

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

João Paulo Silva Lorenzini

EFEITO AGUDO DA FORMALINA NO PEIXE TROPICAL
LOPHIOSILURUS ALEXANDRI

Belo Horizonte

2022

João Paulo Silva Lorenzini

Efeito agudo da formalina no peixe tropical *Lophiosilurus alexandri*

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal

Prof. Orientador: Kleber Campos Miranda Filho

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2022

L869e Lorenzini, Joao Paulo Silva, 1992 -
Efeitos agudos da formalina no peixe tropical *Lophiosilurus alexandri* / João Paulo Silva Lorenzini. – 2022.
55f.: il.

Orientador: Kleber Campos Miranda Filho
Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.
Área de concentração: Produção animal.
Bibliografia: f. 43 a 50.

1. Peixe – Doenças - Teses - 2. Aquicultura - Teses - 3. Histopatologia veterinária - Teses
I. Filho, Kleber Campos Miranda - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 639.3

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 30123-970 - Belo Horizonte- MG
TELEFONE (31)-3409-2173

www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao

E-mail cpgzootec@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE TESE DA ALUNO JOÃO PAULO SILVA LORENZINI

Às 08:00 horas do dia 11 de abril de 2022, reuniu-se, remotamente, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo colegiado no dia 17/03/2022, para julgar, em exame final, a defesa da tese intitulada: Efeitos agudos da formalina no peixe tropical *Lophiosilurus alexandri*, como requisito final para a obtenção do Grau de **Doutor em Zootecnia, área de concentração Produção Animal**

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Kleber Campos Miranda Filho, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento da tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

| | Aprovada | Reprovada |
|---|-------------------------------------|--------------------------|
| Prof.(a)/Dr.(a) Leandro Santos Costa | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Prof.(a)/Dr.(a) Kauana Santos de Lima Cipriano | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Prof.(a)/Dr.(a) Maria Clara Vieira Martins Starling | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Prof.(a)/Dr.(a) Galileu Crovatto Veras | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Prof.(a)/Dr.(a) Kleber Campos Miranda Filho | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado (a)

Reprovado (a)

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar 03 volumes encadernados da versão final da tese acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao (a) candidato (a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da tese apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 11 de abril de 2022. Assinatura dos membros da banca

Leandro Santos Costa

Galileu Crovatto Veras

Kauana Santos de Lima Cipriano

Kleber Campos Miranda Filho

Maria Clara Vieira Martins Starling

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo empenho e dedicação durante toda minha formação moral e intelectual.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES, pelo incentivo financeiro durante parte do doutorado.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho, pelos ensinamentos, pela amizade e confiança durante os nove anos de orientação.

Agradeço ao grupo do laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária principalmente à equipe de maricultura, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho, em especial à Dani e Maria Clara.

Aos amigos, em ordem alfabética Amanda Hastenreiter do Espírito Santo, Angelica da Silva Ferreira, Camila Gomes de Oliveira, Luanna do Carmo Neves, Raphael Nogueira Bahiense e Walisson Souza e Silva pelas discussões, agressões mútuas, alimentações fartas, risadas e momentos de diversão.

Ao Pedro Henrique Oliveira Pacheco, pela amizade e pelas partidas de FIFA.

À Luanna do Carmo Neves, pelo companheirismo, paciência, apoio e incentivo principalmente nos momentos mais difíceis durante essa jornada.

Em especial aos meus pais, Orestes Lorenzini e Mirtes da Silva Lorenzini e minha tia Mirian Fátima da Silva

Por todos que auxiliaram este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“So understand
Don't waste your time always searching for those wasted years
Face up, make your stand
Realize you're living in the golden years”
Adrian Smith

RESUMO

O combate a infestações parasitárias é um ponto importante na cadeia da produção de peixes. Diversos produtos podem ser utilizados no combate à essas infestações, o formol se destaca nesse contexto sendo o seu uso regulamentado pelo Food and Drug Administration (FDA) americano. O uso do formol se dá por meio de banhos terapêuticos. O presente estudo avaliou a toxicidade aguda do formol em juvenis de “pacamã” *Lophiosilurus alexandri* e sua recuperação (ambiente sem formol) por 24 horas, após exposição à formol (24 h). Juvenis de Pacamã (n = 100) com peso médio de $126,2 \pm 41,4$ g foram expostos a 108,0, 270,0, 680,0, 1.674,0 mg L⁻¹ de formalina. O teste teve 24 h de exposição e 24 h de recuperação. As concentrações letais medianas de 2h (CL_{50-2h}) foram estimadas em 988,82 mg L⁻¹ de formalina. A exposição à formol causou um aumento no cortisol, glicose, lactato, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Após 24 h de recuperação, o cortisol não atingiu os níveis do tratamento controle. Foram observadas Alterações histológicas branquiais em todos os tratamentos como hiperplasia epitelial descolamento e aneurisma em todos os tratamentos, a maior taxa de lesão branquial foi observada no tratamento T₁₆₇₄. A maior taxa de lesão hepática foi observada no tratamento T₂₇₀, neste tratamento predominaram lesões nucleares e vasculares no fígado. Concluimos que *L. alexandri* pode ser exposto com segurança a 98,9 mg L⁻¹ de formol por um período máximo de 2 h sem danos significativos ao organismo. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos somados à análise histopatológica são boas ferramentas para avaliar a resposta do organismo ao estresse agudo do formol.

Palavras chave: hematologia, histopatologia, toxicidade, aquacultura

ABSTRACT

Combating parasitic infestations is an important point in the fish production chain. Several products can be used to combat these infestations, formaldehyde stands out in this context, and its use is regulated by the American Food and Drug Administration (FDA). The use of formaldehyde occurs through therapeutic baths. This study evaluated the acute toxicity of formalin in juveniles of "pacamã" *Lophiosilurus alexandri* and its recovery (environment without formalin) for 24 hours, after acute exposure to formalin (24 h). Pacamã sub-adults (n = 100) with an average weight of 126.2 ± 41.4 g were exposed to 108.0, 270.0, 680.0, 1,674.0 mg L⁻¹ formalin. The test had 24 h of exposure and 24 h of recovery. The median lethal concentrations of 2 h (LC_{50-2h}) were estimated at 988.82 mg L⁻¹ of formalin. Exposure to formalin caused an increase in cortisol, glucose, lactate, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT). After 24 h of recovery, cortisol did not reach the levels of the control treatment. Gill histological changes in all treatments such as hyperplasia epithelial detachment and aneurysm in all treatments and the highest rate of gill injury were observed in treatment T₁₆₇₄. The highest rate of liver injury was observed in the T₂₇₀ treatment, in this treatment, nuclear and vascular lesions in the liver predominated. We concluded that *L. alexandri* can be safely exposed to 98.9 mg L⁻¹ of formalin for a maximum period of 2 h without significant damage to the organism. Hematology and biochemical parameters added to histopathology analysis are good tools to evaluate the body's response to formalin acute stress.

Keywords: hematology, histopathology, toxicity, aquaculture

Sumário

| | |
|--|--------------------------------------|
| INTRODUÇÃO | 4 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| <i>Espécie estudada: Pacamã</i> | 5 |
| <i>Formalina</i> | 5 |
| <i>Resposta ao estresse em peixes</i> | 8 |
| <i>Biomarcadores</i> | 9 |
| <i>Análises hematológicas e bioquímicas</i> | 10 |
| <i>Histopatologia</i> | 10 |
| OBJETIVOS | 13 |
| Geral | 13 |
| Específicos | 13 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 13 |
| ARTIGO | 19 |
| 1. Introduction | 21 |
| 2. Material and methods | 22 |
| 2.1 <i>Biological material</i> | 22 |
| 2.3 <i>Acute toxicity tests with formalin</i> | 23 |
| 2.4 <i>Recovery test</i> | 24 |
| 2.5 <i>Hematological and biochemistry studies</i> | 24 |
| 2.6 <i>Histopathology</i> | 25 |
| 2.6 <i>Histopathological index</i> | 25 |
| 2.7 <i>Scanning electron microscopy (SEM)</i> | 26 |
| 2.8 <i>Statistical analysis</i> | 26 |
| 3. Results | 27 |
| 3.1 <i>Median lethal concentration - LC₅₀</i> | 27 |
| 3.2 <i>Hematological and biochemistry studies</i> | 27 |
| 3.3 <i>Recovery</i> | 30 |
| 3.4 <i>Histopathology</i> | 31 |
| 4 Discussion | 37 |
| 5. Conclusion | 44 |
| Acknowledgments | Erro! Indicador não definido. |
| References | 44 |

1 INTRODUÇÃO

2 Segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura (Peixe BR, 2020), em
3 2019, a produção nacional de peixes apresentou crescimento do total produzido de
4 aproximadamente 5% em comparação ao ano anterior, totalizando 35% de
5 crescimento acumulado de 2014 até 2019. A espécie mais produzida foi a tilápia
6 *Oreochromis niloticus*, representando 57% da produção nacional. Já a produção de
7 peixes nativos não apresentou crescimento ente 2018 e 2019 e representou 38% do
8 total produzido.

9 Espécies nativas têm o benefício da adaptação às condições climáticas de
10 produção. Apesar desse potencial, esses animais, muitas vezes são cultivados em
11 sistemas de produção menos eficientes, o que dificulta a adoção de cultivos em
12 grande escala, refletindo nos custos de produção (Sousa, 2017). Para o cultivo de
13 uma determinada espécie, o desenvolvimento e o domínio do pacote tecnológico são
14 fundamentais para o sucesso comercial. Esse pacote deve abranger diversas áreas
15 da produção, tais como reprodução e larvicultura, nutrição, técnicas de manejo,
16 sistemas de produção, sanidade, entre outras.

17 No que diz respeito à área de sanidade, vários produtos químicos podem ser
18 utilizados na piscicultura (e.g. controle de ectoparasitas, de endoparasitas etc.) e para
19 que esse uso seja seguro é necessária a realização de diversos estudos. Dentre
20 esses, os testes de toxicidade (agudos e crônicos) são importantes para determinar a
21 tolerância dos animais aos futuros tratamentos sanitários ou condições de cultivo.
22 Algumas ferramentas, como biomarcadores, podem estar associadas aos efeitos
23 observados nos testes de toxicidade. A tolerância dos animais a um agente
24 estressante pode ser refletida pela resposta do organismo por meio da análise de
25 parâmetros hematológicos, estudo da integridade tecidual de alguns órgãos e a
26 composição bioquímica do plasma.

27

28 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

29

30 *Espécie estudada: Pacamã*

31 O Pacamã *Lophiosilurus alexandri* é um peixe de água doce, nativo da bacia
32 do Rio São Francisco e pertencente à ordem dos Siluriformes. Possui hábito bentônico
33 e carnívoro e é descrita como uma espécie de interesse da pesca extrativista e com
34 aceitação do mercado consumidor, se destacando pelo alto rendimento de carcaça de
35 até 84% (Meurer et al., 2010). Devido à pressão da atividade pesqueira, associada às
36 alterações antrópicas no seu habitat, o pacamã é considerado uma espécie vulnerável
37 à extinção, de acordo com o Instituto Chico Mendes de Conservação da
38 Biodiversidade (ICMbio, 2018).

39 Diferentemente de outras espécies de interesse comercial da bacia do Rio São
40 Francisco, o pacamã não é um peixe reofílico, possuindo desova parcelada (Sato et
41 al., 2007) e seu manejo reprodutivo em cativeiro propicia programas de
42 repovoamento. Na natureza, seu período reprodutivo se concentra entre os meses de
43 agosto e março. Por outro lado, esse período pode ser estendido por meio do controle
44 da temperatura da água de cultivo em cativeiro (Santos et al., 2012). Atualmente, os
45 processos de reprodução (Costa et al., 2015) e larvicultura (Cordeiro et al., 2016) em
46 laboratório são dominados, o que possibilita uma disponibilidade constante de formas
47 jovens, passo imprescindível para o desenvolvimento da produção comercial de uma
48 espécie (Andrade e Yasui, 2003).

49 Em paralelo já foram realizados estudos que colaboram para a elaboração de
50 um pacote tecnológico para o cultivo da espécie, entre as áreas exploradas podemos
51 destacar, fisiologia (Favero et al., 2019; Mello et al, 2017), qualidade de água (dos
52 Santos-Silva et al., 2017), nutrição (Figueiredo et al., 2014; Oliveira et al., 2020), entre
53 outras. O desenvolvimento destes e de novos estudos é de fundamental importância
54 para viabilizar o cultivo comercial de *L. alexandri*.

55

56 *Formalina*

57 Problemas sanitários, decorrentes de infestações parasitárias, provocam
58 frequentemente perdas econômicas significativas na aquicultura. Animais acometidos
59 sofrem com redução da imunidade e são porta de entrada para outras enfermidades

60 como infecções bacterianas. A importância das infestações subsidia diversos estudos
61 sobre sua profilaxia e tratamento, esse último quase na sua totalidade constitui na
62 utilização de agentes químicos na forma de banhos de imersão. Uma das substâncias
63 mais utilizadas para esses fins é a formalina, sua obtenção ocorre por meio da
64 dissolução de formaldeído gasoso (H_2CO) em água, dando origem ao hidrato
65 $H_2CO(OH)_2$, o ponto de equilíbrio desta reação é próximo de 40%. Dessa forma, a
66 apresentação comercial da formalina geralmente está entre 37 a 40% de peso do
67 formaldeído em água (Leal et al., 2018). Trata-se de uma substância eletrofílica com
68 alta reatividade química à compostos biológicos, sua função antiparasitária se deve à
69 sua forma de atuação sobre os microrganismos, agindo por meio da alquilação de
70 radicais proteicos e nos ácidos nucleicos, induzindo ligações cruzadas (DNA-
71 proteínas), impedindo que essas estruturas realizem suas funções (Casanova-Smith
72 e Heck, 1983).

73 Na aquicultura, a formalina já é amplamente utilizada principalmente no
74 tratamento a infecções parasitárias nas brânquias e na pele dos peixes, a principal
75 forma de utilização da formalina é por meio de banhos de imersão. Como o objetivo
76 da utilização da formalina é o tratamento de ectoparasitas, sua forma de utilização se
77 dá por meio de banhos terapêuticos, fazendo com que a formalina entre em contato
78 com os ectoparasitas. O tratamento pode ser de curta duração, entre 30 minutos e 2
79 horas, ou banhos de longa duração (de até 12 h), sendo que quanto maior o tempo
80 de exposição menor são as concentrações utilizadas (Schalch et al., 2009). A eficácia
81 de banhos terapêuticos de curta duração de formalina já foi comprovada frente a
82 monogêneas (Pahor-Filho et al., 2012; Paixão et al., 2013) e protozoários (Rowland et
83 al., 2009; Leal et al., 2018). Apesar de ser um composto de alta toxicidade, os banhos
84 terapêuticos contribuem para sua adoção como método de tratamento em
85 pisciculturas em função da sua alta eficácia de tratamento, do baixo custo e também
86 por ser um produto que possui autorização pelo órgão regulador dos Estados Unidos
87 da América, a FDA (*Food and Drug Administration*). São autorizados o uso de três
88 parasiticidas formulados com formalina, sendo eles, FORMALIN-F (Natchez Animal
89 Supply, Natchez, MS, USA), PARACIDE-F (Argent Chemical Laboratories, Redmond,
90 WA, USA) e PARASITE-S (Western Chemical Inc., WA, USA) (Hung et al., 2019).

91 Da mesma forma que a formalina age afetando o ectoparasita, ela também age
92 sobre o hospedeiro. Portanto, as concentrações e o tempo de exposição devem ser

93 avaliados de acordo com a espécie e com a fase de vida, de forma que elas sejam
94 efetivas ao combate dos ectoparasitas e minimizem o estresse gerado ao animal em
95 tratamento (Leal et al., 2018; Neves et al., 2020). Esse conhecimento pode ser obtido
96 através da realização de testes de toxicidade (agudos e/ou crônicos).

97 Os testes agudos submetem os organismos às concentrações crescentes de
98 determinada substância por períodos curtos, de no máximo 96 h. Neste período de
99 exposição são avaliados os possíveis efeitos deletérios causados pela exposição à
100 substância testada (CETESB, 1999). A entrada da formalina do meio ambiente para a
101 corrente sanguínea se dá principalmente através do tecido branquial e epitelial,
102 entretanto, a rota metabólica dessa substância em organismos aquáticos ainda não é
103 totalmente esclarecida (Leal et al., 2018).

104 Por isso, os testes agudos são considerados o ponto de partida para se ter
105 conhecimento do efeito de determinada substância em um organismo específico
106 (Randall e Tsui, 2002). Os resultados dos testes de toxicidade aguda são expressos
107 como concentração letal mediana (CL₅₀), ou seja, a concentração de substância
108 necessária para causar a morte de metade da população dentro de determinado
109 período (Bertolleti, 2001). A eficiência dos testes toxicológicos pode ser elevada
110 quando são associados ao acompanhamento de bioindicadores da condição
111 fisiológica dos animais (dos Santos-Silva et al., 2018).

112 A toxicidade da formalina já foi estudada em diversas espécies de água doce e
113 salgada com interesse na aquicultura, tais como o bagre *Ictalurus punctatus*, a truta
114 arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Bills et al., 1977), “bullseye puffer” *Sphoeroides*
115 *annulatus* (Fajer-Avila et al., 2003), o robalo *Morone saxatilis* (FDA, 2002), a tainha
116 *Mugil lisa* (Pahor-Filho et al., 2012), o pacamã *L. alexandri* (Neves et al., 2020), entre
117 outras. Já se tem conhecimento dos efeitos deletérios da formalina em várias espécies
118 de peixes, dentre os quais podemos destacar, danos ao tecido branquial (Neves et al.,
119 2020), alteração nos parâmetros hematológicos (Leal et al., 2018) e dos parâmetros
120 bioquímicos do plasma sanguíneo (Andrade e Porto et al., 2017). Esses dados
121 reforçam a importância do conhecimento dos efeitos da formalina no organismo a ser
122 tratado, visando o combate a ectoparasitas de peixes.

123 *Resposta ao estresse em peixes*

124 A resposta dos peixes frente a agentes estressores pode ser dividida de forma
125 simplificada em três respostas, primária, secundária e terciária. As duas primeiras são
126 substancialmente respostas fisiológicas, enquanto a terceira engloba o organismo do
127 animal como um todo (Barton, 2002), sendo também conhecida como de efeito
128 duradouro. De maneira simplificada, os mecanismos desencadeados nas respostas
129 primária e secundária buscam e disponibilizam a energia demandada em situações
130 de luta, enfrentamento e fuga (Barcellos et al., 2012).

131 A resposta primária se inicia com a identificação do agente estressor pelo
132 sistema nervoso central, em seguida, o hipotálamo envia, por meio do sistema
133 nervoso simpático, estímulos para as células cromafins, localizadas na região anterior
134 dos rins (Oba, 2009). As catecolaminas, em peixes ósseos principalmente a
135 epinefrina, são armazenadas nessas células que quando estimuladas, liberam
136 rapidamente seu conteúdo aumentando a concentração na corrente sanguínea
137 (Barton, 2002; Schreck e Tort, 2016). As concentrações elevadas de catecolaminas
138 provocam alterações nos sistemas circulatório e cardiovascular dos peixes, realizando
139 alterações que culminam na maior capacidade de captação e transporte de oxigênio
140 no sangue (Oba, 2009).

141 Alguns minutos após a liberação das catecolaminas se ativa o eixo hipotálamo-
142 hipófise-interrenal, que culmina com a liberação do hormônio corticosteroide, o cortisol
143 (Barton et al., 1998). O eixo se inicia com a liberação pelo hipotálamo de fatores
144 liberadores de corticotrofinas (CRFs), esses estimulam a produção e secreção pela
145 hipófise do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que induz a síntese de cortisol
146 (Barton, 2002). Todo o processo de controle de liberação do cortisol é feito por
147 “feedback”, alta concentração de cortisol no sangue inibe a produção e liberação de
148 ACTH na glândula hipófise (Oba, 2009). O pico das concentrações de cortisol
149 geralmente é atingido entre 30 e 60 minutos após a exposição (Barton e Iwama, 1991),
150 e assim podem permanecer por até seis horas. Caso o agente estressor persista por
151 tempo prolongado, as concentrações de cortisol reduzem, entretanto, se mantêm em
152 níveis superiores ao considerado basal (Pickering e Pottinger, 1989).

153 Os atores principais da resposta primária, cortisol e as catecolaminas, são
154 também os precursores da resposta secundária e essa é composta por respostas

155 metabólicas, celulares, hematológicas, distúrbios osmorregulatórios e imunes (Barton,
156 2002). Tanto as catecolaminas quanto o cortisol atuam nos hepatócitos
157 potencializando o processo de gliconeogênese (Zhang et al., 2015), aumentando os
158 níveis de glicose na corrente sanguínea, tornando-a facilmente disponível para
159 utilização dos tecidos demandados (Schreck e Tort, 2016). Em algumas situações, a
160 demanda energética pode ser tão alta que somente a obtenção de energia por via
161 aeróbica não é suficiente, nesses casos o organismo lança mão da via anaeróbica
162 para suprir essa demanda, o principal metabólito dessa via é o lactato (Brandão et al.,
163 2006; Barbosa et al., 2007).

164 Além da gliconeogênese, as catecolaminas também induzem mudanças
165 cardiorrespiratórias, alterações que buscam aumentar a capacidade de captação e o
166 transporte de oxigênio. Já a elevação das taxas ventilatórias aumenta o fluxo de
167 oxigênio dissolvido através das brânquias (Rodnick e Planas, 2016). As catecolaminas
168 também agem reduzindo a resistência vascular nas brânquias permitindo maior fluxo
169 sanguíneo nas brânquias, o que aumenta capacidade do organismo de captar
170 oxigênio (Nilsson e Sundin, 1998). Para elevar a capacidade de distribuição do
171 oxigênio captado nas brânquias, as catecolaminas induzem a produção de células
172 vermelhas do sangue, sendo observadas aumento nas concentrações de eritrócitos e
173 hemoglobina (Oba, 2009).

174 *Biomarcadores*

175 No início da década de 1990 se intensificaram estudos sobre os efeitos de
176 poluentes presentes por ação antrópica no ambiente aquático. Os peixes
177 particularmente estão expostos à uma grande diversidade de poluentes provenientes
178 de diversas fontes. Esses poluentes provocam diversas alterações bioquímicas,
179 celulares e comportamentais, foi nessa época que o acompanhamento de
180 biomarcadores que demonstram essas alterações ganhou força. São considerados
181 biomarcadores análises bioquímicas, fisiológicas, histológicas que demonstram a
182 ação desses agentes tóxicos no organismo (Al-Khashali e Al-Shawi, 2013; Bernet et
183 al., 1999).

184

185 *Análises hematológicas e bioquímicas*

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

Um dos biomarcadores mais utilizadas para o acompanhamento da resposta ao estresse dos peixes é a utilização de análises hematológicas e de composição bioquímica do plasma (Peres et al., 2015). As concentrações de cortisol e glicose são tidas como os principais indicadores de estresse em peixes (Fazio, 2019). O cortisol é tido como o melhor indicador da resposta primária ao estresse, uma vez que o pico das catecolaminas ocorre de maneira quase que imediata à exposição ao estresse, isso inviabiliza tecnicamente a identificação desse pico em análises plasmáticas (Fabbri et al., 1998). As concentrações plasmáticas de glicose são os biomarcadores mais utilizados para identificação do desencadeamento da resposta secundária em peixes (Schreck e Tort, 2016).

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

A literatura já mostra que a exposição aguda à formalina altera os parâmetros hematológicos e a composição bioquímica do plasma, incluindo alterações nos níveis de cortisol e glicose (Sandoval-Gío, 2019), hemoglobina e hematócrito (Jung et al., 2003). Além da resposta ao estresse, análises da composição bioquímica do plasma podem ser utilizadas como indicadores de outros processos fisiológicos, como por exemplo, a função hepática. Nesse caso, podemos destacar as enzimas intracelulares, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A identificação de elevadas concentrações dessas enzimas no plasma sanguíneo é uma indicação de danos teciduais e como essas enzimas se localizam predominantemente em células hepáticas, elas são consideradas indicadoras de danos no fígado (Kori-Siakpere et al., 2011). A literatura que relata efeitos deletérios da formalina sobre o fígado de peixes é escassa, sendo descritas somente alterações nos níveis plasmáticos de AST após a exposição à formalina (Jung et al., 2003).

209

210 *Histopatologia*

211

212

213

214

215

A histopatologia é o método que nos permite avaliar o efeito de determinada substância em um organismo nos níveis, tecidual e celular. A Histopatologia vem sendo amplamente utilizada em estudos sobre a ação de contaminantes em peixes (Camargo e Martinez, 2007). As análises se baseiam na determinação e quantificação de alterações na morfologia, distribuição, atividade e atributos de função celular.

216 Muitas das vezes as análises histopatológicas são utilizadas com base na
217 descrição das lesões observadas, isso dificulta a comparação do grau de
218 comprometimento do tecido ou órgão. Para isso existem algumas metodologias que
219 permitem a criação de índices de lesões para cada órgão, essas metodologias levam
220 em consideração os tipos de lesões, a intensidade da lesão e a distribuição delas no
221 órgão, esses índices nos permitem avaliar o grau de acometimento de cada órgão e
222 até compará-los (Bernet et al., 1999).

223 Em ensaios toxicológicos, os principais alvos de estudos histopatológicos em
224 peixes a compostos tóxicos são o fígado e as brânquias. Ambos estão diretamente
225 associados aos processos de entradas no organismo, metabolização,
226 biotransformação e excreção de compostos tóxicos (Wolf et al., 2015). Nesse
227 contexto, as brânquias por estarem em contato direto com o ambiente externo, são
228 mais vulneráveis às agressões físicas, químicas e biológicas (Santos et al., 2021).

229 Nos peixes, as brânquias são responsáveis pelo processo de trocas gasosas,
230 ionorregulação, osmorregulação e excreção de compostos tóxicos. Para ser eficiente
231 nessas funções, as brânquias possuem uma ampla área de superfície para efetuar
232 trocas com o meio circundante (Wolf et al., 2015), essa característica que facilita a
233 execução de suas funções, a tornam mais vulneráveis a qualquer alteração no
234 ambiente aquático (Shiogiri et al., 2012). O que garante maior área de contato é sua
235 estrutura, basicamente as brânquias são formadas por rastros branquiais que contêm
236 os filamentos branquiais e destes derivam um conjunto de lamelas branquiais. A parte
237 funcional da brânquia, onde são realizadas as trocas gasosas se encontra nas lamelas
238 branquiais, o sangue chega as lamelas através de duas artérias presente no filamento
239 branquial, um vaso aferente parte da base à região apical do filamento e um vaso
240 eferente em sentido contrário (Pough et al., 2008; Park et al., 2014).

241 As repostas do tecido branquial às agressões químicas são marcadas por um
242 número reduzido de alterações celulares e teciduais, a mais comum é a hiperplasia
243 de células epiteliais. A brânquia é o órgão mais analisado em estudos histopatológicos
244 realizados com organismos aquáticos expostos aos compostos químicos, como o
245 formol. Como descrito anteriormente, os banhos de formol são capazes de provocar
246 histopatologias, quais sejam, fusão lamelar, descolamento epitelial e telangiectasia
247 em formas juvenis de pirarucu *Arapaimas gigas* (Andrade-Porto et al., 2018a),

248 hiperplasia e descolamento epitelial em tainhas *Mugil lisa* (Pahor-Filho et al., 2015a),
249 fusão lamelar, descolamento epitelial e telangiectasia em formas jovens de pacamã *L.*
250 *alexandri* (Neves et al., 2020).

251 A hiperplasia e o desprendimento epitelial são mecanismos de defesa do
252 organismo, buscando proteger as lamelas reduzindo o contato com o agente
253 estressor, entretanto, como consequência, acaba reduzindo o espaço entre as
254 lamelas e dependendo do nível das alterações pode até impedir o funcionamento das
255 brânquias (Wolf et al., 2015).

256 O fígado em peixes é o órgão responsável pela assimilação de nutrientes,
257 produção de bile, desintoxicação e manutenção da homeostase metabólica do corpo
258 além de atuar também na síntese de proteínas plasmáticas (Genten, 2009). Devido
259 ao seu papel no metabolismo de poluentes orgânicos e inorgânicos, o fígado
260 frequentemente é escolhido como alvo de estudos histopatológicos (Camargo e
261 Martinez, 2007).

262 A estrutura do tecido hepático é composta pelas células do parênquima
263 hepático, os hepatócitos e um conjunto de fibras responsável por dar estrutura aos
264 hepatócitos (Wolf et al., 2015). Estes possuem formato poligonal, núcleo centralizado
265 e em evidência. É no citoplasma dos hepatócitos que se encontram, o lipídeo e o
266 glicogênio, armazenados no fígado. Em cortes histológicos ambos se apresentam em
267 formas vacuolizadas devido ao processo de preparação das lâminas (Genten,2009).

268 O fígado recebe o fluxo sanguíneo de duas fontes diferentes. A primeira seria
269 por meio da artéria hepática, se originando nas brânquias e por isso, sendo um sangue
270 rico em oxigênio. A segunda chega ao fígado através da veia porta, esta entrega ao
271 fígado um sangue rico em nutrientes oriundo do estômago (Wolf et al., 2015). Ao
272 chegar ao fígado, tanto a veia porta quanto a artéria hepática se ramificam em vasos
273 de menor calibre, os sinusóides, estes estão em contato direto com os hepatócitos e
274 são responsáveis pela troca de metabólitos e nutrientes (Camargo e Martinez, 2007).

275

276 **OBJETIVOS**

277

278 **Geral**

279

280 Avaliar a tolerância e as respostas fisiológicas dos pacamãs submetidos ao
281 teste de toxicidade aguda com formalina.

282

283 **Específicos**

284

285 Determinar a tolerância por meio da concentração letal mediana (CL₅₀) de
286 formol para sub-adultos de pacamã;

287 Realizar avaliações das patologias teciduais, assim como avaliações
288 hematológicas e bioquímicas do sangue de pacamãs submetidos aos testes de
289 toxicidade aguda com formalina.

290

291 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

292

293 AL-KHASHALI, M. S., AL-SHAWI, S. A. S. Effect of salt stress on ALT and AST enzymes
294 activity and cortisol level in adults of *Carassius auratus*. Pak. J. Nutr., v.12, n.1,
295 p.97-100, 2013. <https://doi.org/10.3923/pjn.2013.97.100>

296 ANDRADE, D. R., YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e artificial e sua
297 importância na produção de peixes no Brasil. Rev. Bras. Reprod. Anim., v.27, n.2,
298 p.166-172, 2003.

299 ANDRADE-PORTO, S. M., AFFONSO, E. G., KOCHHANN, D., MALTA, J. C. O.,
300 ROQUE, R., ONO, E. A., ARAÚJO C. S. O., TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic
301 efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae).
302 Aquaculture, v.479, p.38-44, 2017.

303 ANDRADE-PORTO, S. M., RAMOS, C. A., ROQUE, R., AFFONSO, E. G.,
304 BARCELLOS, J. F. M., QUEIROZ, M. N., ARAÚJO, C. S. O., TAVARES-DIAS, M.
305 Histopathological evaluation of formalin toxicity in *Arapaima gigas* (Arapaimidae),

- 306 the giant fish from Amazon. *Pes. Vet. Bras.*, v.38, n.6, p.1015-1025, 2018.
307 <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5106>
- 308 BARBOSA, L. G., MORAES, G., INOUE, L. A. K. A. Respostas metabólicas do matrinxã
309 submetido a banhos anestésicos de eugenol. *Acta Sci. Biol. Sci.*, v.29, n.3, p.255-
310 260, 2007.
- 311 BARCELLOS, L. J. G., KREUTZ, L. C., KOAKOSKI, G., OLIVEIRA, T. A., da ROSA, J.
312 G. S., FAGUNDES, M. Fish age, instead of weight and size, as a determining factor
313 for time course differences in cortisol response to stress. *Physiol. Behav.*, v.107,
314 n.3, p.397-400, 2012.
- 315 BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to
316 changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.*, v.42, n.3, p.517-525,
317 2002.
- 318 BARTON, B. A., IWAMA G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture
319 with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*,
320 v.1, p.3-26, 1991.
- 321 BARTON, B. A., RAHN, A. B., FEIST G., BOLLIG H., SCHRECK C. B. Physiological
322 stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Polyodon spathula*) to
323 acute physical disturbances. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.120A, p.355-363, 1998.
- 324 BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for
325 a protocol to assess aquatic pollution. 1999, p.25-34.
- 326 BERTOLLETI, E. Ecotoxicologia aquática. In: MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARRELA,
327 W. Indicadores ambientais: conceitos e aplicações. São Paulo: EDUC. 2001, p.219-
328 228.
- 329 BILLS, T. D., MARKING, L. L., CHANDLER Jr, J. H. Formalin: its toxicity to nontarget
330 aquatic organisms, persistence, and counteraction. *Invest. Fish Control.*, v.73, p.7,
331 1977.
- 332 BRANDÃO, F. R., GOMES, L. D. C., CHAGAS, E. C., Respostas de estresse em
333 pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazon.*,
334 v.36, n.3, p.349-356, 2006.

- 335 CASANOVA-SCHMITZ, M., HECK, H. D. A. Effects of formaldehyde exposure on the
336 extractability of DNA from proteins in the rat nasal mucosa. *Toxicol. Appl.*
337 *Pharmacol.*, v.70, n.1, p.121-132, 1983.
- 338 CETESB. Companhia de Saneamento Ambiental. Métodos de avaliação da toxicidade
339 de poluentes a organismos aquáticos. São Paulo, 1999, 149p.
- 340 CORDEIRO, N. I. S., COSTA, D. C., SILVA, W. S., TAKATA, R., MIRANDA-FILHO, K.
341 C., LUZ, R. K. High stocking density during larviculture and effect of size and diet
342 on the production of juvenile *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876
343 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *J. Appl. Ichthyol.*, v.32, p.61-66, 2016.
- 344 dos SANTOS-SILVA, M. J., COSTA, F. F. B., LEME, F. P., TAKATA, R., COSTA, D. C.,
345 MATTIOLI, C. C., LUZ, R. K., MIRANDA-FILHO, K. C. Biological responses of
346 neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite.
347 *Sci. Total Environ.*, v.616-617, p.1566-1575, 2018.
- 348 FABRI, E., CAPUZZO, A., MOON, T. W. The role of circulating catecholamines in the
349 regulation of fish metabolism: An overview. In *Comp. Biochem. Physiol. Part Part*
350 *C*, v.120, 1998.
- 351 FAJER-ÁVILA, E. J., ABDO-DE LA PARRA, I., AGUILAR-ZARATE, G., CONTRERAS-
352 ARCE, R., ZALDÍVAR-RAMÍREZ, J., BETANCOURT-LOZANO, M. Toxicity of
353 formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its
354 effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture*, v.223, p.41-50, 2003.
- 355 FAVERO, G. C., BOAVENTURA, T. P., FERREIRA, A. L., SILVA, A. C., PORTO, L. A.,
356 LUZ, R. K. Fasting/re-feeding, and water temperature promote the mobilization of
357 body reserves in juvenile freshwater carnivorous catfish *Lophiosilurus alexandri*.
358 *Aquaculture*, v.511, p.734223, 2019.
- 359 FAZIO, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review.
360 *Aquaculture*, v.500, p.237-242, 2019.
- 361 FDA. Food and Drug Administration. Certain Other Dosage Form New Animal Drugs;
362 Formalin Solution. *Code of Federal Regulations*, 21 CFR Part. 529.1030, 1998.
- 363 FIGUEIREDO, R. A. C. R., SOUZA, R. C., BEZERRA, K. S., CAMPECHE, D. F. B.,
364 CAMPOS, R. M. L., SOUZA, A. M., MELO, J. F. B. Relação proteína: carboidrato

- 365 no desempenho e metabolismo de juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).
366 Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.66, n.5, p.1567-1576, 2014.
- 367 ICMBIO/MMA. Instituto Chico Mendes de Conservação da biodiversidade/Ministério do
368 Meio Ambiente. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção:
369 Volume VI - Peixes. 2018.
- 370 JUNG, S. H., SIM, D. S., PARK, M. S., JO, Q., KIM, Y. Effects of formalin on
371 haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*
372 (Temminck et Schlegel). Aquac. Res., v.34, n.14, p.1269-1275, 2003.
- 373 KORI-SIAKPERE, O., IKOMI, R. B., OGBE, M. G. Biochemical response of the African
374 catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) to sublethal concentrations of potassium
375 permanganate. Ann. Biol. Res., v.2, n.2, p.1-10, 2011.
- 376 LEAL, J. F., NEVES, M. G. P., SANTOS, E. B., ESTEVES, V. I. Use of formalin in
377 intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality.
378 Vet. Aquacult., v.10, n.2, p.281-295, 2018.
- 379 MELLO, G. C., SANTOS, M. L., ARANTES, F. P., PESSALI, T. C., BRITO, M. F.,
380 SANTOS, J. E. Morphological characterization of the digestive tract of the catfish
381 *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes, Pseudopimelodidae).
382 Acta Zool., v.100, n.1, p.14-23, 2019.
- 383 MEURER, F., OLIVEIRA, S. T., DOS SANTOS, L. D., DE OLIVEIRA, J. S., COLPINI, L.
384 M. Níveis de oferta de alimento vivo para alevinos de pacamã (*Lophiosilurus*
385 *alexandri*). Rev. Bras. Cienc. Agrar., v.17, p.305-309, 2010.
- 386 NEVES, L. C., MIRANDA-FILHO, K. C., LORENZINI, J. P. S., NAKAYAMA, C. L., LUZ,
387 R. K. Effect of formalin in early stages of the freshwater neotropical catfish,
388 *Lophiosilurus alexandri*. Environ. Toxicol. Pharmacol., v.73, p.103277, 2020.
- 389 NILSSON, S., SUNDIN, L. Gill blood flow control. Comp. Biochem. Physiol. A., v.119,
390 n.1, p.137-147, 1998.
- 391 OBA, E. T., MARIANO, W. dos S.; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados:
392 agravantes e atenuantes para o manejo rentável. Manejo e sanidade de peixes em
393 cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, 2009, p.226-247.

- 394 OLIVEIRA, C. G. D., ESPÍRITO SANTO, A. H. D., GUILHERME, H. D. O., SANTOS, F.
395 A. C. D., SILVA, L. F. D. S., SANTOS, W. M. D., RIBEIRO, P. A. P. Effect of corn in
396 diets for carnivorous catfish (*Lophiosilurus alexandri*) on metabolic and performance
397 parameters. *Aquac. Res.*, v.51, n.11, p.4507-4516, 2020.
- 398 PAHOR-FILHO, E., MIRANDA-FILHO, K.C., PEREIRA-JUNIOR, J. Parasitology of
399 juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host.
400 *Aquaculture*, v.354, p.111-116, 2012.
- 401 PAIXÃO, L. F., SANTOS, R. F. B., RAMOS, F. M., FUJIMOTO, R. Y. Efeitos do
402 tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e
403 parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus* sp. (Osteichthyes:
404 Characidae). *Acta Amaz.*, v.43, p.211-216, 2013.
- 405 PARK, S. B., JANG, H. B., FAGUTAO, F. F., KIM, Y. K., NHO, S. W., CHA, I. S., YU, J.
406 E., JUNG, T. S. Combination treatment against scuticociliatosis by reducing the
407 inhibitor effect of mucus in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish and Shellfish*
408 *Immunology*, v.38, n.2, p.282-286, 2014.
- 409 PEIXE BR. Anuário da Piscicultura 2020. Peixe BR - Associação Brasileira da
410 Piscicultura, São Paulo, 2020.
- 411 PERES, H., COSTAS, B., PEREZ-JIMENEZ, A., GUERREIRO, I., OLIVA-TELES, A.
412 Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of
413 Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive
414 aquaculture conditions. *J. Appl. Ichthyol.*, v.31, p.65-71, 2015.
- 415 PICKERING, A. D., POTTINGER, T. G. Stress responses and disease resistance in
416 salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol Biochem*,
417 v.7, n.1-6, p.253-258, 1989.
- 418 POUGH, H; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. A vida dos vertebrados. 4a Edição. São Paulo:
419 Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2008, 684p.
- 420 SANDOVAL-GÍO, J. J., RODRÍGUEZ-CANUL, R. P., VIDAL-MARTÍNEZ, V. M., FÁJER-
421 ÁVILA, E. J., AMÉNDOLA-PIMENTA, M. Formalin toxicity to *Oreochromis niloticus*;
422 its effectiveness against *Cichlidogyrus* spp. and host stress response. *Lat. Am. J.*
423 *Aquat. Res.*, v.47, p.34-41, 2019.

- 424 SANTOS, H. B. D., SAMPAIO, E. V., ARANTES, F. P., SATO, Y. Induced spawning and
425 reproductive variables of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876
426 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). Neotrop. Ichthyol, v.11, p.607-614, 2012.
- 427 SATO, Y., SAMPAIO, E. V., SANTIAGO, K. B., DOS SANTOS, J.C.E. Pacamã
428 *Lophiosilurus alexandri*, peixe endêmico da bacia do rio São Francisco. Bios., v.14,
429 p.9-32, 2007.
- 430 SCHALCH, S. H. C., TAVARES-DIAS, M., ONAKA, E. M. Principais métodos
431 terapêuticos para peixes em cultivo. In: Tavares-Dias, M. (Ed.) Manejo e Sanidade
432 de Peixes em Cultivo. EMBRAPA. Amapá, Macapá, 2009, p.575-601.
- 433 SCHRECK, C. B., TORT, L. The concept of stress in fish. In Fish physiology. Academic
434 Press, v.35, p.1-34, 2016.
- 435 SHIOGIRI, N. S., PAULINO, M. G., CARRASCHI, S. P., BARALDI, F. G., DA CRUZ, C.,
436 FERNANDES, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the
437 gills and liver of the neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. Environ. Toxicol.
438 Pharmacol., v.34, n.2, p.388-396, 2012.
- 439 SOUSA, D. N., KATO, H. C. A. Novos produtos e cortes diferenciados: o potencial dos
440 peixes nativos nos mercados da gastronomia. Extensão Rural, v.24, p.86, 2017.
- 441 RANDALL, D. J., TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. Mar. Pollut. Bull, v.45, p.17-
442 23, 2002.
- 443 RODNICK, K. J., PLANAS, J. V. The stress and stress mitigation effects of exercise:
444 cardiovascular, metabolic, and skeletal muscle adjustments: Fish Physiology.
445 Academic Press, 2016. p.251-294.
- 446 ROWLAND, S. J., MIFSUD, C., NIXON, M., READ, P., LANDOS, M. Use of formalin
447 and copper to control ichthyophthiriasis in the Australian freshwater fish silver perch
448 (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). Aquac. Res., v.40, n.1, p.44-54, 2008.
- 449 ZHANG, X., ZHONG, Y., TIAN, H., WANG, W., RU, S. Impairment of the cortisol stress
450 response mediated by the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis in zebrafish
451 (*Danio rerio*) exposed to monocrotophos pesticide. Comp Biochem Physiol C
452 Toxicol Pharmacol, v.176, p.10-16, 2015.
- 453

454 **ARTIGO**

455

456 **Acute effect of formalin on hematology and biochemical parameters of tropical**
457 **fish *Lophiosilurus alexandri***

458

459

460 **Running head - Effect of formalin on “pacamã”**

461

462

463 João Paulo Silva Lorenzini¹, Luanna do Carmo Neves¹, Daniele Salgueiro de Melo¹,
464 Cristiano Campos Mattioli¹, Márcio José dos Santos-Silva¹, Cintia Labussièrre
465 Nakayama¹, Ronald Kennedy Luz¹, Kleber Campos Miranda-Filho¹

466

467 ¹ Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas
468 Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

469

470 *Corresponding author:

471 Kleber Campos Miranda-Filho, PhD

472 Research Fields: Aquaculture, Water quality, Toxicology and Pollution

473 Universidade Federal de Minas Gerais

474 Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia

475 Laboratório de Aquacultura - LAQUA

476 Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

477 Phone: + 55 31 3409-3311

478 E-mail: kmiranda2010@ufmg.br, kleber08@gmail.com

479 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3026-4491>

480

481 **Abstract**

482

483 This study evaluated the acute toxicity of formalin in juveniles of “pacamã”
484 *Lophiosilurus alexandri* and its recovery (environment without formalin) for 24 hours,
485 after acute exposure to formalin (24 h). Pacamã sub-adults (n = 100) with an average
486 weight of 126.2 ± 41.4 g were exposed to 108.0, 270.0, 680.0, 1,674.0 mg L⁻¹ formalin.
487 The test had 24 h of exposure and 24 h of recovery. The median lethal concentrations
488 of 2 h (LC_{50-2h}) were estimated at 988.82 mg L⁻¹ of formalin. Exposure to formalin
489 caused an increase in cortisol, glucose, lactate, aspartate aminotransferase (AST),
490 and alanine aminotransferase (ALT). After 24 h of recovery, cortisol did not reach the
491 levels of the control treatment. Gill histological changes in all treatments such as
492 hyperplasia, epithelial detachment, and aneurysm in all treatments, and the highest
493 rate of gill injury was observed in treatment T₁₆₇₄. The highest rate of liver injury was
494 observed in the T₂₇₀ treatment. In this treatment, nuclear and vascular lesions in the
495 liver predominated. After calculating the security level, we concluded that *L. alexandri*
496 can be safely exposed to 98.9 mg L⁻¹ of formalin for a maximum period of 2 h without
497 significant damage to the organism. Hematology and biochemical parameters added
498 to histopathology analysis are good tools to evaluate the body’s response to acute
499 formalin stress.

500

501 **Keywords:** hematology, siluriform, therapeutic baths, toxicity test.

502

503 1. Introduction

504 The pacamã *Lophiosilurus alexandri* is a fish native to the São Francisco River
505 basin (Brazil) and has highly prized meat with high commercial value. This siluriform
506 has been studied in several areas for the development of its productive chain in
507 captivity. (Figueiredo et al., 2014; dos Santos-Silva et al., 2017; Mello et al., 2017;
508 Favero et al., 2019).

509 In aquaculture activities, health problems are often responsible for economic
510 losses. In most cases, sanitary treatment involves the use of chemical products for
511 prophylaxis and treatment. Among the chemical compounds used in aquaculture,
512 formalin stands out for being used to treat parasitic infections (Rowland et al., 2009;
513 Pahor-Filho et al., 2012). According to Hung et al. (2019), four formalin-formulated
514 parasiticides (FORMALIN-F - Natchez Animal Supply, Natchez, MS, USA; PARACIDE-
515 F - Argent Chemical Laboratories, Redmond, WA, USA; and PARASITE-S - Western
516 Chemical Inc., WA, USA) are authorized for use by the FDA (Food and Drug
517 Administration).

518 For the control of ectoparasites in farmed fish, it is necessary to carry out
519 tolerance tests with the host species, before the animals are treated by employing
520 therapeutic baths with formalin. In addition to acute and chronic toxicity tests,
521 histopathology, hematological studies, and blood biochemistry are often used as stress
522 biomarkers (dos Santos-Silva et al., 2018). The information obtained through these
523 tools is essential to identifying the functioning of the physiological mechanisms and the
524 health status of the animals (Satheeshkumar et al., 2012).

525 It has already been demonstrated that exposure to formalin can cause changes
526 in blood hematological and biochemical parameters, both in the short-term (Andrade-
527 Porto et al., 2017) and in the long-term exposure (Omoregie et al., 1994).

528 Histopathological studies are important to help understand the effect that
529 substances cause in the fish organism, two organs receive greater attention in these
530 studies, the liver, and gill. These organs are constantly the target of these studies due
531 to their high metabolism, role in biotransformation, and excretion of toxic substances
532 (Wolf et al., 2015).

533 The present study aims to evaluate the tolerance of *L. alexandri* juveniles to
534 acute exposure to formalin and to observe the responses of these animals to stress,
535 as well as their recovery, in a formalin-free environment, after the exposure period.

536

537 **2. Material and methods**

538 The experiments were carried out at the Aquaculture Laboratory of
539 Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG and followed the ethics committee on
540 the use of animals, CEUA 49/2017.

541 *2.1 Biological material*

542 The exemplars de *L. alexandri* used in this experimental test were obtained from
543 captive breeding, carried out with our breeders, following the protocol described by
544 Costa et al. (2015). The larviculture process and the conditioning food process
545 occurred according to the one described by Cordeiro et al. (2016).

546 After the larviculture period, the animals were grown in a recirculation
547 aquaculture system (RAS), where fish were fed using a commercial diet extruded with
548 45% total protein (minimum), 4% fiber (maximum), 10% mineral matter (maximum),
549 7% lipids, 2% calcium and 1% phosphorus, until the beginning of the experimental
550 period.

551 *2.3 Acute toxicity tests with formalin*

552 The definitive test lasted 24 h and was carried out in duplicate, in a static system
 553 without a water change, and the fish were deprived of food, as determined by the
 554 American Society for Testing and Materials (ASTM) (Griffin et al., 2002). A preliminary
 555 test of acute toxicity was carried out to determine the range of concentrations to be
 556 used in the definitive tests.

557 The experimental design was randomized with five treatments in duplicate
 558 based on the preliminary tests. Four formalin concentrations 108.0 mg L⁻¹ (T₁₀₈), 270.0
 559 mg L⁻¹ (T₂₇₀), 680.0 mg L⁻¹ (T₆₈₀), 1,674.0 mg L⁻¹ (T₁₆₇₄) were adopted along with a
 560 control group without addition of formalin. All concentrations tested were obtained by
 561 diluting formalin to 37% Merck®.

562 In brief, 100 healthy “pacamãs” (126.2 ± 41.4 g; 20.7 ± 2.7 cm) were used, with
 563 20 animals per treatment. They were distributed in 10 polyethylene tanks with a volume
 564 of 250 L, maintaining a density of one fish per 25 L of medium. The tanks were provided
 565 with individual aeration and temperature control. At the beginning and end of the
 566 experiment, dissolved oxygen (6.55 ± 0.20 mg L⁻¹), temperature (26.7 ± 0.49°C), pH
 567 (8.12 ± 0.17), and total ammonia (0.15 ± 0.08 mg L⁻¹) were measured.

568 Table 1 - Water quality parameters during the acute and recovery test.

| | |
|------------------|--------------------------------|
| Dissolved oxygen | 6.55 ± 0.20 mg L ⁻¹ |
| Temperature | 26.7 ± 0.49°C |
| pH | 8.12 ± 0.17 |
| Total ammonia | 0.15 ± 0.08 mg L ⁻¹ |

569

570 To verify mortality, in the first four hours, observation of the experimental units
 571 was performed every five minutes. After this period, mortality was checked every hour.

572 At this time lethargic animals were removed and quantified for the estimation of LC₅₀
573 and taken as a blood samples. Lethargic fish were considered those with an evident
574 reduction in their respiration (opercular movements and ventilatory frequency), loss of
575 balance, and not responding to mechanical stimuli as described by dos Santos-Silva
576 et al. (2018).

577 After 24 h, at the end of the experiment, the survivals of each treatment were
578 divided equally into two groups, in the first group (n=10), a blood sample was collected,
579 and the second group was carried to a recovery test.

580 *2.4 Recovery test*

581 To assess the fish recovery after 24 hours of definitive tests, the surviving
582 animals (n=10) were transferred to other experimental units, with the same
583 characteristics as the definitive acute tests, but with formalin-free water. After the
584 transfer, mortality was observed for 24 h, the same period of exposure to formalin, at
585 the end, blood samples were collected again for hematological and biochemical
586 studies.

587 *2.5 Hematological and biochemistry studies*

588 Blood samples were analyzed in the Clinical Pathology Laboratory of the
589 Department of Veterinary Clinic and Surgery (DCCV) UFMG.

590 Blood collection was performed by caudal puncture, and an aliquot of at least
591 400 µL of blood was added to sodium heparin (10%/mL blood). Hematocrit was
592 determined using capillary tubes centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes (Microline-
593 Laborline®) (Goldenfarb et al., 1971). Hemoglobin concentration was obtained
594 according to the technique established by Tonks (1983) using a commercial Bioclin®

595 hemoglobin kit and reading in a Thermo Plate Analyzer Basic spectrophotometer (540
596 nm).

597 Biochemical analyses were performed after double centrifugation in Spinlab SL-
598 5AM centrifuge for one minute at 10,000 rpm followed by four minutes at 30,000 rpm
599 for plasma separation, as suggested by Mattioli et al. (2017). The obtained plasma was
600 used to determine the biochemical profile in automatic equipment (Cobas-Mira Plus).
601 The variables analyzed were albumin, total protein, glucose, lactate, cortisol, alanine
602 aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase
603 (ALP).

604 *2.6 Histopathology*

605 For histological analysis, samples of gills and liver were collected. The samples
606 were fixed in Bouin's solution for 12 hours, after which they were washed and stored
607 in 70% alcohol until histological processing (Wolf et al., 2015). For the preparation of
608 the histological slides, the samples went through the process of dehydration,
609 diaphanization, and embedding in paraffin. They were then submitted to microtomy,
610 resulting in 4 µm-thick histological sections, mounted on glass slides, and stained with
611 hematoxylin and eosin. The slides were analyzed using a Nikon Eclipse 50i optical
612 microscope. The images were captured using the Moticam 2300 camera and the Motic
613 Image Plus 3.0 software.

614 *2.6 Histopathological index*

615 The lesions observed in the gills and livers were classified following the
616 methodology proposed by Bernet et al. (1999). For classification, 3 factors were used
617 according to the histopathological importance of the lesion, (1) reversible damage at
618 the end of exposure; (2) damage that can be reversible after the end of exposure; and
619 (3) irreversible damage even with the end of exposure, cause partial or total loss of

620 organ and tissue function. In addition to the factor, the scale of lesions was evaluated,
621 ranging from 0 to 6, where (0) no changes; (2) mild occurrence; (4) moderate
622 occurrence; and (6) diffuse occurrence. Intermediate values were allowed.

623 With these data, the gill and liver injury indices were obtained, which were
624 calculated according to the following formula:

$$625 \quad I_{org} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a \times w)$$

626 Where rp = reaction pattern; alt = change; a = score; w = importance factor.

627 *2.7 Scanning electron microscopy (SEM)*

628 For *scanning electron microscopy* (SEM), the gill filaments were fixed in
629 Karnovsky's solution and preserved in 0.1 M phosphate buffer. Then they were refixed
630 in 1% reduced osmium tetroxide with distilled water for one hour and washed twice
631 with distilled water to remove the osmium tetroxide after being dehydrated in an
632 increasing series of alcohol, dried at a critical point of CO₂, and mounted in stubs, they
633 underwent the metallization process and then were observed in a Scanning Electron
634 Microscope (Zeiss, model DSM 950).

635 *2.8 Statistical analysis*

636 The LC₅₀ and the confidence intervals (95%) were obtained using the Trimmed
637 Spearman Karber method (Hamilton et al., 1977), and the safety level was estimated
638 as described by Sprague (1971).

639 All analyses were submitted for the evaluation of the normality and
640 homoscedasticity of the variances. Once the prerequisites were fulfilled, the data were
641 subjected to analysis of variance (ANOVA), and if a significant difference was detected,

642 the Tukey test (5% probability) was used. The analyses were performed using the
643 RStudio Version 1.2.5033 statistical program.

644

645 **3. Results**

646 *3.1 Median lethal concentration - LC₅₀*

647 The control and T₁₀₈ treatments were observed with 100% survival. In the other
648 treatments, 100% mortality was observed, after 24 h of exposure to formalin. The LC₅₀
649 for the periods of 2, 3, and 12 h, as well as the safety levels, are shown in table 1.

650

651 Table 2. Median lethal concentrations (LC₅₀) and safety levels for *Lophiosilurus*
652 *alexandri* sub-adults for 2, 3, and 12 hours of exposure to formalin.

| | Time (hours) | | |
|--|------------------|-----------------|-----------------|
| | 2 | 3 | 12 |
| LC ₅₀ (mg L ⁻¹) | 988.82 | 412.37 | 206.84 |
| Confidence interval | 892.10 - 1096.02 | 382.52 - 444.51 | 177.58 - 240.92 |
| Security level (mg L ⁻¹) | 98.9 | 41.2 | 20.7 |

653

654 *3.2 Hematological and biochemistry studies*

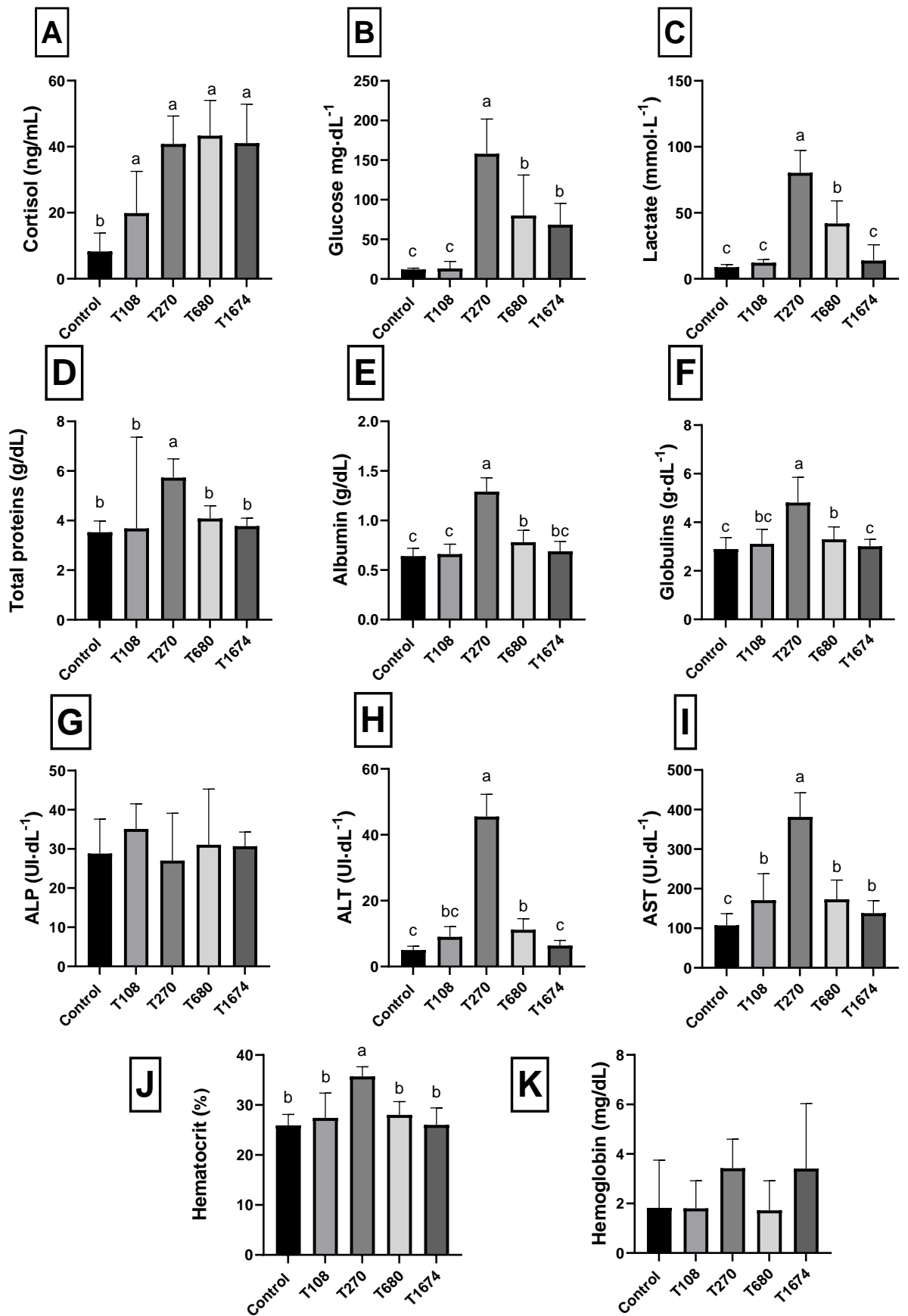
655 Results of cortisol, glucose, and lactate concentration are shown in figures 1A,
656 1B, and 1C, respectively. The highest values of plasmatic cortisol were observed on
657 treatments with formalin concentrations = T₂₇₀, T₆₈₀, and T₁₆₇₄. Only T₁₀₈ did not differ
658 in the plasmatic glucose and lactate levels from the control group. The highest
659 plasmatic concentrations of glucose and lactate were observed in treatment T₂₇₀.

660 Figures 1D, 1E, and 1F are shown the concentrations of total proteins, albumin,
661 and globulins, respectively. All these parameters were higher in treatment T₂₇₀, which
662 together with T₆₈₀ in albumin and globulin was the only treatment that differed from the
663 control group. The highest (T₁₆₇₄) and lowest concentration (T₁₀₈) did not differ from
664 the control group in any of these three parameters.

665 The hepatic enzymes ALP, ALT, and AST are shown in figures 1G, 1H, and 1I,
666 respectively. Among the three enzymes, only ALP was not affected by formalin
667 concentrations. The highest value of AST and ALT was observed in treatment T₂₇₀,
668 while all concentrations of formalin tested affect AST levels in blood plasma, only T₂₇₀
669 e T₆₈₀ affected plasmatic levels of ALT.

670 The only treatment that altered the levels of hematocrit (Fig. 1J) in the blood
671 was T₂₇₀, the other formalin concentrations did not differ from the control group. Any
672 concentrations used in this experiment had altered hemoglobin (Fig. 1K).

673



674

675 Figure 1 - Mean values (\pm standard deviation) of (A) cortisol, (B) glucose, (C) lactate, (D)
 676 total protein, (E) albumin, (F) globulin, (G) alkaline phosphatase - ALP, (H) alanine
 677 aminotransferase - ALT, (I) aspartate aminotransferase - AST, (J) hematocrit, and (K)
 678 hemoglobin of sub-adults of *Lophiosilurus alexandri* after acute exposure to different
 679 concentration of formalin (24h). Means followed by different letters in the same figure
 680 indicate significant differences ($p < 0.05$).

681

682 3.3 Recovery

683 Table 2 shows the hematological and biochemical data obtained after the
 684 recovery period. Hematocrit, total protein, ALP, AST, Alb e Hb showed no statistical
 685 difference. After 24 hours of recovery, lactate and glucose returned to normal levels
 686 compared to the control group, although the cortisol concentration showed a reduction
 687 after recovery, which was still higher than that of the control group.

688

689 Table 3. Mean values (\pm sd) of blood parameters of *Lophiosilurus alexandri* sub-
 690 adults after 24 h of detoxification against exposure to formalin.

691

| Parameter | Control (0 mg L ⁻¹) | T ₁₀₈ (108 mg L ⁻¹) |
|-------------------------------------|---------------------------------|--|
| Hematocrit (%) | 26.60 \pm 5.68 | 26.44 \pm 1.67 |
| Total Protein (g·dL ⁻¹) | 3.36 \pm 0.64 | 3.77 \pm 0.25 |
| Lactate (mmol·L ⁻¹) | 7.63 \pm 1.58 | 8.86 \pm 1.30 |
| ALP (UI·dL ⁻¹) | 32.00 \pm 7.50 | 32.54 \pm 2.47 |
| ALT (UI·dL ⁻¹) | 6.69 \pm 1.89 | 7.48 \pm 5.79 |
| AST (UI·dL ⁻¹) | 129.30 \pm 56.97 | 139.27 \pm 89.12 |
| Glu (mg·dL ⁻¹) | 10.09 \pm 4.35 | 7.49 \pm 2.1 |
| Alb (g·dL ⁻¹) | 0.57 \pm 0.08 | 0.63 \pm 0.07 |
| Hb (g·dL ⁻¹) | 2.93 \pm 3.11 | 1.88 \pm 1.83 |
| Cortisol (ng dL ⁻¹) | 5.59 \pm 2.20 ^b | 12.84 \pm 8.29 ^a |

692

693 Means followed by different letters on the horizontal line represent a significant
 694 difference ($p < 0.05$). Note: ALP = alkaline phosphatase; ALT = Alanine
 695 aminotransferase; AST = Aspartate aminotransferase; Glu = Glucose; Alb =
 696 Albumin; Hb = Hemoglobin.

697

698

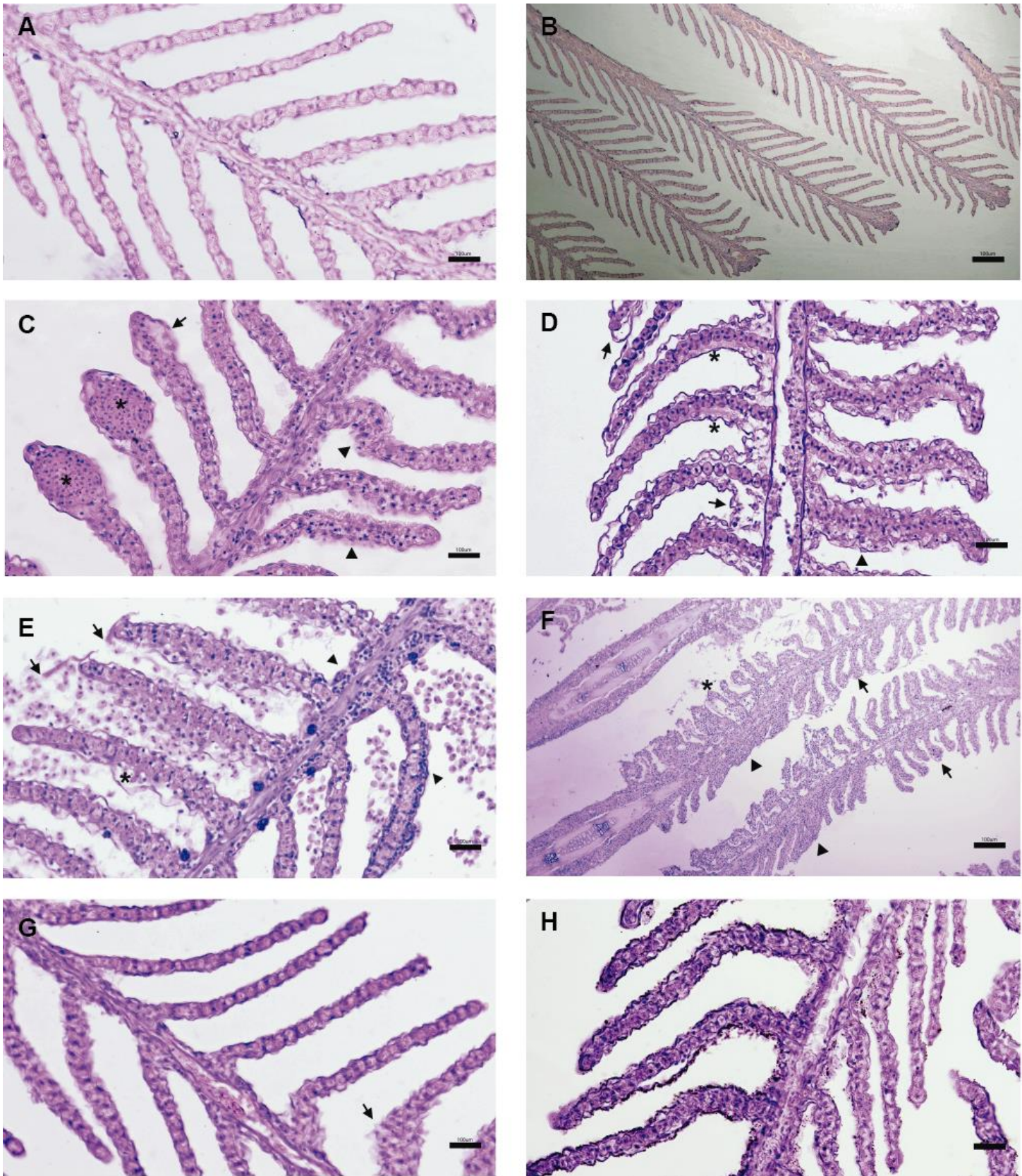
699 3.4 Histopathology

700 The main histopathological alterations found in the gills of *L. alexandri* exposed
701 to formalin are shown in figure 2. Except for the control group (Fig. 2A and 2B),
702 alterations were observed in all concentrations of formalin tested. In the formalin
703 treatment T₁₀₈ (Fig. 2C), telangiectasia was observed focally in the apical portion of the
704 secondary lamellae. At this concentration, moderate edema, in the secondary
705 lamellae, and moderate (but diffuse) hyperplasia were observed. The gills evaluated
706 at T₂₇₀ (Fig. 2D) showed severe hyperplasia, reducing the space between the
707 secondary lamellae. Edema and epithelial detachment were observed at the base and
708 apical region of the secondary lamellae.

709 The formalin concentration T₆₈₀ (Fig. 2E) showed hyperplasia and epithelial
710 detachment as well as lower concentrations but also showed disruption of the epithelial
711 tissue of the secondary lamellae that caused hemorrhages in this region. In the highest
712 concentration tested T₁₆₇₄ (Fig. 2F), fusions of secondary lamellae, telangiectasias,
713 and epithelial detachment were observed, and the distribution of the lesions was more
714 diffuse than in the other treatments.

715 After 24 hours of detoxification, the control group (Fig. 2G) presented moderate
716 and focal hyperplasia, the secondary lamellae of T₁₀₈ did not present more
717 telangiectasias, but hyperplasia and epithelial detachment were still observed (Fig.
718 2H).

719 Based on the histopathological changes observed and illustrated in figure 2,
720 the gill injury index was calculated (Table 3). All the concentrations of formalin tested
721 altered the gill injury index, and a tendency for the injury index to increase from the
722 lowest to the highest concentration was observed. After 24 h of detoxification, despite
723 a reduction in the gill index of T₁₀₈, it remained higher than the control (Table 3).



725

726 Figure 2. Photomicrograph (400x optical magnification) of gills of *Lophiosilurus alexandri*
 727 submitted to acute exposure (24 h) to formalin. (A) and (B) control group with intact gills without

728 histopathological alterations of importance for its functioning. (C) Concentration T₁₀₈ - gills
 729 showing telangiectasia (star), edema (arrow), and moderate hyperplasia (arrowhead) of the
 730 secondary lamellae. (D) Concentration T₂₇₀ - secondary lamellae showing edema (star),
 731 epithelial detachment (arrow), and severe hyperplasia (arrowhead). (E) Concentration T₆₈₀ -
 732 gills showing epithelial detachment (star), epithelial disruption (arrow) with hemorrhage
 733 between the secondary lamellae, and mucus cell hyperplasia (arrowhead). (F) Concentration
 734 T₁₆₇₄ - severely affected gills showing lamellar telangiectasia (arrow) fusion of secondary
 735 lamellae (arrowhead) and epithelial detachment (star). (G) Control group - gills after 24 h of
 736 detoxification, showing moderate secondary lamella hyperplasia. (H) Concentration T₁₀₈ - after
 737 24 h of detoxification, showing moderate hypertrophy (arrows) and epithelial detachment
 738 (arrowhead).

739

740 Figure 3 shows the electron micrographs of the gills of the control group (Fig. 3A
 741 to 3D) and the two highest concentrations, T₆₈₀ (Fig. 3E to 3H) and T₁₆₇₄ (Fig. 3I to 3L)
 742 Changes in the surface villi of the secondary lamellae were observed due to the action
 743 of formalin, the control group presented digitiform villi. In the concentration T₆₈₀, the
 744 microvilli were in transition from digitiform to punctiform, while in T₁₆₇₄ the microvilli
 745 observed were almost entirely punctiform.

746

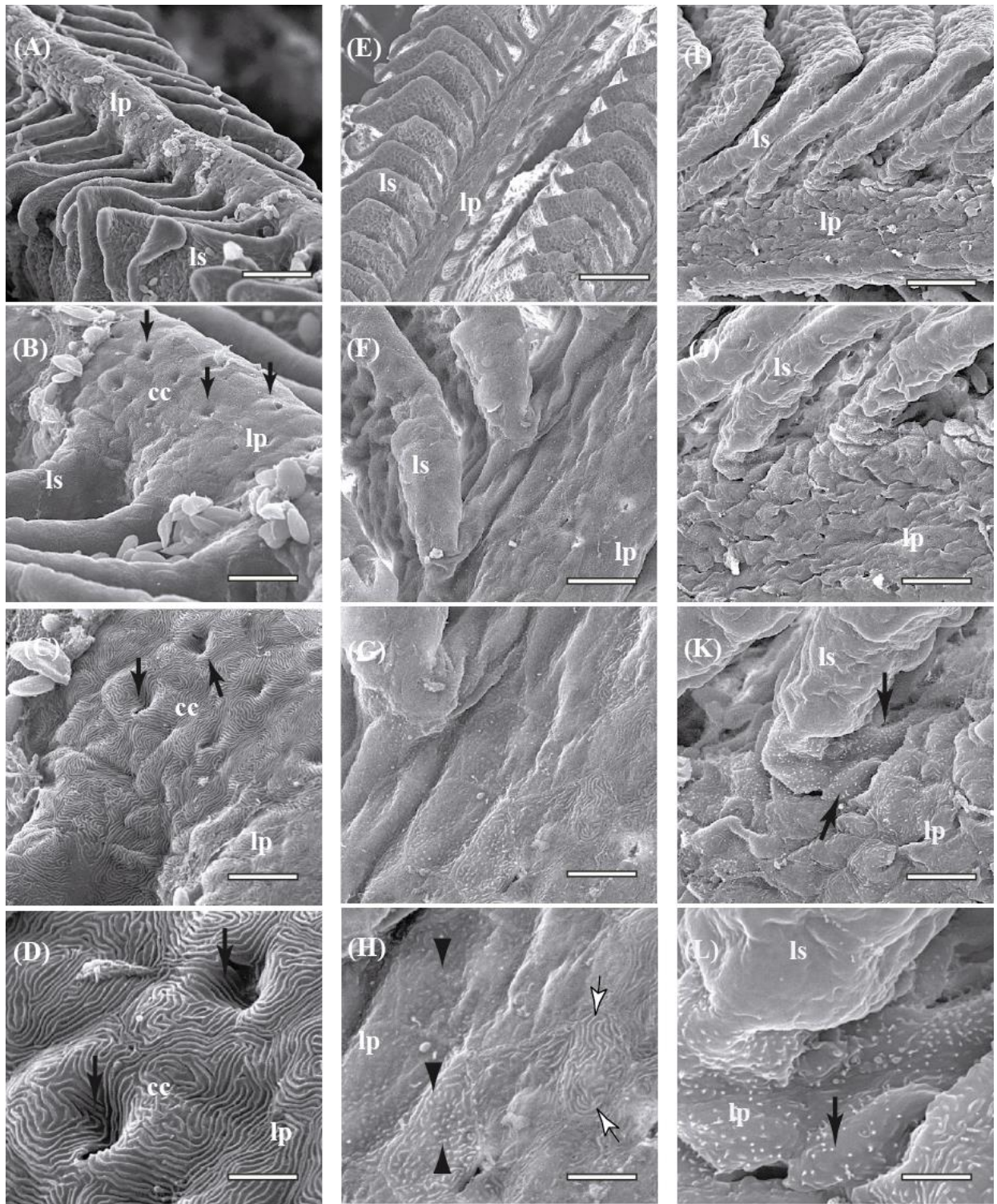
747 Table 4. Indices of lesions (IG) in *Lophiosilurus alexandri* sub-adults after acute
 748 exposure (24 h) to formalin and after the detoxification period (24 h).

749

| Treatment | Gill Index (I _G) | Liver Index (I _L) |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Control | 6.33 ± 4.23 ^c | 3.50 ± 1.97 ^c |
| T ₁₀₈ | 26.33 ± 5.54 ^b | 9.50 ± 4.59 ^c |
| T ₂₇₀ | 38.33 ± 14.39 ^{ba} | 36.50 ± 5.96 ^a |
| T ₆₈₀ | 43.00 ± 10.26 ^{ba} | 19.67 ± 1.97 ^b |
| T ₁₆₇₄ | 56.67 ± 17.42 ^a | 21.33 ± 2.07 ^b |
| Detoxification | | |
| | Gill Index (I _G) | Liver Index (I _L) |
| Control | 6.33 ± 2.07 ^a | 3.33 ± 1.29 ^a |

T₁₀₈18.67 ± 5.16^b7.25 ± 4.35^a

750



751

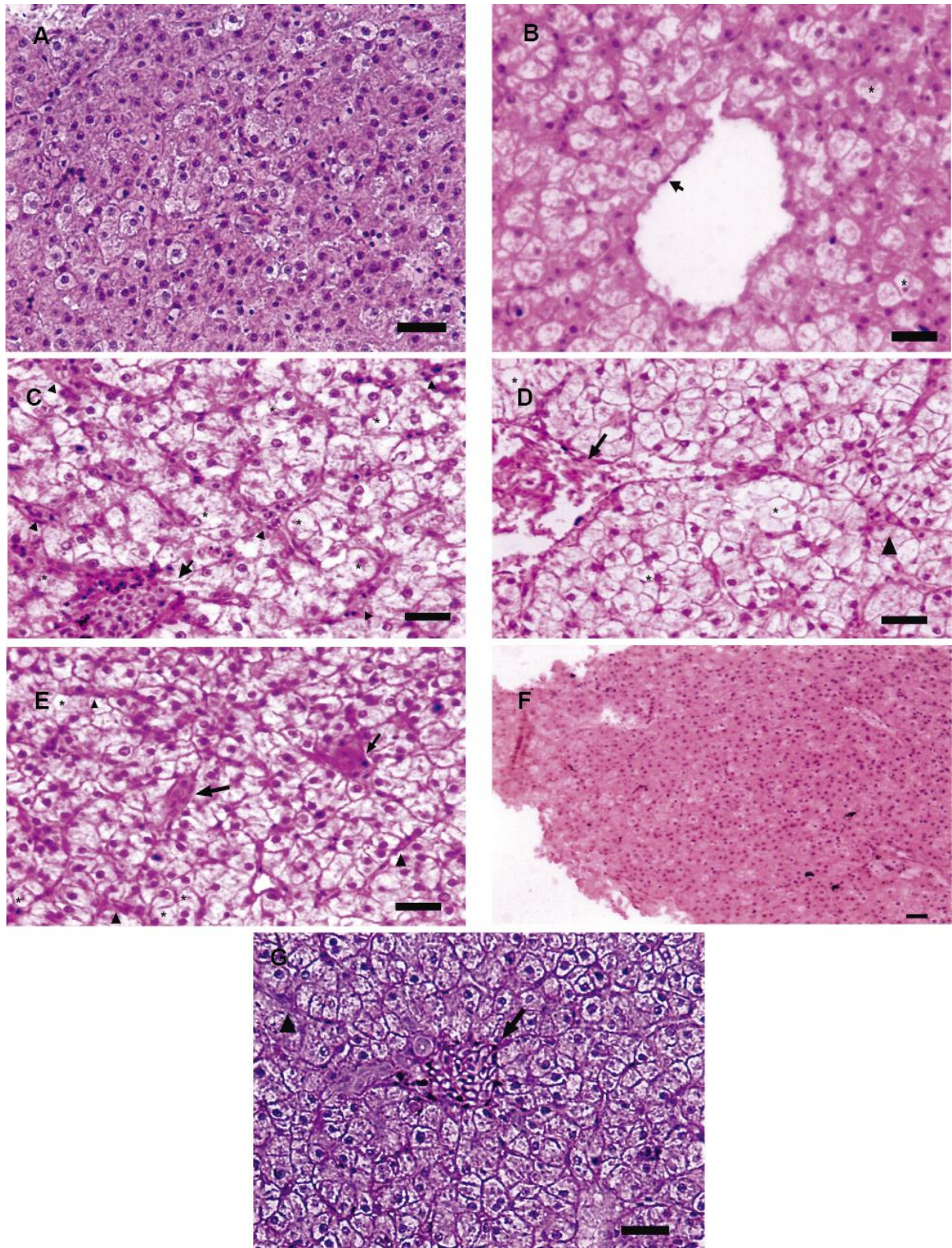
752 Figure 3. Scanning electron micrographs showing the structure of the gills of *Lophiosilurus*
 753 *alexandri* exposed to different concentrations of formalin. A-D: Control group: A: Gill filaments
 754 formed by the primary lamella (lp) and secondary lamellae (ls). 300X; Bar 60 µm. B: Details of
 755 the surface of the primary lamella (lp), showing hydrochloric cells (cc) (arrow). 1000X; Bar 18

756 μm . C: Close-up photo showing hydrochloric cells (cc) 2000X; Bar 9 μm . D: Close-up photo
757 showing hydrochloric cells (cc) and digitiform microvilli 5000X; Bar 3.6 μm . E-H: Treatment T_{680} :
758 E: Gill filaments formed by the primary lamella (lp) and secondary lamellae (ls). 200X; Bar 90
759 μm . F: Details of primary lamella (lp) and secondary lamellae (ls) 1000X; Bar 18 μm . G: Close-
760 up photo showing surface details of primary lamella (lp) and secondary lamellae (ls) 2000X; Bar
761 9 μm . H: Microvilli undergoing alterations, changing from digitiform (arrows) to punctate
762 (arrowhead). 3000X; Bar 6 μm . I-L: Treatment T_{1674} : I: Details of the primary (lp) and secondary
763 (ls) coverslips 500X; Bar 36 μm . J: Close-up photo showing surface details of primary lamella
764 (lp) and secondary lamella (ls) 1000X; Bar 18 μm . K: Apparent punctate microvilli (arrow).
765 2000X; Bar 9 μm . L: Punctate microvilli in detail. 5000X; Bar 3.6 μm .
766

767 The liver photomicrographs are shown in figure 4. The main histopathological
768 changes can be observed from the T_{270} treatment (Fig. 4C), where it is possible to
769 identify nuclear alterations, glycogenic vacuolization in addition to congestion in blood
770 vessels, and agglomeration in the sinusoids. The concentrations T_{680} (Fig. 4D) and
771 T_{1674} (Fig. 4E) presented the same lesions as T_{270} but with lower frequency and
772 intensity. The treatment T_{108} after 24 hours of recovery (Fig. 4G) showed congestion
773 of blood vessels and discrete agglomeration of sinusoids.

774 Table 3 shows the calculated values for the liver index (I_L). Only concentrations
775 greater than T_{270} differed from the control. Differently from what was observed in the
776 values calculated for the gill index, the highest values of I_L were observed in the
777 treatments T_{270} , T_{680} , and T_{1674} , and they were higher than the control not differing from
778 each other. After the detoxification period, T_{108} remained the same as the control
779 group.

780



781

782 Figure 4. Photomicrograph (400x optical magnification) of the liver of *Lophiosilurus alexandri*
 783 submitted to acute exposure (24 h) to formalin. (A) control group presenting hepatocytes with
 784 normal morphology, intact, and with the chordal distribution. (B) T₁₀₈ discrete proliferation of
 785 Kupffer cells (arrow), focal nuclear degeneration (star). (C) T₂₇₀ vessel congestion (arrow),
 786 diffuse agglomeration of sinusoids (arrowhead), diffuse nuclear degeneration (star), and

787 glycogenic vacuolization of hepatocytes. (D) T₆₈₀ liver with congested blood vessels, clustering
788 in sinusoids (arrow), nuclear degeneration (star). (E) T₁₆₇₄ with congested blood vessels
789 (arrow), clustering in sinusoids (arrowhead), nuclear degeneration (star). (F) control group after
790 24 hours of detoxification, hepatocytes without vacuolization, with the chordal distribution. (G)
791 T₁₀₈ after 24 hours of detoxification, showing congestion of blood vessels (arrow), and
792 moderate agglomeration in the sinusoids (arrowhead).

793

794 **4 Discussion**

795 Comparisons of the LC₅₀ obtained by different studies with those found in the
796 literature should be made with warnings. There are a variety of factors inherent to the
797 animal, such as species and stage of life, or related to water quality, such as alkalinity,
798 salinity, temperature, and pH, in addition to the exposure time, which influence the
799 tolerance to the toxic effects of formalin (Leal, 2018).

800 Francis-Floyd (1996) recommended concentrations between 150 and 250 mg
801 L⁻¹ of formalin in short baths (depending on temperature). These concentrations are
802 close to those recommended by the FDA (1998), between 170 and 250 mg L⁻¹. In our
803 study, the safety levels for two hours of exposure for “pacamãs” (126.2 ± 41.4 g) were
804 below these values, 98.9 mg L⁻¹. However, it is important to emphasize that in the first
805 hour of the definitive test, no mortality was observed in the concentration of 680.0 mg
806 L⁻¹

807 Blood tests are a valuable tool to identify the primary and secondary reactions
808 of fish to situations that involve stress (Fazio, 2019). In this study, several changes in
809 blood parameters were observed. The primary response to stress in fish consists of
810 the release of cortisol and catecholamines into the bloodstream, these compounds act
811 in the release of energy to the organism through hepatic gluconeogenesis, preparing
812 the organism to face the stressor (Wagner and Congleton, 2004; Schreck and Tort,

813 2016). All concentrations tested caused an increase in plasma cortisol levels, which is
814 the main indication of activation of the body's first physiological response mechanisms
815 to stress.

816 The available literature already demonstrates that formalin causes changes in
817 plasma cortisol levels in fish, this increase was also observed in juveniles of tilapia
818 *Oreochromis niloticus* (12 ± 2 g) subjected to a concentration of 1,620 mg L⁻¹ formalin
819 for 40 min (Sandoval-Gio, 2019). However, Andrade and Porto (2017) did not observe
820 changes in cortisol levels in “pirarucu”, and *Arapaima gigas*, with 38.9 ± 9.3 g exposed
821 to concentrations of up to 550 mg L⁻¹ for one hour. By the way, the primary response
822 to stress in “pacamãs” was described by Mattioli et al. (2018), they submitted the
823 animals to sodium chloride in an acute salinity test and observed elevation in plasma
824 cortisol concentrations.

825 The cortisol and catecholamines are also precursors of the secondary response
826 to stress situations, composed of several physiological mechanisms such as
827 hematological, respiratory, cellular, and immunological changes (Barton, 2002;
828 Schreck and Tort, 2016). Responses to stress situations are usually high energy
829 demanding, like a predator escape situation, which needs a natatory burst. Two factors
830 that are part of the secondary response and can be measured are glucose and lactate
831 both are directly involved in the release of energy to cells. So, monitoring their plasma
832 concentrations is widely used as an indirect indicator of stress in fish (Vijayan, 2003;
833 Wagner and Congleton, 2004).

834 In the present study, the elevation of plasma glucose levels of animals exposed
835 to formalin was observed in concentrations higher than 270 mg L⁻¹. However, the
836 highest concentrations of formalin tested did not show the highest plasma glucose
837 concentrations. All mortalities from these concentrations occurred before the 3 hours

838 of testing. This time may not have been sufficient for plasma glucose concentrations
839 to a peak. There are no data available that demonstrate the temporal pattern of glucose
840 elevation for *L. alexandri* submitted to stress situations. However, something similar
841 occurs has been demonstrated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) submitted to
842 stress reached plasma glucose peak only 3 hours after stress (Jentof et al., 2005).

843 When comparing the effects of formalin on glucose plasma concentration in *L.*
844 *alexandri* with other species, we observed that tilapia juveniles submitted to a short-
845 term formalin bath (40 min) had higher glucose levels than the control treatment
846 (Sandoval-Gio et al., 2019). In contrast, olive flounder *Paralichthys olivaceus* (390 –
847 480 g) exposure to 300 mg L⁻¹ for three hours caused no changes in levels of glucose
848 (Jung et al., 2003). The elevation of plasma glucose has already been observed in
849 juveniles of “pacamãs” of 33.87 ± 3.16 g submitted to acute toxicity tests with ammonia
850 and nitrite (dos Santos-Silva et al., 2018) and in juveniles of 28.6 ± 1.3 g in acute
851 salinity exposure with common salt (Mattioli et al., 2017).

852 In stressful situations, the energy demand can be so high that obtaining energy
853 through aerobics is not enough. In these cases, the organism uses the anaerobic route
854 to supply this demand, and the metabolite of this route is lactate (Brandão et al., 2006;
855 Barbosa et al., 2007). Lactate is produced and released in various tissues, in situations
856 of stress the need for a motor response is high, so muscle tissue is responsible for a
857 large part of the release of this metabolite into the bloodstream (Schreck et al., 2016).
858 In this study, the treatment that presented the highest glucose concentration also
859 showed the highest plasmatic concentration of lactate, demonstrating the increased
860 energy demand due to exposure to formalin.

861 Parallel to the increased energy demand, the need for oxygen also increases in
862 stressful situations. The secondary response can promote physiological changes to
863 increase the oxygen transport capacity of the body (Schreck and Tort, 2016). The
864 monitoring of hemoglobin and hematocrit levels can be used as indicators of the
865 oxygen transport capacity in the bloodstream. In this study, the T₂₇₀ treatment was the
866 only one that had a hematocrit higher than the control. The increase in hematocrit in
867 fish subjected to stress is related to the higher volume of circulating red blood cells,
868 caused by an imbalance in the blood pH or by the release of the same by the spleen
869 under the action of catecholamines (Vosyliene, 1999).

870 Total protein consists of the concentrations of albumin and globulins, both
871 compose the structures of most tissues, act in osmotic control are components of the
872 immune system. Stress is one of the factors that can alter plasma albumin
873 concentrations, being reported to cause hypoalbuminemia in *Labeo rohita* (Ciji et al.,
874 2015) and blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* (Zhang et al., 2015).
875 However, in this study, the concentrations of T₂₇₀ and T₆₈₀ caused an increase in
876 albumin concentrations, this hyperalbuminemia was also observed by dos Santos-
877 Silva et al. (2018) in “pacamãs” exposed to nitrite. These same authors attribute this
878 increase to changes in the immune system of animals subjected to stress.

879 Globulin concentrations are used as indicators of inflammatory processes and
880 demonstrate the state of adaptation of the organism to the stress situation. Adapted
881 organisms do not show changes in globulin concentrations, while organisms not
882 adapted to stress conditions have higher concentrations (Caipang et al., 2009). T₂₇₀
883 and T₆₈₀ showed higher concentrations of globulins in plasma, which indicates that
884 these animals were unable to adapt to the stress condition. Despite this, the highest
885 concentration of formalin tested (T₁₆₇₄) showed no change in globulin levels, and we

886 attribute this to the fact that mortality occurred in a short period, which was insufficient
887 to trigger the physiological process of adaptation to stress.

888 Intracellular enzymes, ALT and AST, are predominantly present in the liver but
889 are also found in lower concentrations in other organs, such as skeletal muscles,
890 kidneys, and spleen (Shahsavani et al., 2010). As they are intracellular, the increase
891 in the levels of these enzymes in the plasma indicates cellular and/or tissue damage,
892 being frequently used as markers of liver and muscle damage (Kori-Siakpere et al.,
893 2011). The histopathological studies of the liver confirmed this link, the treatment that
894 presented the highest plasma concentrations of ALT and AST was also the one that
895 showed the highest rate of liver injury. Among the lesions in T₂₇₀ livers, nuclear
896 degenerations of hepatocytes were observed, alterations considered to be preceptors
897 of the cellular apoptosis process, a process that may be responsible for the increase
898 in plasma levels of both AST and ALT. Although T₆₈₀ and T₁₆₇₄ also presented these
899 lesions, plasma concentrations of AST and ALT are not directly linked to the severity
900 of the liver lesions but rather to the spread of these lesions in the organ (Caipang et
901 al., 2009). This relationship between liver damage and the levels of ALT and AST has
902 already been described for “pacamãs” in stress conditions by dos Santos-Silva et al.
903 (2018). The increase in AST levels after exposure to formalin was also reported by
904 Jung et al. (2003). However, these same authors did not observe changes in ALT
905 levels.

906 Plasma concentrations of ALP are also used as an indicator of liver function,
907 although this is less efficient than AST and ALT because it has other production sites
908 besides the liver, such as in bone tissue. In the liver, its presence is predominant in the
909 tissues responsible for the production and drainage of bile fluid (Shahsavani et al.,
910 2010). In the present study, plasma ALP concentrations were not altered by formalin

911 concentrations. These results, analyzed together with the histopathological findings,
912 indicate that acute exposure to formalin did not cause damage to the bile tract tissues.

913 The gill tissue has direct contact with the aquatic environment, so it is vulnerable
914 to physical, chemical, and biological aggression. In addition, it is an organ that
915 participates in the excretion of toxic substances from the body (Wolf et al., 2015). For
916 these reasons, together with the liver, it is one of the main targets in histopathological
917 studies of toxicity in fish. The gill response to acute exposure to formalin has a limited
918 repertoire, with the most frequent alterations reported in the literature being
919 hyperplasia, epithelial displacements, telangiectasia, and lamellar fusions (Pahor-Filho
920 et al., 2015b; Andrade-Porto et al., 2018b; Neves et al., 2020). Except for lamellar
921 fusion, which was only present in T₁₆₇₄, all these other alterations were present at all
922 concentrations tested in this work. The increase in the concentration of formalin rises
923 the dispersion of these lesions by the gills, which causes an increase in the rate of
924 lesions. The highest rate of gill injuries was observed at the concentration T₁₆₇₄. Similar
925 behavior was corroborated by Neves et al. (2020), working with “pacamã” juveniles
926 (3.75 ± 0.81 g) but using another method to assess the damage, the degree of tissue
927 change (DTC) being the highest level observed at the concentration of 1,036.8 mg L⁻¹
928 of formalin.

929 Formalin proved to be quite aggressive with the gill tissue of “pacamã” juveniles
930 (13 g) subjected to different concentrations of ammonia and nitrite, and the highest gill
931 injury index obtained was 28 (dos Santos-Silva et al., 2018), while in the present study
932 it was 56.67.

933 Only the gill lesions identified in treatments T₆₈₀ and T₁₆₇₄ would be enough to
934 cause the mortalities observed in these treatments. Alterations such as hyperplasia of

935 secondary lamellae aim to prevent the entry of the toxic agent into the organism.
936 Hyperplasia alters the shape of the microvilli of the secondary lamellae as observed in
937 the electron micrographs of the gills of T₁₆₇₄ and reduces the available area between
938 the secondary lamellae reducing the capacity of gas exchange and osmoregulation
939 (Wolf et al., 2015), depending on the size of the involvement, the organ loses its
940 function, leading the animal to death. The lower liver damage index at T₆₈₀ and T₁₆₇₄
941 may be related to the fact that the gill lesions caused the animals to die before formalin
942 caused greater damage to the liver tissue. Corroborating this hypothesis, the
943 biochemical parameters indicate that there was not enough time for all the
944 mechanisms of the secondary response to stress to be triggered.

945 Stress recovery is dynamic, and some parameters, such as cortisol, can return
946 to pre-stress levels hours after removal of the stressor, while others, such as
947 immunological parameters, may take weeks to recover (Schreck and Tort, 2016).
948 After 24 h of the detoxification period, only cortisol differed from the control treatments.
949 The 24 h period was not enough to return to stress-free conditions. *Tilapia* juveniles
950 submitted to short-term formalin baths (40 minutes) had their cortisol and glucose
951 levels restored three days after treatment (Sandoval-Gio et al., 2019). “Pacamã”
952 juveniles exposed to sublethal concentrations of ammonia and nitrite still had organic
953 dysfunctions four days after the end of exposure to nitrogen toxicants (dos Santos-
954 Silva et al., 2018). The gill tissue is characterized by its high capacity for recovery after
955 the removal of the stressor (Wolf et al., 2015). In the present study, it was noticed that
956 after 24 hours of recovery, the value of the gill injury index regressed but it was still
957 higher than the control level.

958 **5. Conclusion**

959 *Lophiosilurus alexandri* can be safely exposed to formalin concentrations lower
960 than 98.9 mg L⁻¹ for a maximum time of 2 h without significant damage to the organism.
961 The concentrations tested showed the acute stress of exposure to formalin triggers
962 physiological changes typical of primary and secondary responses to stress.
963 Additionally, at concentrations higher than 1,674 mg L⁻¹ of formalin, the monitoring of
964 blood and plasma parameters is not efficient to explain mortalities, as they occur before
965 all these stress response mechanisms are triggered. The 24-hour period of
966 detoxification is not enough for the body to fully recover.

967 Studies about the interaction of formalin with the pacamã tegument should be
968 developed since this species does not have scale to protect the epithelial tissue.

969 Additional studies on the effectiveness of the established safe concentration of
970 formaldehyde against ectoparasites are recommended

971

972 **Acknowledgments**

973

974 The authors would like to thank CAPES for the scholarship to João Paulo Silva
975 Lorenzini. Kleber C. Miranda-Filho (No. 302286/2018-7) and Ronald K. Luz (No.
976 308547/2018-7) are research fellows of CNPq.

977

978 **References**

979

980 Andrade-Porto, S.M., Affonso, E.G., Kochhann, D., Malta, J.C.O., Roque, R., Ono, E.
981 A., Araújo C.S.O., Tavares-Dias, M., 2017. Antiparasitic efficacy and blood

- 982 effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). *Aquaculture*, 479,
983 38-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.009>.
- 984 Andrade-Porto, S.M., Ramos, C.A., Roque, R., Affonso, E.G., Barcellos, J.F.M.,
985 Queiroz, M.N., Araújo, C.S.O., Tavares-Dias, M., 2018. Histopathological
986 evaluation of formalin toxicity in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from
987 Amazon. *Pesq. Vet. Bras.*, 38(6), 1015-1025. [https://doi.org/10.1590/1678-5150-](https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5106)
988 PVB-5106.
- 989 APHA - American Public Health Association, 1991. Standard methods for examination
990 of water and wastewater. American Public Health Association, 17th ed. pp. 81-
991 143 Washington.
- 992 Barbosa, L.G., Moraes, G., Inoue, L.A.K.A., 2007. Metabolic responses of matrinxã
993 submitted to eugenol anesthetic baths. *Acta Sci. Biol. Sci.*, 29(3), 255-260.
994 <https://doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v29i3.474>. (In Portuguese).
- 995 Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference
996 to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.*, 42(3), 517-525.
- 997 Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for
998 a protocol to assess aquatic pollution. 25-34.
- 999 Brandão, F.R., Gomes, L.D.C., Chagas, E.C., 2006. Stress responses in pirarucu
1000 (*Arapaima gigas*) during routine fish farming practices. *Acta Amazon.*, 36(3), 349-
1001 356. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672006000300010>. (In portuguese).
- 1002 Caipang, C.M.A., Berg, I., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2009. Short-term crowding
1003 stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune
1004 response. *Aquaculture*, 295(1-2), 110-115.
1005 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.036>.

- 1006 Ciji, A., Sahu, N.P., Pal, A.K., Akhtar, M.S., 2015. Dietary L-tryptophan modulates
1007 growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite.
1008 Aquac. Res., 46, 2013-2024
- 1009 Cordeiro, N.I.S., Costa, D.C., Souza e Silva, W., Takata, R., Miranda-Filho, K.C., Luz,
1010 R.K., 2016. High stocking density during larviculture and effect of size and diet
1011 on production of juvenile *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876
1012 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). J. Appl. Ichthyol., 32(1), 61-66.
1013 <https://doi.org/10.1111/jai.12963>.
- 1014 Costa, D.C., Silva, W.S., Filho, R.M., Miranda-Filho, K.C., Santos, J.C.E., Luz, R.K.,
1015 2015. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus*
1016 *alexandri*: a carnivorous freshwater species. Anim. Reprod. Sci., 159, 148-154.
1017 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.009>.
- 1018 dos Santos-Silva, M.J., da Costa, F.F.B., Leme, F.P., Takata, R., Costa, D.C., Mattioli,
1019 C.C., Luz, R.K., Miranda-Filho, K.C., 2018. Biological responses of neotropical
1020 freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. Sci. Total
1021 Environ., 616-617, 1566-1575. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.157>.
- 1022 Favero, G.C., Boaventura, T.P., Ferreira, A.L., Silva, A.C., Porto, L.A., Luz, R.K., 2019.
1023 Fasting/re-feeding and water temperature promote the mobilization of body
1024 reserves in juvenile freshwater carnivorous catfish *Lophiosilurus alexandri*.
1025 Aquaculture, 511, 734223. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734223>.
- 1026 Fazio, F., 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review.
1027 Aquaculture, 500, 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>.
- 1028 FDA - Food and Drug Administration, 1998. Certain Other Dosage Form New Animal
1029 Drugs; Formalin Solution. *Code of Federal Regulations*, 21 CFR Part. 529.1030.

- 1030 Figueiredo, R.A.C.R., Souza, R.C., Bezerra, K.S., Campeche, D.F.B., Campos, R.
1031 M.L., Souza, A.M., Melo, J.F.B., 2014. Relação proteína: carboidrato no
1032 desempenho e metabolismo de juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).
1033 Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 66, 1567-1576. [http://dx.doi.org/10.1590/1678-](http://dx.doi.org/10.1590/1678-6454)
1034 6454.
- 1035 Francis-Floyd, R., 1996. Use of formalin to control fish parasites. University of Florida
1036 Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.
- 1037 Griffin, B.R., Davis, K.B., Darwish, A., Straus, D.L., 2002. Effect of exposure to
1038 potassium permanganate on stress indicators in channel catfish *Ictalurus*
1039 *punctatus*. J. World Aquac. Soc., 33, 1-9.
1040 <https://doi.org/10.1111/j.17497345.2002.tb00472.x>. 2002.
- 1041 Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber
1042 method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ.
1043 Sci. Technol., 11, 714-719.
- 1044 Hung, Y.W., Lin, Y.H., Huang H.Y., Wang, W.S., Chiu, C.F., Chiu, C.C., Chiu, H.W.,
1045 Tsai, W.H., Hung. S.W., 2019. Acute toxicity and drug residue analysis of formalin
1046 in two cold water fishes: cultured hybrid Bester sturgeon (*Huso huso* × *Acipenser*
1047 *ruthenus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ann. Biomed. Eng., 1, 1-10
1048 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>.
- 1049 Jentoft, S., Aastveit, A.H., Torjesen, P.A., Andersen, O., 2005. Effects of stress on
1050 growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca*
1051 *fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp.
1052 Biochem. Physiol., A Mol. Integr. Physiol., 141(3), 353-358.
- 1053 Jung, S.H., Sim, D.S., Park, M.S., Jo, Q., Kim, Y., 2003. Effects of formalin on
1054 haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

- 1055 (Temminck et Schlegel). *Aquac. Res.*, 34(14), 1269-1275.
1056 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00936.x>.
- 1057 Kori-Siakpere, O., Ikomi, R.B., Ogbe, M.G., 2011. Biochemical response of the African
1058 catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) to sublethal concentrations of
1059 potassium permanganate. *Ann. Biol. Res.*, 2(2), 1-10.
- 1060 Leal, J.F., Neves, M.G.P., Santos, E.B., Esteves, V.I., 2018. Use of formalin in
1061 intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water
1062 quality. *Vet. Aquacult.*, 10(2), 281-295. <https://doi.org/10.1111/raq.12160>.
- 1063 Mattioli, C.C., Takata, R., Leme, F.D.O.P., Costa, D.C., Melillo Filho, R., Silva, W. D.S.,
1064 Luz, R.K., 2017. The effects of acute and chronic exposure to water salinity on
1065 juveniles of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*.
1066 *Aquaculture*, 481, 255-266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.016>.
- 1067 Mello, G.C., Santos, M.L., Arantes, F.P., Pessali, T.C., Brito, M.F., Santos, J.E., 2019.
1068 Morphological characterization of the digestive tract of the catfish *Lophiosilurus*
1069 *alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes, Pseudopimelodidae). *Acta Zool.*
1070 100(1), 14-23. <https://doi.org/10.1111/azo.12224>.
- 1071 Neves, L.C., Miranda-Filho, K.C., Lorenzini, J.P.S., Nakayama, C.L., Luz, R.K., 2020.
1072 Effect of formalin in early stages of the freshwater neotropical catfish,
1073 *Lophiosilurus alexandri*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 73, 103277.
1074 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103277>.
- 1075 Omoregie, E., Eseyin, T., Ofojekwu, C., 1994. Chronic Effects of formalin on
1076 erythrocyte counts and plasma glucose of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.
1077 *Asian Fish. Sci.*, 7, 1-6.
- 1078 Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K. C., Klosterhoff, M., Romano, L. A., Pereira-Júnior,
1079 J., 2015. Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in

- 1080 juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes). *Aquac. Res.* 46(12), 3040-3045.
1081 <https://doi.org/10.1111/are.12462>.
- 1082 Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K.C., Pereira-Junior, J., 2012. Parasitology of juvenile
1083 mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host. *Aquaculture*,
1084 354, 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.032>.
- 1085 Rowland, S.J., Mifsud, C., Nixon, M., Read, P., Landos, M., 2009. Use of formalin and
1086 copper to control ichthyophthiriasis in the Australian freshwater fish silver perch
1087 (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). *Aquac. Res.*, 40, 44-54.
1088 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02061.x>.
- 1089 Sandoval-Gio, J.J., Rodríguez-Canul, R.P., Vidal-Martínez, V.M., Fájér-Ávila, E.J.,
1090 Améndola-Pimenta, M., 2019. Formalin toxicity to *Oreochromis niloticus*; its
1091 effectiveness against *Cichlidogyrus* spp. and host stress response. *Lat. Am. J.*
1092 *Aquat. Res.*, 47, 34-41. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue1-fulltext-5>.
- 1093 Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Kumar, D.S., Jagadeesan, L., 2012. Haematology
1094 and biochemical parameters of different feeding behaviour of teleost fishes from
1095 Vellar estuary, India. *Comp. Clin. Path.*, 21, 1187-1191.
1096 <https://doi.org/10.1007/s00580-011-1259-7>.
- 1097 Schreck, C.B., Tort, L., 2016. The concept of stress in fish. In *Fish physiology*. Vol. 35,
1098 pp. 1-34. Academic Press.
- 1099 Shabsavani D, Mohri M., Kanani H.G., 2010. Determination of normal values of some
1100 blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish Physiol. Biochem.*, 36,
1101 39-43. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9277-3>.
- 1102 Sprague, J.B., 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish - III Sublethal effects
1103 and safe concentrations. *Water Res.*, 5, 245-266.
- 1104 Tonks, D.B., 1983. Principles and technics. *Clin. Chem.*, 9, 217-223.

- 1105 Vijayan, M.M., Raptis, S., Sathiyaa, R., 2003. Cortisol treatment affects glucocorticoid
1106 receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. *Gen.*
1107 *Comp. Endocr.*, 132(2), 256-263. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00092-](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00092-3)
1108 3.
- 1109 Vosyliënė, M.Z., 1999. The effect of heavy metals on haematological indices of fish
1110 (survey). *Acta Zool. Litu.*, 9(2), 76-82.
1111 <http://dx.doi.org/10.1080/13921657.1999.10512290>.
- 1112 Wagner, T., Congleton, J.L., 2004. Blood chemistry correlates of nutritional condition,
1113 tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus*
1114 *tshawytscha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 61(7), 1066-1074.
1115 <https://doi.org/10.1139/F04-050>.
- 1116 Wolf, J.C., Baumgartner, W.A., Blazer, V.S., Camus, A.C., Engelhardt, J.A., Fournie,
1117 J.W., Frasca, S., Groman, D.B., Kent, M.L., Khoo, L.H., Law, J.M., Lombardini,
1118 E.D., Ruehl-Fehlert, C., Segner, H.E., Smith, S.A., Spitsbergen, J.M., Weber, K.,
1119 Wolfe, M.J., 2015. Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other
1120 interpretive challenges in fish histopathology studies: A guide for investigators,
1121 authors, reviewers, and readers. *Toxicol. Pathol.*, 43(3), 297-325.
1122 <https://doi.org/10.1177/0192623314540229>.