

## Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*)

[*Histological biomarkers - chronic toxicity for roundup in piaçu (Leporinus macrocephalus)*]

A.C.L. Albinati<sup>1</sup>, E.L.T. Moreira<sup>2</sup>, R.C.B. Albinati<sup>2</sup>, J.V. Carvalho<sup>2</sup>, A.D. De Lira<sup>2</sup>,  
G.B. Santos<sup>2</sup>, L.V.O. Vidal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Curso de Medicina Veterinária - UNIVASF  
Rodovia BR 407, quadra 12 Lote 543  
56300-000 – Petrolina, PE

<sup>2</sup>Escola de Medicina Veterinária - UFBA – Salvador, BA

### RESUMO

Avaliou-se o uso de brânquias, fígado e rins como biomarcadores histológicos em ensaio de toxicidade crônica com o herbicida Roundup® em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). Para tanto, os animais foram expostos a 1,58mg/L, dose equivalente a 1/10 da CL<sub>50</sub> para a espécie por 14 e 28 dias, sendo utilizados cinco animais por tratamento correspondentes aos dias 0, 14 e 28. Hemorragia e necrose hepática e congestão renal foram as alterações que apresentaram diferenças entre os animais expostos e os não expostos. Dentre os órgãos usados como biomarcadores histopatológicos, o fígado foi o que apresentou os melhores resultados, seguido pelo rim.

Palavras-chave: peixe, toxicidade crônica, glifosato, histopatologia

### ABSTRACT

*The use of gills, liver, and kidneys as histological biomarkers was evaluated in a chronic toxicity analysis with herbicide Roundup® in piaçu (Leporinus macrocephalus). The animals were exposed to 1/10 of LC50 (1.58mg/L), during a period of 14 and 28 days. Five animals were used for treatment (days 0, 14, and 28). Hepatic hemorrhage and necrosis and renal congestion were the alterations that presented differences between exposed and non-exposed animals. Among the organs used as histological biomarkers, the liver presented the best results, followed by the kidneys.*

*Keywords: fish, chronic toxicity, glyphosate, histopathology*

### INTRODUÇÃO

Entre os contaminantes aquáticos decorrentes das atividades antropogênicas, os agrotóxicos são os mais perigosos, justamente pelo fato de terem sido concebidos para eliminar alguma forma de vida e, por isso, atingirem também de modo letal espécies não-alvo. No ambiente aquático, os agrotóxicos provocam impactos em múltiplos níveis, incluindo moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades (Grisolia, 2005).

O glifosato é um herbicida de difícil monitoramento em amostras ambientais, entretanto, muitos trabalhos têm sido realizados em função de sua ampla utilização. Por ter propriedades herbicidas de amplo espectro, ser sistêmico e pouco tóxico a animais, tornou-se o mais utilizado no mundo, aumentando, assim, a necessidade de implementação de programas de monitoramento (Amarante Jr. et al., 2002). Embora seja aplicado em várias culturas e em diferentes formulações comerciais, sua principal formulação é o Roundup®<sup>1</sup> (Glyphosate..., 1994).

---

Recebido em 13 de agosto de 2008  
Aceito em 6 de março de 2009  
E-mail: anacatarina.albinati@univasf.edu.br

---

<sup>1</sup>Indústria Monsanto - São José dos Campos, Brasil.

Os testes de toxicidade crônica são geralmente avaliados por meio de exposições prolongadas do organismo a concentrações subletais. Em peixes geralmente abordam apenas uma fase do ciclo de vida, que pode variar de sete dias a alguns meses (Lombardi, 2004).

Alterações histológicas em tecidos de peixes constituem ferramentas sensíveis para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo e, portanto, são indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (Hinton et al., 1992; Schwaiger et al., 1997). A histopatologia traduz a lesão integrada em função da duração e da intensidade da exposição ao elemento tóxico e a capacidade adaptativa de um determinado tecido (Ferreira, 2004). Peixes são relativamente sensíveis a mudanças no ambiente. Assim, efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em células e tecidos, antes que mudanças significativas no comportamento ou na aparência externa possam ser identificadas (van Dyk, 2005).

Alguns trabalhos têm descrito danos à saúde de peixes quando expostos ao glifosato. Respostas bioquímicas e histopatológicas foram encontradas em carpas (*Cyprinus carpio*) (Neskovic et al., 1996), em bagres (*Rhamdia hilarii*) (Rigolin-Sá, 1999), em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (Jiraungkoorskul et al., 2002, 2003) e em curimatás (*Prochilodus lineatus*) (Langiano, 2006). Foram também relatadas alterações ultraestruturais em hepatócitos de carpas (*C. carpio*) (Szarek et al., 2000); imunossupressão em *Tilapia nilotica* (El-Gendy et al., 1998); genotoxicidade em *Tilapia rendalli* (Grisolia, 2002) e diminuição do crescimento em piavas (*Leporinus Obtusidens*) (Lazari et al., 2004).

Poucas são as investigações toxicológicas de agentes químicos que utilizam espécies nativas do Brasil. Assim, optou-se por realizar esse trabalho com o piauçu (*Leporinus macrocephalus*), uma das espécies nativas de peixes de água doce cultivadas no Brasil (Martins e Yoshitoshi, 2003; Tataje e Zaniboni Filho, 2005).

O presente estudo teve o objetivo de avaliar o uso de brânquias, fígado e rins como biomarcadores histológicos em ensaio de

toxicidade crônica com o herbicida Roundup® em piauçu (*L. macrocephalus*).

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado com piauços (*Leporinus macrocephalus*), utilizando um total de 15 peixes (massa corporal  $3,2 \pm 1,3$ g e comprimento total  $6,7 \pm 1,3$ cm). Os animais foram aclimatados nos tanques onde foi realizado o experimento por sete dias antes de seu início.

O herbicida utilizado foi o Roundup® Original, produto comercial à base de glifosato. Na sua composição, estão presentes 480g/L de sal de isopropilamina de N-(fosfometil) glicina, 360g/L de equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (glifosato) e 684g/L de ingredientes inertes.

Os parâmetros de qualidade da água, como oxigênio dissolvido, pH e temperatura foram mensurados diariamente, e alcalinidade, amônia total, dureza e condutividade, semanalmente, a partir de uma semana após o início do experimento.

O experimento foi realizado durante 28 dias, com coleta de material no dia zero, antes da exposição ao herbicida, e nos dias 14 e 28. A concentração utilizada do herbicida foi 1,58mg/L (ppm) do produto comercial Roundup®, dose equivalente a 1/10 da CL<sub>50</sub> (15,8mg/L) determinada por Albinati et al. (2007). A exposição ao produto foi única e ocorreu no dia zero, permanecendo os animais nessa solução até o término do experimento.

Foram utilizados 15 peixes distribuídos em cinco caixas de amianto com 200L de água de clorada (três indivíduos por caixa). No momento zero, logo antes da exposição ao herbicida, foi coletado um animal por caixa, totalizando cinco animais. Aos 14 e 28 dias, após o início do experimento, foi coletado um peixe por caixa, perfazendo um total de cinco animais por tratamento.

Os animais coletados foram anestesiados com benzocaína (100mg/L) para coleta de uma pequena alíquota de sangue por venopunção caudal ou cardíaca para análise da glicemia, realizada com glicosímetro comercial. A biometria foi realizada logo após a coleta de sangue, com auxílio de ictiômetro graduado em

centímetros e balança digital (250g x 0,1g). As características avaliadas foram massa corpórea e comprimento. Após a biometria, foram sacrificados por secção medular, para a retirada das brânquias, fígado e rim caudal, para análise histológica.

Os órgãos coletados para análise histológica foram fixados em alfac (85% álcool a 80%, 10% formol a 40% e 5% de ácido acético), durante aproximadamente 16 horas, após o que a solução foi substituída por álcool a 70%. Seguiu-se o processamento histológico de rotina e coloração pela hematoxilina e eosina para todos os cortes, e pelo ácido periódico de Schiff para alguns cortes de fígado (Luna, 1968). Os cortes foram analisados em microscópio de luz branca, e as alterações encontradas foram classificadas, individualmente, de acordo com o grau de frequência da lesão no tecido. Para tanto foi utilizada a seguinte pontuação por ocorrência/distribuição da alteração por lâmina: 0 – alteração não observada; 1- discreta (até duas ocorrências da alteração por lâmina); 2- moderada (três a cinco ocorrências da alteração por lâmina) e 3- intensa (acima de cinco ocorrências da alteração por lâmina). Com esses valores de pontuação, foi calculada uma média do grau de alteração para cada tempo amostral, e estes foram classificados em discreto (0,1 a 1,0), moderado (1,1 a 2,0) e intenso (2,1 a 3,0).

Para os parâmetros de biometria e de glicemia, usou-se a análise de variância. Com a indicação de valores significativos e a identificação das diferenças entre os tempos de exposição, foi utilizado o teste SNK para comparação de médias, sendo considerados significativos os valores de  $P \leq 0,05$ . Na análise das alterações, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn, quando aplicável, sendo considerados significantes os valores de  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade da água avaliados mantiveram-se dentro dos limites ideais para peixes de água doce durante todo o experimento, estando de acordo com as recomendações de Ostrensky e Boeger (1998), Moreira et al. (2001) e Arana (2004). Os valores de temperatura variaram de 26,9 a 29,6°C; os de oxigênio dissolvido de 5,1 a 7,5mg/L; os do pH de 7,1 a 7,8; os de condutividade de 0,29 a 0,33mS/cm; os de amônia total de 0 a 1mg/L; os de alcalinidade de 20 a 45mg/L e os de dureza de 150 a 180mg/L.

Em relação aos parâmetros biométricos, os grupos expostos apresentaram aumento de massa corpórea significativa em relação ao dia zero, indicando crescimento aparentemente normal dos peixes (Tab. 1).

Tabela 1. Médias e desvios-padrão de peso, comprimento e glicose sanguínea dos peixes, no início do experimento (D0) e nos dias 14 e 28 (D14 e D28) após exposição ao Roundup®

	Dia 0	Dia 14	Dia 28
Peso (g)	5,2±1,0a	8,6±2,1b	11,6±2,1b
Comprimento (cm)	7,5±0,4a	8,6±0,7ab	9,5±1,4b
Glicose (mg/dL)	55,0±11,8a	38,8±9,4a	49,4±21,7a

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste SNK ( $P \leq 0,05$ ).

A glicose sanguínea não apresentou diferenças entre os tempos amostrais (Tab. 1). Langiano (2006) encontrou hiperglicemia em curimatás expostos a 10ppm de Roundup por 24 e 96 horas, porém em exposição a 7,5ppm, pelo mesmo período, a glicemia manteve-se normal. Os achados deste experimento sugerem que a concentração utilizada (1,58ppm) possa ter sido baixa para desencadear hiperglicemia ou que o período de exposição foi longo, permitindo uma resposta compensatória do organismo, o que confirma o resultado obtido por Heath (1995).

Esse autor citou que, embora a glicose sanguínea seja um dos parâmetros mais comumente utilizados para medir estresse agudo, suas variações tendem a ser transitórias no estresse crônico, portanto, não deve ser usada para tal.

Os trabalhos sobre os achados histopatológicos em peixes expostos ao glifosato, além de escassos, diferem entre si no que diz respeito às espécies, ao delineamento experimental e, principalmente, à forma de avaliação dos resultados. Na avaliação histopatológica neste

trabalho, os três órgãos apresentaram algum grau de alteração em todos os períodos avaliados.

As alterações encontradas nas brânquias foram hipertrofia e hiperplasia das células branquiais, descolamento do epitélio lamelar, fusão das lamelas secundárias, ruptura das células pilares,

dilatação e congestão dos seios venosos sanguíneos e formação de aneurisma (Tab. 2). A análise estatística não revelou diferença entre os períodos amostrais em nenhuma alteração, embora tenham sido observados graus de frequência variados nas lesões.

Tabela 2. Médias do grau de lesões histológicas observadas em cortes (HE-100 a 400X) de brânquias, fígado e rins dos peixes expostos ao Roundup®, no dia 0 (D0) e nos dias 14 e 28 após exposição

	D0	D14	D28
<b>Brânquias</b>			
Hipertrofia das células branquiais	1,8a	1,4a	1,8a
Hiperplasia das células branquiais	1,2a	0,8a	1,6a
Descolamento do epitélio lamelar	1,4a	1,8a	1,6a
Fusão de lamelas secundárias	1,0a	0,4a	0,4a
Ruptura de células pilares	0,0a	0,6a	0,2a
Dilatação dos seios venosos sanguíneos	1,0a	1,4a	2,2a
Congestão dos seios venosos sanguíneos	1,0a	1,2a	2,2a
Aneurisma	0,2a	0,2a	0,2a
<b>Fígado</b>			
Vacuolização	2,6a	1,6a	2,2a
Congestão	0,4a	0,6a,b	2,0b
Necrose focal	0,0a	1,6a,b	2,6b
Hemorragia	0,0a	1,0a,b	1,6b
<b>Rins</b>			
Vacuolização tubular	1,0a	1,8a	1,6a
Aumento do espaço da cápsula de Bowman	0,8a	2,2a	1,6a

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis ( $P \leq 0,05$ ).

Nos animais não expostos ao herbicida, não ocorreu ruptura de células pilares, e as demais lesões variaram do grau discreto ao moderado. Os expostos ao herbicida apresentaram as lesões citadas, em graus de frequência que variaram de discreto a intenso. Dilatação e congestão dos seios venosos sanguíneos foram as únicas lesões que apresentaram aumento da gravidade com o aumento do tempo, em que no dia zero apareciam como discretas, aos 14 dias como moderadas e aos 28 dias como intensas.

A dilatação dos seios venosos é considerada uma lesão que não compromete a função do órgão, porém em caso de persistência da exposição pode progredir para uma lesão mais grave. A congestão dos seios venosos é uma lesão que pode levar a danos na função, sendo reversível em caso de melhora na qualidade da água ou progressiva nos casos de persistência de exposição (Poleksic e Mitrovic-Tudundzia, 1994).

Nas brânquias, hiperplasia e descolamento do epitélio lamelar (Rigolin-Sá, 1999; Jiraungkoorskul et al., 2002, 2003; Neskovic et al., 1996), congestão dos seios venosos e aneurisma (Jiraungkoorskul et al., 2002, 2003; Rigolin-Sá, 1999) e fusão de lamelas secundárias (Rigolin-Sá, 1999) também foram relatados em experimentos com o glifosato.

A maioria das lesões branquiais são mais graves nas exposições agudas letais que nas crônicas subletais, no entanto não são específicas e não estão relacionadas a nenhum tipo de agente tóxico (Wood, 2001). Nas brânquias dos peixes deste experimento, apesar da grande quantidade de alterações encontradas, nenhuma apresentou destaque que pudesse relacioná-las à exposição ao Roundup®. Este resultado é semelhante ao de Wood (2001), que assinala que as mudanças estruturais nas brânquias, embora indiquem dano, não são boa ferramenta para afirmar se o agente tóxico é ou não o causador do dano.

### *Biomarcadores histológicos...*

As alterações histológicas encontradas no fígado foram: congestão, hemorragia e necrose focal (Tab. 2). Foi também observada vacuolização dos hepatócitos e, por isso, em alguns fígados foi feita a coloração PAS para identificar presença de glicogênio, que foi evidenciado em grande quantidade nos hepáticos dos animais não expostos ao Roundup, contrariamente aos animais expostos, quando a presença de glicogênio foi bastante reduzida.

Os animais avaliados no dia zero apresentaram somente grau discreto de congestão e intenso de vacuolização. Os peixes expostos apresentaram nos dias 14 e 28 todas as alterações citadas, em graus de frequência que variaram de discreto a intenso. Porém, na análise estatística, foi observada diferença significativa para as alterações necrótica, congestiva e hemorrágica (Fig. 1) entre o grupo de animais amostrados no dia 28 e no dia zero. Todas as alterações

apresentaram aumento da frequência com o aumento do tempo de exposição.

Embora os hepatócitos estejam geralmente cheios de glicogênio ou gordura neutra, se a alimentação for suficiente (Roberts, 1981), durante as fases de resposta ao estresse em peixes, podem ocorrer três situações: a) na fase de alarme, mobilização do glicogênio hepático; b) na fase de resistência e adaptação, o glicogênio pode estar baixo ou não; e c) na fase de exaustão, pode ocorrer depleção do glicogênio hepático (Heath, 1995). De acordo com essas afirmações, o que foi observado no presente trabalho indica um estado normal nos peixes não expostos, os quais apresentaram hepatócitos cheios de glicogênio e um estado de estresse químico nos peixes expostos, uma vez que os vacúolos neles encontrados não indicaram a presença de glicogênio.

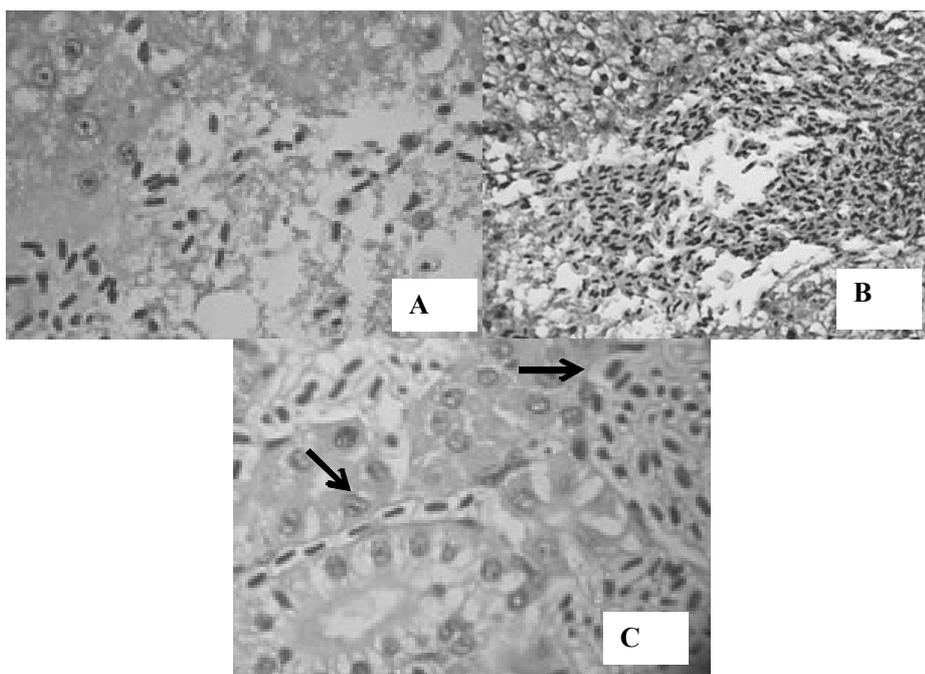


Figura 1. A: Fotomicrografia de fígado de piaçu exposto a 1,58ppm de Roundup® por 28 dias, demonstrando área de necrose focal. HE (400x). B: Fotomicrografia de fígado de piaçu exposto a 1,58ppm de Roundup® por 28 dias, demonstrando área de congestão e hemorragia. HE (100x). C: Fotomicrografias de rins de piaçus expostos a 1,58ppm de Roundup® por 14 dias, demonstrando congestão renal (setas).

Os resultados assemelham-se às alterações relatadas por outros autores, embora a maioria deles tenha trabalhado com concentrações mais altas e por um período menor que o utilizado

neste experimento. Rigolin-Sá (1999), ao estudar bagres expostos ao Roundup® por 96 horas, nas concentrações de 10, 11 e 12mg/L, observou aumento da frequência de hemorragias a partir de

10mg/L e vacuolização não reativa ao PAS, além de necrose focal em todos os exemplares expostos às três concentrações. As alterações regressivas, como degeneração e necrose, são processos nos quais há redução ou perda funcional de um órgão (Bernet et al., 1999). Em carpas expostas a 2,5; 5 e 10mg/L de glifosato por 14 dias, foram observadas lesões hepáticas somente nos animais expostos à concentração mais alta, sendo relatada congestão de poucos sinusoides e, em alguns locais, início de fibrose (Neskovic et al., 1996).

Langiano (2006) também encontrou congestão, núcleos picnóticos e vacuolização citoplasmática em curimatás expostos a 7,5 e 10ppm de Roundup por 6, 24 e 48 horas, e Jiraungkoorskul et al. (2002, 2003) verificaram em tilápias expostas a 36ppm por 24, 48, 72 e 96 horas e a 5 e 15ppm de Roundup®, por três meses, hipertrofia dos hepatócitos com núcleo picnótico e presença de vacúolos. Esses autores também verificaram maior frequência de lesões com o aumento do tempo de exposição, o que também foi observado no presente trabalho.

As alterações encontradas nos rins foram: vacuolização tubular, aumento do espaço da cápsula de Bowman e congestão (Tab. 2). A alteração que apresentou diferença estatística entre os tempos amostrais foi a congestão (Fig. 1), em que aos 14 dias houve maior grau de congestão em relação ao dia zero.

As alterações encontradas no presente trabalho são condizentes com as observadas por outros autores, como Rigolin-Sá (1999) e Jiraungkoorskul et al. (2002), que utilizaram o produto comercial Roundup. Os resultados encontrados diferiram, no entanto, dos relatados por Neskovic et al. (1996), que não observaram qualquer lesão renal em carpas expostas a 2,5; 5 e 10mg/L de glifosato por 14 dias.

A vacuolização tubular e o aumento do espaço da cápsula de Bowman encontrados neste trabalho também foram observados por Rigolin-Sá (1999), ao estudar bagres expostos a concentrações de Roundup®, que variaram de 8 a 12mg/L, por 96 horas. Além disso, esse autor encontrou outras alterações como degeneração tubular, desorganização de glomérulos, congestão de capilares glomerulares, hemorragia

no tecido linfoide, presença de células tubulares necróticas e necrose glomerular.

Jiraungkoorskul et al. (2002) encontraram em tilápias expostas a 36ppm de Roundup alguns glomérulos distorcidos, tumefação e vacuolização tubular com alguns núcleos picnóticos em exposições por 24, 48, 72 e 96 horas. Jiraungkoorskul et al. (2003), em teste crônico com três meses de duração, ao trabalharem com tilápias expostas a 5 e 15ppm de Roundup®, encontraram tumefação das células tubulares com aumento da severidade de acordo com o aumento do tempo e da concentração, além de distorções glomerulares e áreas necróticas na concentração mais alta. As alterações identificadas nos rins sugerem uma baixa nefrotoxicidade do herbicida na concentração testada.

## CONCLUSÕES

O fígado foi considerado um bom biomarcador histológico para a contaminação aquática com Roundup®, seguido pelos rins.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINATI, A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B. et al. Toxicidade aguda do herbicida Roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.8, p.184-192, 2007.
- AMARANTE Jr., O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova*, v.25, p.589-593, 2002.
- ARANA, L.V. *Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões*. Florianópolis: UFSC, 2004. 231p.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, v.22, p.25-34, 1999.
- EL-GENDY, K.S.; ALY, N.M.; EL-SEBAE, A.H. Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of bolti fish (*Oreochromis niloticus*). *J. Environ. Sci. Health*, v.33, p.135-149, 1998.
- FERREIRA, C.M. Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.;

### Biomarcadores histológicos...

- LIZAMA, M.A.P. (Eds). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, 2004. p.273-284.
- GLYPHOSATE: environmental health criteria 159. Geneva:WHO, 1994.
- GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat. Res.*, v.518, p.145-150, 2002.
- GRISOLIA, C.K. *Agrotóxicos – mutações, câncer e reprodução*. Brasília: UnB, 2005. 392p.
- HEATH, A.G. *Water pollution and fish physiology*. 2.ed. Florida: CRC Press, 1995. 384p.
- HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R. et al. Histopathology biomarkers. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE Jr., P.M. et al. *Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress*. Florida: Lewis, 1992. p.155-209.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M. et al. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Asia*, v.28, p.121-127, 2002.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M. et al. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.*, v.18, p.260-267, 2003.
- LANGIANO, V.C. *Toxicidade do Roundup e seus efeitos para o peixe neotropical Prochilodus lineatus*. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- LAZARRI, R.; RADUNZ NETO, J.; VIEIRA, V.L.P. et al. Influência do glifosato no crescimento de juvenis de piava (*Leporinus obtusidens*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: SBZ, 2004.
- LOMBARDI, J.V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO,R.M.; LIZAMA, M.A.P. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, 2004. p.263-272.
- LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3.ed. New York: MacGraw-Hill, 1968. p.38-39.
- MARTINS, M.L.; YOSHITOSHI, E.R. A new nematode species *Goezia leporini* N. sp. (Anisakidae) from cultured freshwater fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) in Brazil. *Braz. J. Biol.*, v.63, p.497-506, 2003.
- MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. et al. *Fundamentos da moderna aquicultura*. Canoas: ULBRA, 2001. 200p.
- NEŠKOVIC, N.K.; POLEKSIC1 V.; ELEZOVIC2 I. et al. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.56, p.295-302, 1996.
- OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. *Fundamentos e técnicas de manejo*. Guaíba: Agropecuária, 1998. 211p.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, 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, 1994. p.339-352.
- RIGOLIN-SÁ, O. *Toxicidade do herbicida Roundup (glifosato) e do acaricida Omite (propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre Rhamdia hilarii (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes)*. 1999. 307f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- ROBERTS, R.J. *Patologia de los peces*. Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 366p.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.*, v.6, p.75-86, 1997.
- SZAREK, J.; SIWICKI, A.; ANDRZEJEWSKA, A. et al. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Environ. Res.*, v.50, p.263-266, 2000.
- TATAJE, D.R.; ZANIBONI FILHO, E. Cultivo do gênero *Leporinus*. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, 2005. 468p.
- van DYK, J.C. *Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation*. 2005. 47f. Tese (Doutorado) - University of Johannesburg, Johannesburg, South Africa.
- WOOD, C.M. Toxic responses of the gill. In: SCHLENK, D.; BENSON, W.H. *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*. London: Taylor & Francis, 2001. p.1-64.