nos espécimes mantidos até às 240 *hpe*, o que torna esse composto lesivo à *O. niloticus*.

A resposta à AChE e osmorregulação indicam uma situação de estresse marcado por alterações entre os períodos experimentais. A atividade da AChE foi inferior às 24 hpe o que sugere um efeito imediato da lamba-cialotrina sobre a atividade sináptica nervosa. A inibição dessa enzima leva ao acúmulo de acetilcolina (ACh) nas sinapses do sistema nervoso somático aumentando os processos de contração muscular voluntária seguido por paralisia, um efeito tipicamente observado em diferentes pesticidas nos peixes (Habig & Di Giulio, 1991; Kumar et al., 2009; Piner & Üner, 2014). A redução no último período pode ser devido a falhas nos mecanismos compensatórios para a detoxicação do composto, sugerindo que resíduos poderiam estar presentes na água ou bioacumulados nos espécimes (He et al., 2008). Por outro lado, a elevação da glicose circulante durante todos os períodos avaliados, está associada à liberação de adrenalina e aumento da glicogenólise hepática em resposta à maior demanda metabólica comumente observada nas situações de estresse (Schreck & Tort, 2016). O acúmulo de compostos químicos pesticidas especialmente no tecido pancreático, compromete seletivamente a produção de insulina, resultando em altos níveis de glicose na corrente circulatória (Diwan et al., 1979; Verma et al., 1983; El-Sayed et al., 2007).

O efeito do estresse em peixes expostos a diferentes compostos químicos afeta o perfil osmorregulatório, cuja função primordial é manter a pressão osmótica e os fluídos corporais em equilíbrio. Essas variações podem surgir de horas a dias e dependem diretamente da integridade da troca iônica branquial, além de vários mecanismos compensatórios (Hwang & Lin, 2014). Os valores observados para os grupos controles no presente estudo, particularmente para o sódio, potássio, cloreto e cálcio assim como para o lactato e glicose, estão de acordo aos padrões reportados para *O. niloticus* e outras espécies de água doce (Stoskopf, 1993; Becker et al., 2001; Cataldi et al., 2005; Almeida et al. 2018). Isso demonstra que o sistema de automação empregado foi um método adequado e promissor para o monitoramento da osmorregulação. Além disso, a qualidade da água para esses grupos manteve-

se nos padrões recomendados, mesmo considerando o sistema empregado (Bhatnagar & Devi, 2013). No entanto, a resposta iônica dose-dependente é complexa e envolve não apenas a integridade celular mas também a capacidade adaptativa das espécies frente aos estressores químicos (Takei & Hwang, 2016). Sódio e cloreto séricos usualmente diminuem por perda urinária rapidamente após um estímulo adrenérgico (McDonald & Milligan, 1997). Porém, apenas o sódio diminuiu às 96 e 168 hpe, sugerindo um mecanismo compensatório a partir das 24h pós-exposição tal como o aumento da perfusão branquial em resposta ao estresse (McDonald et al., 1991). O perfil do potássio foi o mais atípico nos períodos estudados. A elevação às 24 hpe seguida por queda brusca nos demais valores, indica um quadro inicial de hipercalemia, seguido por hipocalemia nos períodos subsequentes. A elevação do potássio circulante foi demonstrada pelos mecanismos de co-transporte com o sódio ou com os íons-cloreto nos processos agudos de intoxicação (Knudsen & Jensen, 1996; Vieira et al, 2018). Ao contrário, em situações de estresse crônico há queda desse eletrólito, conforme observado em *O. niloticus* expostos à atrazina, por aumento da diurese renal em associação à perda da permeabilidade celular no epitélio branquial (Fischer-Scherl et al., 1991; McDonald & Milligan, 1997).

Variações nos parâmetros dos peixes expostos aos piretróides são controversos e dependem diretamente de ajustes celulares, endócrinos e metabólicos (Claiborne et al., 2002; Randall & Tsui, 2006). O equilíbrio ácido-base está na dependência desses processos regulatórios e podem variar ainda de acordo com a espécie, do princípio ativo e da concentração do agente tóxico além do meio osmótico do ambiente aquático (McDonald & Milligan, 1997; Harmon, 2009). O efeito prolongado da lambdalcialotrina alterou o perfil ácido-base nos peixes expostos. O aumento do pH e do bicarbonato demonstram condição de alcalose ao final do período experimental. Neste período, houve aumento significativo do pH com queda nos valores dos íons-hidrogênio e aumento do bicarbonato. O equilíbrio ácido-base dependente do pH plasmático que se altera nos episódios de estresse (Perry & Wood, 1989).

A sua elevação associa-se à redução dos níveis de hidrogênio, os quais reduzem a presença de gás carbônico tecidual (Tufts & Perry, 1998). Como a permeabilidade do gás carbônico é rápida, o aumento continuado da ventilação respiratória seria suficiente para garantir adequada transferência de oxigênio tecidual (Randal & Daxboeck, 1984; Nikinmaa & Salama, 1998). Porém, esses mecanismos ficam comprometidos a medida que a integridade branquial é alterada. Nossos resultados sugerem que a perda de hidrogênio pode ter sido compensada pela maior produção de bicarbonato o que resultou no quadro de alcalose. No entanto, como o lactato sérico elevou-se às 196 e 240 *hpe* é possível especular o envolvimento do metabolismo energético na variação do nível de bicarbonato. Os piretróides sintéticos, de ambos os tipos (I e II) como as piretrinas, cipermetrina e lambda-cialotrina, respectivamente, aumentam drasticamente as taxas metabólicas entre 7 e 10 dias pós-exposição devido ao gasto energético atribuído à detoxicação e reparação tecidual (Kumaragur & Beamish, 1983; Kumar et al., 2014). Em *Oreochromis mossambicus* expostos à cipermetrina, há depleção do glicogênio hepático com decréscimo da lactato desidrogenase e aumento do nível de lactato circulante devido à redução do piruvato via ciclo do ácido tricarboxílico (Reddy & Yellamma, 1991). Além disso, o efeito dos compostos químicos está diretamente associado à hipóxia tecidual, com aumento significativo do gasto metabólico (Bonga, 1997; Slaninova et al., 2009). As alterações no perfil osmorregulatório e do equilíbrio ácido-base observadas sugerem que embora tenha havido compensação eletrolítica, o gasto energético frente à lambda-cialotrina foi alto em detrimento às alterações histológicas branquiais.

Diversas alterações histológicas branquiais em peixes expostos aos piretróides tem sido descritas na literatura (Heath, 1995; Liebel et al., 2013; Yancheva et al., 2015). No geral, as brânquias apresentam um limitado repertório de lesões em resposta aos agentes químicos ou físicos (Wolf et al. 2015). A mais comum em processos agudos e crônicos refere-se à proliferação do epitélio estratificado lamelar primário (PEL), composta por vários tipos celulares tais como células pavimentosas epiteliais, células

cloreto, células de muco, células pilares, granulócitos e agranulócitos, entre outras (Takashima & Hibiya, 1995). A proliferação do epitélio lamelar constitui-se num processo hiperplásico, usualmente associado a perda ou atrofia lamelar secundária, hiperplasia das células de muco e processo infiltrativo leucocitário (Wood, 2001; Wolf et al., 2015). A proliferação do epitélio lamelar foi a principal e mais frequente alteração observada pós-exposição, seguida por infiltração de células granulocíticas eosinofílicas (CGE), atrofia lamelar, proliferação das células de muco e aneurismas vasculares nos períodos finais de exposição. Além da PEL às 24 *hpe*, houve marcada hiperemia em praticamente todas as amostras. A vasodilatação pode ser reflexo do aumento da ventilação branquial por vezes associada à ruptura epitelial, uma vez que os piretróides são altamente lipofílicos às células branquiais induzindo à síntese de lipoxigenases (Mishara et al., 2005; Prusty et al., 2015). Essas alterações tornam-se extensivas ao epitélio lamelar secundário resultando em proliferação, descamação ou adesão lamelar (Kleinow et al., 2008; Wolf et al., 2016). Portanto, o conjunto de alterações observadas nos períodos pós-exposição representam processos cronológicos progressivos a partir da irritação causada pela lambda-cialotrina. A presença de necrose epitelial juntamente com a fibrose foi mais frequente no último período de exposição sugerindo que as alterações produzidas tenham um caráter deletério mais durador. Lesões com estas característica permaneceram pelo menos até 35 dias em *O. niloticus* expostos à cipermetrina (Korkmaz et al. 2009). Especialmente às 168 e 240 *hpe* destacaram-se a prevalência dos aneurismas lamelares. Essa lesão tem sido descrita em vários estudos incluindo a lambda-cialotrina e outros piretróides (Cengiz, 2006; Valisek et al., 2006; Velmurugan et al., 2007; Cunha et al. 2018). O aneurisma lamelar origina-se de uma expansão aguda das arteríolas lamelares secundárias (hiperemia aguda) com sequestro eritrocitário na região proximal, em resposta às alterações vasculares. Como consequência, haverá formação de um coágulo (trombo) na região proximal da lamela. Nos processos crônicos os trombos usualmente aparecem revestidos por tecido colagenoso e por vezes associados à

necrose do epitélio lamelar primário e fusão lamelar secundária (Mallat, 1985; Wolf et al., 2005; Ferguson, 2006). Portanto, nossos achados sugerem que essas lesões não sejam de caráter reversível e estão de acordo com o estudo de Korkmaz et al. (2009) para os efeitos da cipermetrina.

Nossos resultados demonstram que *O. niloticus* expostos a concentração subletal de lambda-cialotrina apresentam alterações na osmorregulação séria, perfil da acetilcolina em associação à resposta histológica branquial. Essas alterações são cronologicamente progressivas até o décimo dia pós-exposição, caracterizadas por hipocalemia, hipercalcemia, hiperglicemia e lactato e a diminuição da atividade enzimática no primeiro tempo da acetilcolina. Aneurismas vasculares e necrose epitelial lamelar compõem uma resposta crônica branquial decorrente da exposição à lambda-cialotrina.

Referências

- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Aquatic Toxicology Test Methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER B. A.; BURTON JR., G. A.; CAIRNS JR., J. **Handbook of Ecotoxicology**, 2 ed. Lewis Publishers: Boca Raton, p. 19-38. 2003.
- AHMAD, M. K.; SHARMA, D. K.; ANSARI, S.; ANSARI, B. A. Comparative study of synthetic pyrethroid Lambda-cyhalothrin and Neem based pesticide Neemgold on the fingerlings of Zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). **Research Journal of Chemical Sciencies**, v. 1, c. 6, p.91-94, 2011.
- AHMAD, M. K.; SHARMA, D. K.; ANSARI, S.; ANSARI, B. A. Effect of lambda-cyhalothrin and Neemgold on some biochemical parameters in the gill, liver, and ovary of zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae). **Archives of Polish Fisheries**, v. 20, p. 19-25. 2012.
- ALMEIDA, D.M.; PETESSE, M. L.; TACHIBANA, L.; DIAS, D. C.; MOREIRA, R. G. RANZINA-PAIVA, M. J. T. Monitoring whole blood, plasma and serum variables of Nile Tilapia during 24 hours, after capture stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 4, p.1-9. 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 25 de março de 2009. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/251109.htm>>. Acesso em: 18/04/2017. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no 61, 17 de março de 2003. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/61_03re_3.htm> Acesso em: 18 /04/ 2017.
- APHA, AWWA, WEF. **Standard methods**. Ed. CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D. New York: American Public Health Association, American Water Association, Water Environment Federation. 1998. 2671 p.
- APPLEYARD, S.A.; RENWICK, J.M.; MATHER, P.B. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L.) cultured under Fijian conditions. **Aquaculture Research**, v.32, p.287-296, 2001.
- BHATNAGAR, A.; DEVI, P. Water quality guidelines for the management of pond fish culture. *International Journal of Environmental Sciences*, v.3, n. 6, p. 1980-2019. 2013.
- BECKER, A. G.; GONÇALVES, J. F.; TOLDEDO, J. A.; BURNS, M. D. M.; GARCIA, L. O., VIEIRA, J. P.; BALDISSEROTO, B. Plasma ion levels of freshwater and marine/estuarine teleosts from Southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.9, n.4, p. 895-900. 2011.
- BONGA, S. E. W. The Stress Response in Fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625. 1997.
- BORGES, A., et al. Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. **Chemosphere**, v.69, n. 6, p. 920-926, 2007.

CARLSON, E.; ZELIKOFF, J. T. The Immune System of Fish: A Target Organ of Toxicity. In.: Di Giulio, R. T.; Hinton, D. E. **The Toxicology of Fishes**. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, USA, p. 489-529. 2008.

CATALDI, E.; MANDICH, A.; A. OZZIMO, A.; CATAUDELLA, S. The interrelationships between stress and osmoregulation in a euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. **Journal Applied Ichthyology**, v. 21, p. 229–231. 2015.

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

CLAIBORNE, J.B.; EDWARDS, S. L.; MORRISON-SHETLAR, A. I. Acid-Base Regulation in Fishes: Cellular and Molecular **Mechanisms**. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 302-319. 2002.

CUNHA; F. S.; SOUSA; N.C.S.; SANTOS, R. F.B.; MENESES, J.O.; DO COUTO, M.V.S.; FABRÍCIO TAVARES CUNHA DE 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.

DEY, M.M.; GUPTA, M.V. Socioeconomics of disseminating enetically improved Nile tilapia in Asia: an introduction. **Aquaculture Economic and Management**, v.4, p.5-12, 2000.

DINGOVA. D.; LEROY, J.; CHECK, A.; GARAJ, V.; KREJCI, E.; HRABOVSKA, A. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. **Analytical Biochemistry**, v. 462, p. 67-75, 2014.

DIWAN, A.D.; HINGORANI, H.G.; CHANDRASEKHARAM, N. N. Levels of blood glucose and tissue glycogen in two live fish exposed to industrial effluents. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, v. 21, p.269-272. 1979.

EKREM MUTLU, E.; AYDIN1, S.; KUTLU, B. Alterations of Growth Performance and Blood Chemistry in Nile Tilapia (*Oreochromis nuoticus*) Affected by Copper Sulfate in Long-Term Exposure. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.15. p.481-488, 2015.

ELLMAN, G.L., et al. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EL-SAYED, Y.S.; SAAD, T.T.; EL-BAHR, S.M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 212–217. 2007.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Species Fact Sheets: Fisheries and Aquaculture Department, 2018.

FERGUSON, H. W. Systemic Pathology of Fish. A Text Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease. Scotian Press, UK. 366 p. 2006.

FISCHER-SCHERL, T.; VEESER, A.; HOFFMANN, R.W.; KÜHNHAUSER, C.; NEGELE, R.D.; EWRINGMANN, T. Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 20: p. 454-461. 1991.

HABIG, C.; DiGIULIO, R. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: **Cholinesterase-inhibiting Insecticides: Their Impact On Wild life and the Environment**. Elsevier Science Publishers, NY. pp. 19–33. 1991.

HARMON, T.S. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. **Reviews in Aquaculture**, v.1, p.58-66. 2009.

HE, L.M.; TROIANO, J.; GOH, K.S.; WANG, A. Environmental Chemistry Ecotoxicity, and Fate of Lambda-Cyhalotrin. In: WHITACRE, D.M. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Springer, USA, p.71-91. 2008.

HILSDORF, A.W.S. Genética e cultivo de tilápias-vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.22, p.73-84, 1995.

HWANG, P-P.; LIN, L-Y. Gill Ionic Transport, Acid-Base Regulation, and Nitrogen Excretion. In: EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B.; CURRIE, S. The Physiology of Fishes. 4^a ed. CRC Press, p. 205-233. 2014.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; HEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and AQUI-S from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v.232, p.265-277, 2004.

KLEINOW, K. M.; NICHOLS, J. W.; HAYTON, W. E.; McKIM, J. M.; BARRON, M. G. Toxicokinetics in Fishes. In.: **The Toxicology of Fishes**. Taylor & Francis Group, LLC, Boca. Raton, FL, US, p. 55-152. 2008.

KORDMAZ, N.; CENGIZ, E.I.; UNLU, E.; UYSAL, E.; YANAR, M. Cypermethrin-induced histopathological and biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the protective and recuperative effect of ascorbic acid. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 198-205. 2009.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios, **Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 150, 2015.

KUMAR, A., SHARMA, B. & PANDEY, R.S. Preliminary evaluation of the toxicity of cypermethrin and lambda-cyhalothrin to *Channa punctatus*. **Bulletin Enviromental Contamination Toxicology**, v. 79: 613-616. 2007.

KUMAR, A., SHARMA, B. & PANDEY, R.S. λ -Cyhalothrin and cypermethrin induce stress in the freshwater muddy fish, *Clarias batrachus*. **Toxicological & Environmental chemistry**, v. 96, n. 1, p. 136-149. 2014.

KUMARAGURU A. K. & BEAMISH E W. H. Bioenergetics of acclimation to permethrin (NRDC-143) by rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.15, p. 247-252. 1983.

KUTLUYER, F.; ERISIR, M.; BENZER, F.; OGRETMEN, F.; INANAN, B. E. The in vitro effect of Lambda-cyhalothrin on quality and antioxidant responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, 373 p. 855-860, 2015.

LASKOWSKI, D. A. Physical and Chemical Properties of Pyrethroids. **Review Environmental Toxicology**, v. 174, p. 49-170. 2002.

LIEBEL, L.; TOMOTAKE, M.E.M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. **Ecotoxicology Environmental Contamination**, v. 8, n. 2, p. 09-15. 2013

MALLAT, J. Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicantes and Other Irritants: A Statistical Review. **Canadian Journal Fisheries Aquatic Science**, v. 42, p. 630-648. 1985.

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. **Pesticides Science**, 54, p. 408-417. 1998.

Mc DONALD, D.G.; CAVDEK, V.; ELLIS, R. Gill design in freshwater fishes: interrelationships amongst gas exchange, ion regulation & acid-base regulation. **Physiological Zoology**, v. 64, p.102-123. 1991.

Mc DONALD, D.G. & MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In.: IWANA, G.K. PICKERING, A.D. SUMPTER, J.P. SCHRECK, C.B. Fish Stress and Health in Aquiculture. Society for Experimental Biology Seminar Series, 62. Cambridge University Press, p. 119-144. 1997.

MISHRA, D.; SRIVASTAV, S. K.; SRIVASTAV, A. K. Effects of the insecticide cypermethrin on plasma calcium and ultimobranchial gland of a teleost, *Heteropneustes fossilis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p.193–197. 2005.

MORAES, F.D.; VENTURINI, F.P.; ROSSI, P.A.; AVILEZ, I.M.; SOUZA, N.E.S.; MORAES, G. Assesment of biomarkers in the neotropical fish *Brycon amazonicus* exposed to cypermethrin-based insecticide. **Ecotoxicology**, v.27, p.288-197. 2018.

NIKINMAA, M.; SALAMA, A. Oxygen Transport in Fish. In.: PERRY, S.F.; TUFTS, B.L. **Fish Respiration**. Academic Press, USA, p141-184. 1998.

PERRY, S. F.; WOOD, C. M. Control and coordination of gas transfer in fishes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 2961-2970. 1989.

PINER, P.; ÜNER, N. Neurotoxic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonil butoxide in the brain of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 11, p. 1275-1282, 2014.

POLAT, H.; ERKOÇ, F. U.; VIRAN, R.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 49, p. 39-44, 2002.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and Chronic Effects of pollutants on Freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, 1994. p. 30, 339-352, 1994.

PRUSTY, A. K.; MEENA, D. K.; MOHAPATRA, P.; PANIKKAR, P.; GUPTA, S. K.; BEHERA, B. K. Synthetic pyrethroids (Type II) and freshwater fish culture: Perils and mitigations. **International Aquatic Research**, v.7, p.163-191. 2015.

RANDALL, D.; DAXBOECK, C. Oxygen and Carbon Dioxide Transfer Across Fish Gills. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. **Fish Physiology**. Academic Press, INC, USA, p. 263-313. 1984.

RANDALL, D. J. TSUI, T. K. N. Tribute to R. G. Boutilier: Acid-base transfer across fish gills. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 1179-1184. 2006.

REDDY, A.T.; YELLAMMA, K. Perturbations in carbohydrate metabolism during cypermethrin toxicity in fish, *Tilapia massambica*. **Biochemical International**, v. 23, n. 4, p. 663-668. 1991.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. In: **Biology of Stress in Fish**. Acad. Press Elsevier, p. 1-34. 2016.

SLANINOVA, A.; SMUTNA, M.; MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. A review: oxidative stress in fish induced by pesticides, **Neuroendocrinology Letters**, v.30, s.1, p. 2-12. 2009.

SINHORIN, V.D.G., et al. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.106, p. 181-187, 2014.

STOSKOPF, M. K. **Fish Medicine**. W.B. Saunders Company, USA. 882 p. 1993.

TAKEI, Y.; HWANG, P-P. Homeostatic Responses to Osmotic Stress. In: SCHERCK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Biology of Fish Stress**. Acad. Press Elsevier, p. 2008-237. 2016.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features**. Second Edition. Kondansha Ltd. Tokyo. 195 p. 1995.

TAKEY, Y.; HWANG, P.P. Homeostatic Response to Osmotic Stress. In: SCHERCK, C.B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **BIOLOGY OF STRESS IN FISH**. Elsevier, Academic Press, USA, p. 208-237. 2016.

TUFTS, B.; PERRY, S.F. Carbon Dioxide Transport and Excretion. In: PERRY, S.F.; TUFTS, B.L. **Fish Respiration**. Academic Press, USA, p. 229-281. 1998.

VASSILOU, G. Factors affecting risk assessment of pesticides in water bodies: a review. *MOJ Toxicology*, v. 2.n. 1, p. 26-32. 2016.

VELISEK, J., et al. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Medical**, v.51, n.10, p. 469-476, 2006.

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, p. 286-291. 2007.

VERMA, S.R.; SARITA RANI, S.; TONK, I.P.; DALELA, R.C. Pesticide-Induced Dysfunction in Carbohydrate Metabolism in Three Freshwater Fishes. **Environmental Research**, v. 32, p.127-133. 1983.

WANG, W. CAI B D.J.; SHAN Z.J.; CHEN W.L.; POLETIKA, N.; GAO, X.W A, Comparison of the acute toxicity for gamma-cyhalothrin and lambda-cyhalothrin to zebra fish and shrimp. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.47, p. 184–188. 2007.

WERNER, I. AND MORAN, K. Effects of pyrethroid insecticides on aquatic organisms. In: Spurlock, G.F; Hendley, P.;Weston, D. **Synthetic Pyrethroids: Occurrence and Behavior in Aquatic Environments**, Washington, DC: American Chemical Society., p. 310-334. 2008.

WOLF, J.C.; BAUMGARTNER, W.A.; BLAZER, V.S. et al. Nonlesions, misdiagnosis, missed diagnoses and other interpretative challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and readers. **Toxicology Pathology**, v. 43, p. 297-325. 2015.

WOOD, C.M. Toxic responses of the gill. In: SCHLENK, D.; BENSON, W. H. Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. Vol 1 – Organs. Taylor & Francis, USA, p. 1-101. 2001.

YAMAUCHI, F. Cyhalothrin: accumulation in fish (carp) in a flow-through water system. Zeneca report, PP-563, MITES, p. 58-367. 1985.

YANCHEVA, V.; VELCHEVA, V.; STOYANOVA, S; GEORGIEVA, 2. 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. 2015.

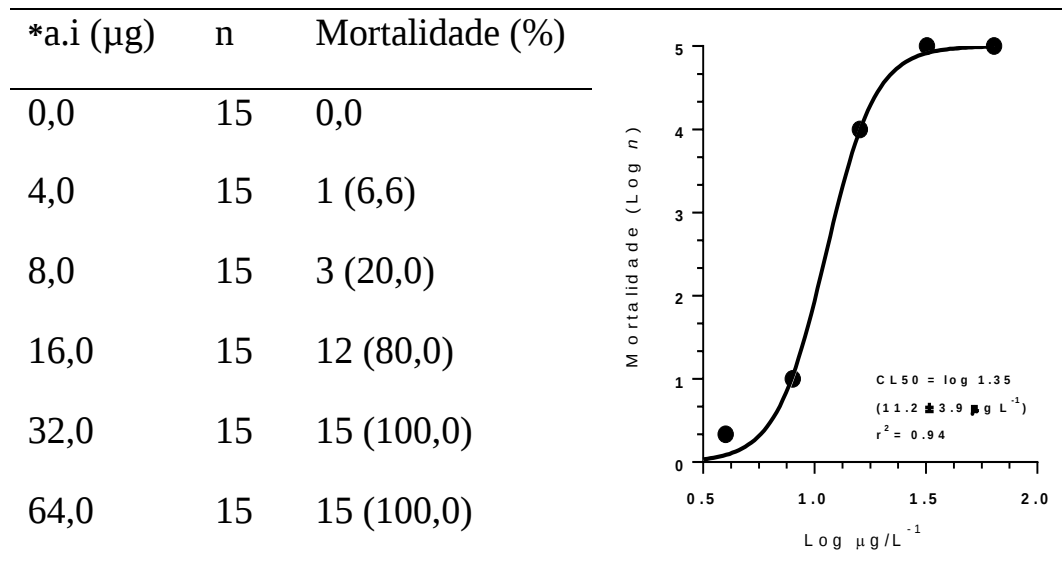
YILDIRIM, M.Z.; BENLI, A.C.; SELVI, M.; OZKUL, A.; ERKOÇ, F. KOÇAK, O. Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. **Environmental Toxicology**, v.21, n. 6, p. 614-620, 2006.

APÊNDICE

Tabela 1. Classificação* das alterações histológicas da brânquia, quanto ao tipo de lesões e dos estágios em que se inserem nos respectivos órgãos.

Órgãos	Alterações histológicas	Grau de alteração
Brânquias	Hipertrofia e hiperplasia epitelial	1
	Descamação epitelial	1
	Infiltrado inflamatório epitelial	1
	Espessamento epitelial	1
	Proliferação celular epitelial	1
	Atrofia lamelar	1
	Hiperplasia de células de muco	1
	Hipertrofia e hiperplasia de células cloreto	1
	Hipertrofia de células de muco	1
	Hemorragia	1
	Edema lamelas secundárias	1
	Aneurisma	1
	Hiperemia	1
	Ruptura do epitélio lamelar	2
	Fusão de lamelas secundárias	2
	Fusão completa de lamelas secundárias	2
	Rodlet + Hiperemia + Infiltrado	2
	Aneurisma com fibrose	3
	Fibrose epitelial	3
	Necrose	3

* De acordo com Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994); Bernet et al. (1999); 1, alterações reversíveis; 2, alterações reversíveis após neutralização do agente; 3, alterações irreversíveis.



* concentração ativa do ingrediente de acordo com a formulação comercial (Trinca Caps®)

Figura 1. Taxa de mortalidade em *Oreochromis niloticus* expostos à diferentes concentrações de lambda-cialotrina e respectiva curva para cálculo da CL₅₀96h (IC 95% 7,3 – 15,1 µg/L⁻¹).

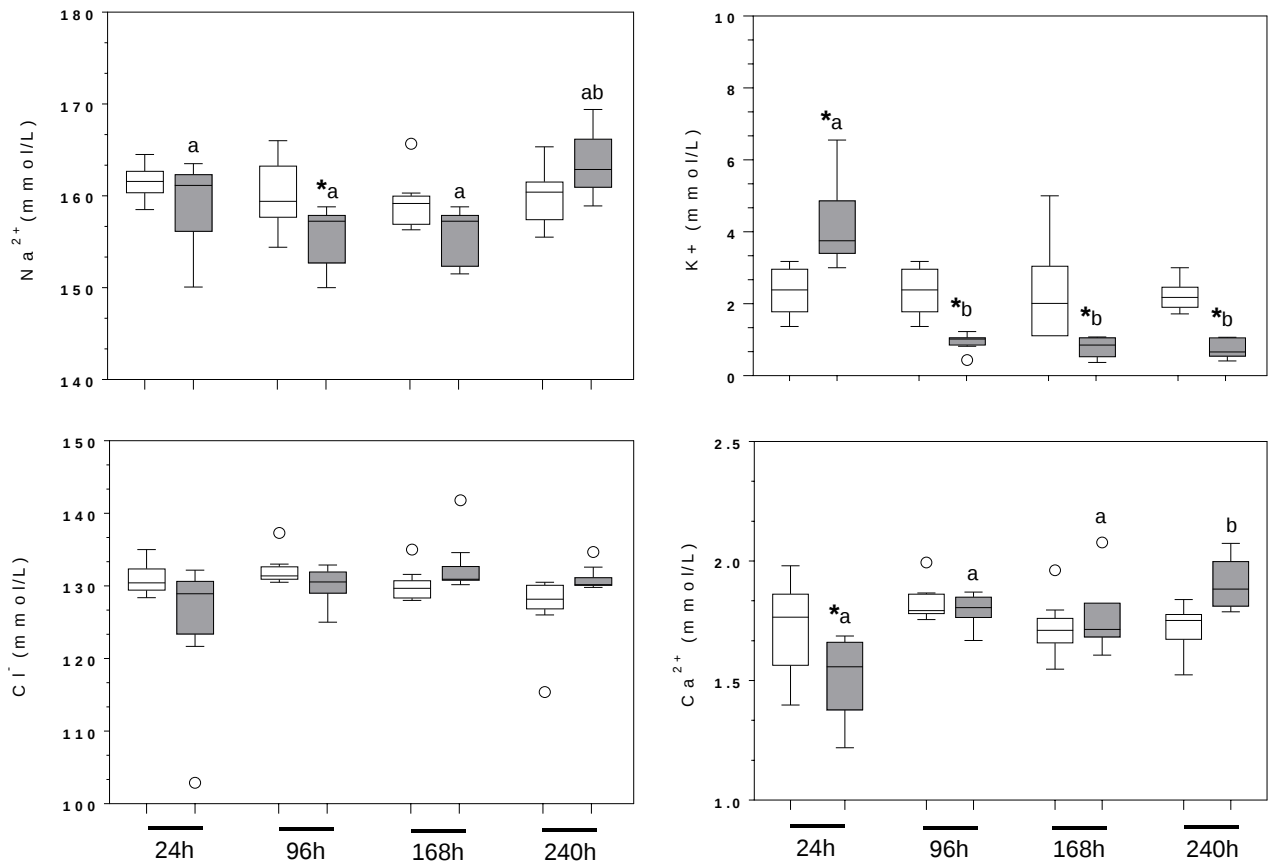


Figura 2. Box plot (mediana, 1º e 3º quartil) para o perfil sérico do sódio, potássio, cloreto e cálcio em *Oreochromis niloticus* expostos à lambda-cialotrina (22,6 µm/L-1) em diferentes períodos. *, $P < 0,05$ entre controle (caixas brancas) e expostos (caixas cinzas); letras distintas entre expostos representam diferença significativa ($P < 0,05$).

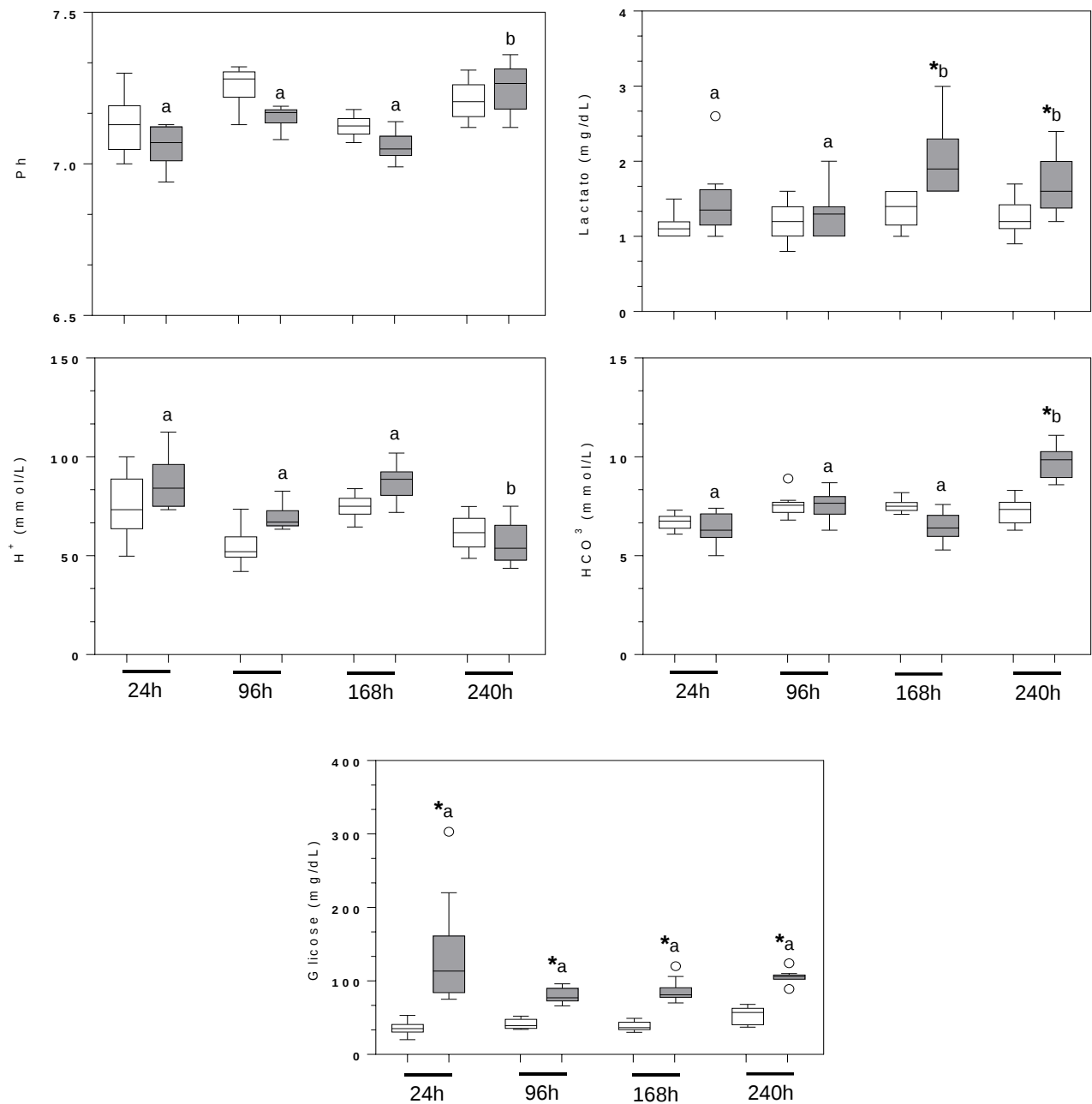


Figura 3. Box plot (mediana, 1º e 3º quartil) para o pH e perfil sérico do lactato, hidrogênio, bicarbonato e glicose em *Oreochromis niloticus* expostos à lambda-cialotrina (22,6 µm/L-1) em diferentes períodos. *, $P < 0,05$ entre controle (caixas brancas) e expostos (caixas cinzas); letras distintas entre expostos representam diferença significativa ($P < 0,05$).

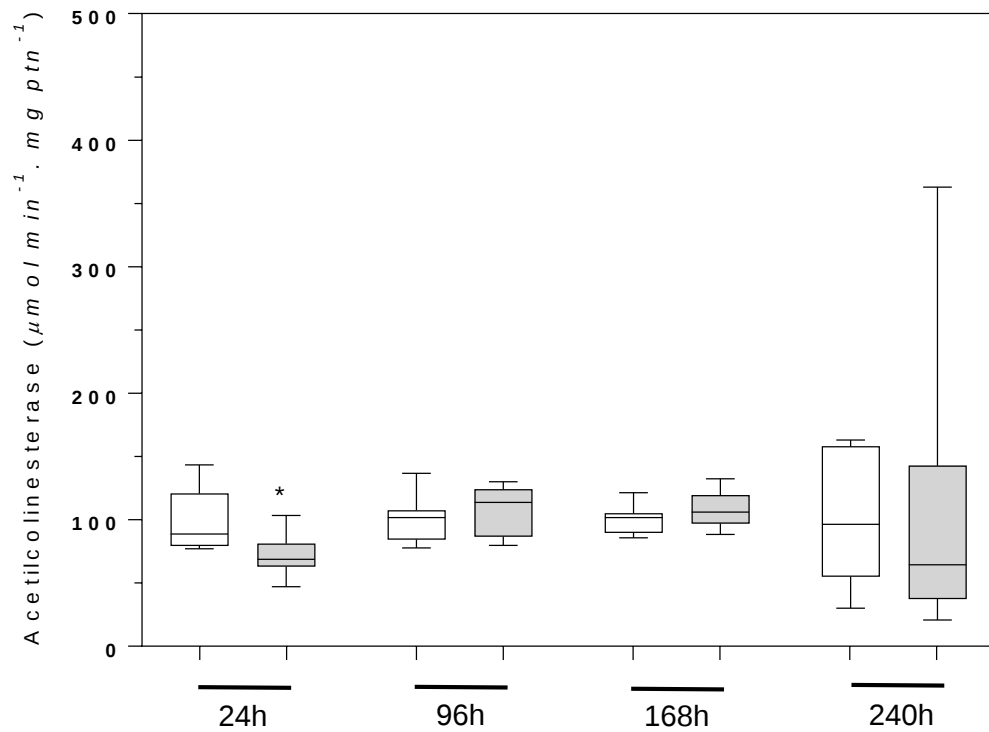


Figura 4. Box plot (mediana, 1º e 3º quartis) representando os valores medianos e respectivos quartis (1º e 3º) para o perfil da Acetilcolinesterase em *Oreochromis niloticus* expostos à lambda-cialotrina (22,6 $\mu\text{m/L-1}$) em diferentes períodos. C, controle. *, $P < 0,05$ entre controles (caixa branca) e expostos (caixa cinza).

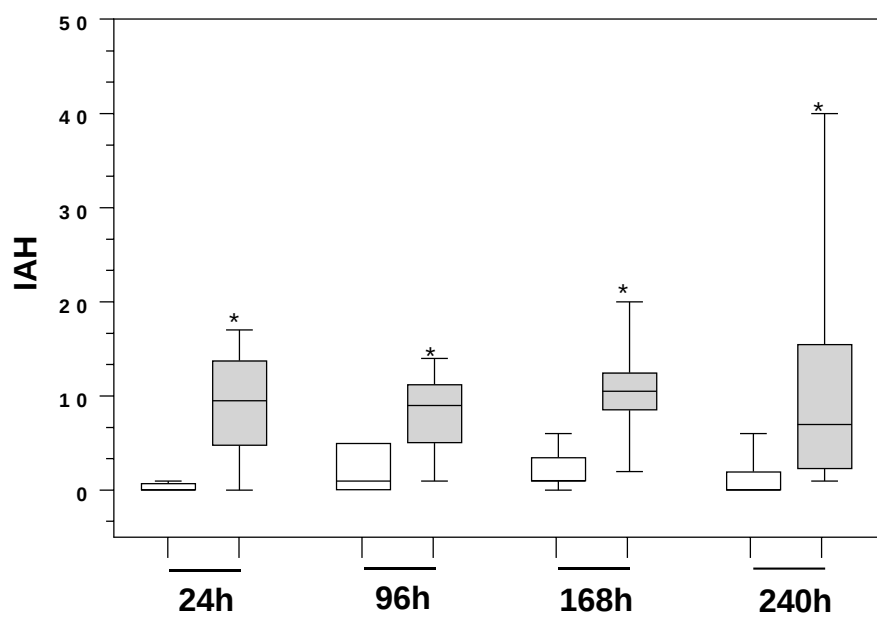


Figura 5. Box plot (mediana, 1º e 3º quartil) para os índice de alterações histológicas (IAH) branquiais em *Oreochromis niloticus* expostos à lambda-cialotrina (22,6 µm/L-1) em diferentes períodos. *, $P < 0,05$ entre controles (caixas brancas) e expostos (caixas cinzas).

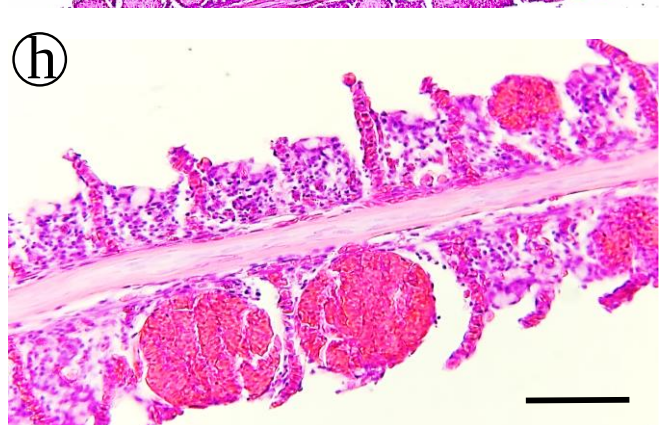
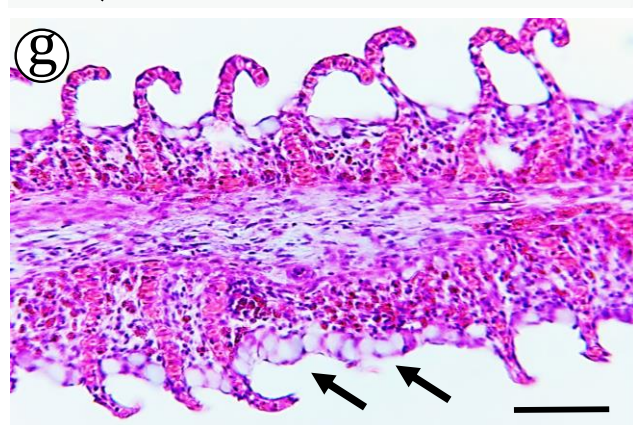
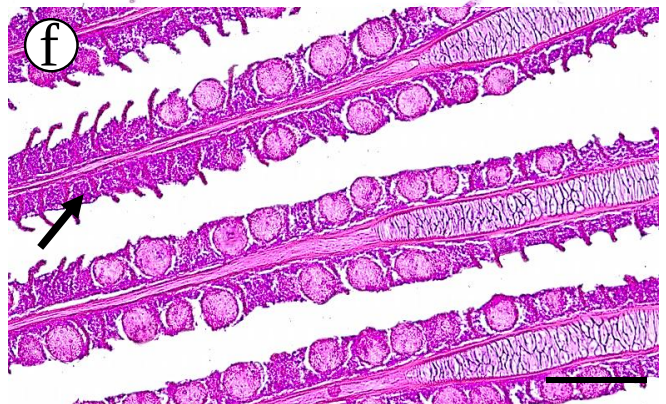
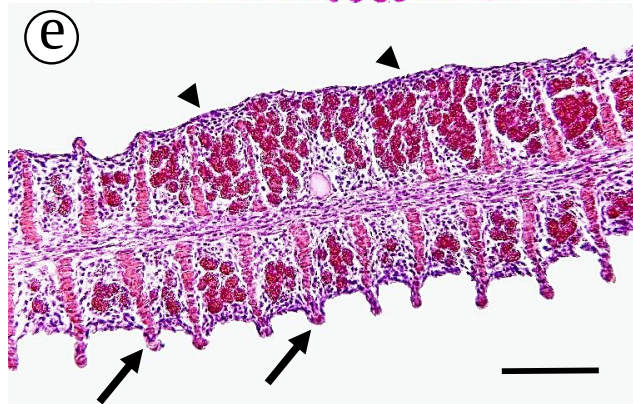
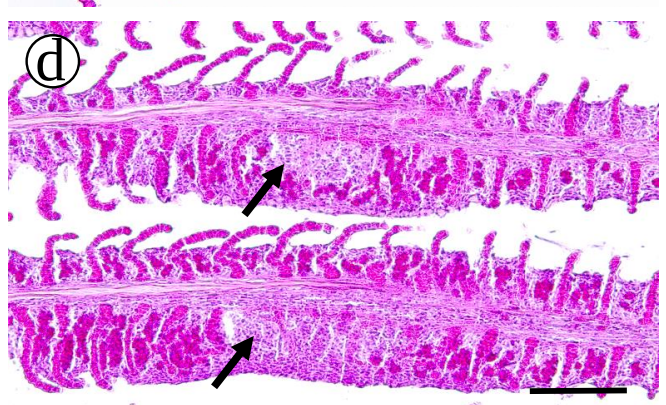
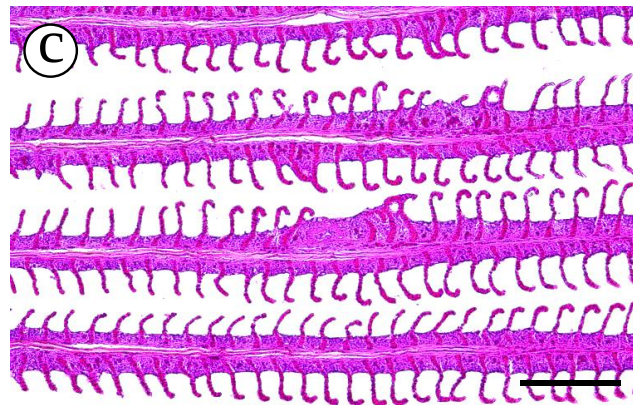
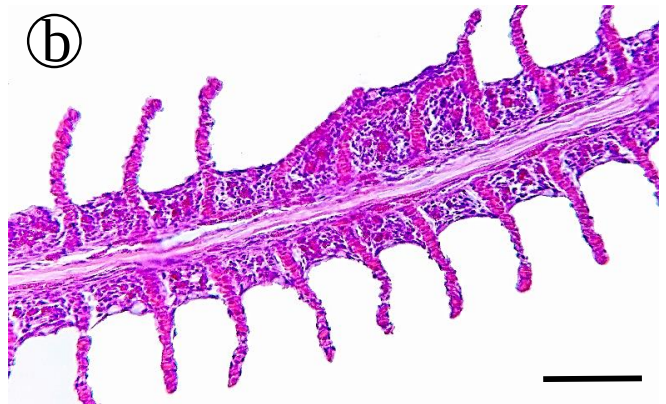
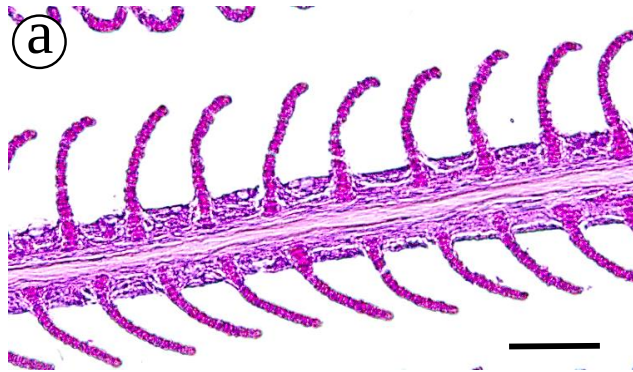


Figura 6. Secções histológicas sagitais branquiais de *Oreochromis niloticus* expostas à lambda cialotrina. **(a)**, normal (grupo controle/24 *hpe*), H&E, barra = 100 μ m. **(b)**, hiperemia do epitélio branquial com fusão parcial de lamelas secundárias, observada às 24 e 96 *hpe*; H&E, barra = 100 μ m. **(c)**, fusão de lamela secundária com fibrose (setas), observada às 168 *hpe*; H&E, barra = 200 μ m. **(d)**, maior aumento da figura c, com destaque para a fibrose nas células epiteliais da lamela primária (seta); infiltrado inflamatório e necrose lamelar (setas), observado entre 168 e 240 *hpe* de exposição; H&E, barra = 100 μ m. **(e)**, infiltrado inflamatório caracterizado por células granulocíticas eosinofílicas (CGE) em associação ao espessamento epitelial e perda de lamelas secundárias (cabeças de seta) e severa atrofia (setas) observado entre 96 e 240 *hpe*; H&E, barra = 50 μ m. **(f)**, espessamento lamelar primário (seta) com aneurismas vasculares difusos observados às 240 *hpe*; H&E, barra = 200 μ m. **(g)**, proliferação de células epiteliais e células mucoides (setas); atrofia de lamelas secundárias foram observadas em todos os períodos de exposição; H&E, barra = 50 μ m. **(h)**, necrose epitelial e de lamelas secundárias com aneurismas vasculares não fibrosos observado às 240 *hpe*; H&E, barra = 50 μ m.