

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

MAYARA PEREIRA NEVES

BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS EM UM PEIXE LORICARIDEO (*Ancistrus mullerae*): RELAÇÃO ENTRE USO ANTRÓPICO DO SOLO NO ENTORNO DE RIACHOS NEOTROPICAIS E HISTOPATOLOGIAS MAIS SEVERAS.

CASCATEL-PR

Outubro/2016

MAYARA PEREIRA NEVES

Biomarcadores histológicos em um peixe loricarídeo (*Ancistrus mullerae*): relação entre uso antrópico do solo no entorno de riachos neotropicais e histopatologias mais severas.

Histological biomarkers in a loricariid fish (*Ancistrus mullerae*): relationship between anthropic land use in surrounding neotropical streams and histopathology more severe.

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientador: Dr^a Rosilene Luciana Delariva

CASCAVEL-PR

Outubro/2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

N425b
Neves, Mayara Pereira Biomarcadores histológicos em um peixe loricarideo (<i>Ancistrus mullerae</i>): relação entre uso antrópico do solo no entorno de riachos neotropicais e histopatologias mais severas. / Mayara Pereira Neves. Cascavel, 2016. 53 f.
Orientadora: Profª. Drª. Rosilene Luciana Delariva
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2016. Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais
1. Peixe. 2. Proteção ambiental. I. Delariva, Rosilene Luciana. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.
CDD 20.ed. 597 CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

Palavras-chaves: biomonitoramento, Loricariidae, alterações histopatológicas, influência agrícola, áreas de preservação.

Key-words: biomonitoring, Loricariidae, histopathological alterations, agricultural influence, preservation areas.

Resumo: Os ambientes aquáticos são ecossistemas dependentes dos vários usos e ocupação da bacia, sendo inclusive, sujeitos a contaminação por vários poluentes. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar biomarcadores histopatológicos de brânquias e fígado de um cascudo, *Ancistrus mullerae*, a fim de testar a hipótese de que em ambientes sob intensa utilização do entorno por atividades agrícolas, ocorram histopatologias mais severas. As amostragens foram realizadas por meio da técnica de pesca elétrica, em sete riachos, na bacia do baixo Iguaçu, em agosto/2015 e fevereiro/2016. Brânquias e fígados foram processados de acordo com a rotina histológica e analisados por meio de microscopia de luz. As alterações histopatológicas observadas nos peixes dos riachos com maior porcentagem de cobertura vegetal nativa foram consideradas moderadas e indicaram o funcionamento normal do órgão (edema, hiperplasia, infiltração leucocitária). Em riachos com maior influência agrícola, foram registrados danos moderados a graves (aneurisma, vacuolização e degeneração citoplasmática, núcleo picnótico). A abundância de células de cloreto aumentou significativamente nas brânquias de *A. mullerae* coletados em riachos rurais. Além disso, na maioria dos riachos, as células de muco foram mais abundantes no período chuvoso. Observaram-se diferenças significativas no índice histopatológico (IH) de brânquia e fígado, onde ocorreram alterações histopatológicas graves em peixes cujos riachos apresentaram maior influência agrícola. As alterações foram mais graves no fígado do que nas brânquias, fato relacionado com seu papel fundamental na desintoxicação dos xenobióticos. Concluímos que o maior uso e ocupação do solo por atividades agrícolas causam efeitos nocivos nos peixes. Assim, o nosso trabalho fornece importantes contribuições para a conservação e manejo dos recursos naturais, pois é pioneiro em demonstrar o efeito de gradientes de influência agrícola em condições de campo em biomarcadores de espécies endêmicas.

Abstract: Aquatic environments are much more dependent on their watersheds, especially for the allochthonous input of energy, as well as subject to contamination by various stressors. In this context, this study aimed to evaluate histopathological biomarkers of liver and gills of catfish endemic, in order to test the hypothesis that in environments under intense land use by agricultural activities occur histopathological alterations more severe. Samples were collected by electrofishing technique in seven streams in the Lower Iguaçu basin quarterly from August 2015 to February 2016. Gills and livers were processed according to routine histological and examined by light microscopy. The histopathological alterations observed in fish from the streams with higher percentage of natural vegetation cover were considered modest and indicated normal functioning of the organ (edema, hyperplasia, leukocyte infiltration). In streams with higher agricultural influence, were registered moderate damage to severe (aneurysm, vacuolization and cytoplasmic degeneration, pyknotic nucleus). The abundance of chloride cells was significantly increased in the gills of *A. mullerae* collected in rural streams. In addition, in most streams, mucous cells were more abundant in the rainy period. Significant differences were observed in histopathological index (HI) of gill and liver where severe histopathological alterations occurred in fish whose streams exhibit greater influence agricultural. Alterations were more severe in the liver than in gills, indeed related to its key role in detoxification of xenobiotics. We conclude that the increased agricultural use with reduction of riparian forest cause harmful effects in fish. Thus, our work provides important contributions to the conservation and management of natural resources, since it is a pioneer in demonstrating the effect of gradients of agricultural influence in field conditions on biomarkers of an endemic species.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAYARA PEREIRA NEVES

Biomarcadores histológicos em um peixe loricarideo (*Ancistrus mullerae*): relação entre uso antrópico do solo no entorno de riachos neotropicais e histopatologias mais severas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências ambientais, linha de pesquisa Biologia comparada e indicadores de qualidade no ambiente aquático, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Rosilene Luciana Delariva

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Elaine Antoniassi Luiz Kashiwaqui

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS)



Nédia de Castilhos Ghisi

UNIVERSIDADE FEDERAL TECNOLÓGICA DO PARANÁ (UFPR)



João Paulo de Arruda Amorim

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 3 de outubro de 2016

DEDICATÓRIA

A minha família, pelo apoio, especialmente meu esposo Fábio pelo amor e incentivo.

A família LIEB, que me acompanharam durante esses anos de crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela força concedida para enfrentar todos os obstáculos e desafios para a realização desse trabalho.

À Prof. Dr.^a Rosilene Luciana Delariva pela confiança, apoio e paciência que sempre me orientou em todos os aspectos e me auxiliou nas tomadas de decisões. Também, pelo conhecimento dividido e por grandes experiências profissionais, intelectuais e pessoais compartilhadas desde minha graduação. Especialmente, pelo exemplo de profissional que representa para mim.

À banca, Dr.^a Elaine e Dr.^a Nédia por contribuírem com o aprimoramento do trabalho.

Ao Prof. Dr. João Paulo Amorim pela parceria e, principalmente, pela grande contribuição e ensinamentos no Laboratório de Histologia.

Ao Prof. Dr. Luciano Lazzarini Wolff pela amizade e por sempre ser prestativo em ajudar com dúvidas e discussões.

Ao Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, coordenação e professores pelas fundamentais contribuições ao longo do curso e a secretária assistente Márcia, por sempre estar de prontidão para tirar dúvidas.

Aos amigos do Laboratório de Ictiologia, Ecologia e Biomonitoramento (LIEB) que sempre colaboraram nas coletas e em trabalhos de laboratório. Em especial, à Bruna e Mara que me acompanharam na maior parte desse período, e ao Douglas por contribuir com a evolução da minha resiliência.

À Natália e a técnica do laboratório de histologia Cris pela ajuda no processamento de materiais e confecções das lâminas histológicas.

A Jislaine, antes de tudo pela amizade e por sempre me auxiliar nas análises estatísticas. Além disso, por contribuir em grande parte com o conhecimento que adquiri desde a época em que ela era mestranda do nosso programa.

As novas amigas feitas, em especial a Karine pelo incentivo em tentar novas conquistas.

Aos meus pais por sempre me incentivarem na busca do conhecimento e pela boa educação que me fez tornar a pessoa que sou hoje.

Ao meu esposo Fábio, que nunca me deixou desistir dos meus sonhos, por sempre me apoiar nos momentos difíceis com muito amor e carinho. Essa conquista é nossa.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa pesquisa.

SUMÁRIO

ARTIGO:

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1. <i>Área de estudo</i>	18
2.2. <i>Área de estudo</i>	19
2.3. <i>Coleta de dados em campo</i>	20
2.3.1. <i>Caracterização física e química da água</i>	20
2.3.2. <i>Peixes</i>	20
2.4. <i>Análises histológicas</i>	21
2.5. <i>Análises dos dados</i>	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1. <i>Parâmetros físico-químicos da água</i>	24
3.2. <i>Alterações histopatológicas em brânquia e fígado</i>	27
4. DISCUSSÃO.....	38
5. CONCLUSÃO.....	44
AGRADECIMENTOS.....	44
REFERÊNCIAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área de estudo em destaque a partir do mapa hidrográfico do Estado do Paraná. Os pontos indicam os pontos de coleta: florestado: F1/F2; intermediário: I1/I2; rural: R1/R2/R3.....19

Figura 2 - Seções de tecido branquial de *A. mullerae* amostrado em riachos com diferentes usos do solo na bacia do Baixo Iguaçu. A- Lamelas normais em riacho florestado (F1). B- Edema (setas) em riacho rural (R1). C- Fusão parcial e total de lamelas (setas) em riacho rural (R2). D- Edema (flechas) e hiperplasia epitelial lamelar (*) em riacho intermediário (I1). E- Aneurisma lamelar (*) em riacho intermediário (I2). F- Células de muco: neutro (flechas) e ácido (seta) em riacho florestado (F2). G- Célula de cloreto normal (em riacho florestado) em riacho florestado (F1). H- Hiperplasia de células de cloreto (ponta de flecha) em riacho rural (R3). A-E: Hematoxilina e Eosina de Harris (HE); F: Azul de Alcian/Ácido Periódico de Schiff; G-H: azul de Toluidina.....28

Figura 3 - Comparação da média de células de cloreto e de muco por ILU nas brânquias de *Ancistrus mullerae* (média \pm DP) amostradas em riachos com diferentes porcentagens de uso do solo na bacia do Baixo Iguaçu, Brasil, durante o período seco e chuvoso/2015-2016. Pontos: florestados: F1/F2; Intermediário: I1/I2; Rural: R1/R2/R3.....30

Figura 4 - Seções de tecido hepático de *A. mullerae* amostradas em riachos com diferentes porcentagens de uso do solo na bacia do Baixo Iguaçu, Brasil, durante o período seco e chuvoso/2015-2016. A- Hepatócitos normais e vasos sanguíneos (BV) em riacho florestado (F1). B- Congestão vascular (*) e agregados de melano-macrófagos (seta) em riacho florestado (F2). C - Infiltração leucocitária (seta) em riacho florestado (F1). D- Hipertrofia nuclear em riacho rural (R1). E- Vacuolização citoplasmática com núcleo na posição lateral em riacho rural (R3). F- Núcleo picnótico (ponta de seta) em riacho rural (R2). Hematoxilina e Eosina de Harris (HE).....31

Figura 5 - Resultados obtidos da *two-way* ANOVA para: A) índice histopatológico (IH) de brânquias (A) e fígado (B) de *A. mullerae* amostrados em riachos com diferentes usos do solo na bacia do Baixo Iguaçu, Brasil, durante o período seco e período chuvoso/2015-2016. Pontos: Florestado: F1/F2; Intermediário: I1/I2; Rural: R1/R2/R3. Letras diferentes

(a, b, c, d) representam diferença significativa no teste Fisher LSD pós-hoc ($p < 0,05$). C.I. = Intervalo de confiança.....34

Figura 6 - Análise de Correspondência Canônica (CCA) aplicada em todos os locais sobre a frequência de alterações histopatológicas de variáveis branquiais/hepáticas e ambientais e cobertura vegetal. ● (círculo preenchido) = florestado, Δ (triângulo) = intermediário, ▲ (triângulo cheio) = rural. Variáveis ambientais: CO- Condutividade; TE- Temperatura; TS- Sólidos totais; VC- Cobertura vegetal. Alterações histopatológicas: ed - Edema; Lp - hiperplasia epitelial lamelar; Cc- células de cloreto; Pf - Fusão parcial de lamelas; Tf - Fusão total de lamelas; Na - aneurisma lamelar; Hp- hipertrofia nuclear; Va - Vacuolização citoplasmática; Ag- agregados de melano-macrófagos; Nl- Núcleo em posição lateral; De - degeneração citoplasmática; Il -Infiltração de leucócitos; Vc- congestão vascular; Pn- Núcleo picnótico.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos parâmetros abióticos da água e porcentagens de uso do solo em riachos da bacia do Baixo Iguaçu, durante o período seco e chuvoso/2015-2016. OD = oxigênio dissolvido; ST = sólidos totais. Pontos: florestados: F1/F2; Intermediário: I1/I2; Rural: R1/R2/R3.....26

Tabela 2: Frequência de alterações histopatológicas (média \pm DP) nas brânquias e fígado de *A. mullerae* amostrados em riachos com diferentes porcentagens de uso do solo na bacia do Baixo Iguaçu, Brasil, durante o período seco e chuvoso/2015-2016. Pontos: Florestado: F1/F2; Intermediário: I1/I2; Rural: R1/R2/R3.....32

Artigo elaborado e formatado conforme as normas de publicação científica *Environmental Research*.

Disponível em:

<https://www.journals.elsevier.com/environmental-research>.

Influência do uso do solo sobre a saúde de um peixe detritívoro e endêmico (*Ancistrus mullerae*) da ecorregião Iguazu: relação entre o uso do solo por atividades agrícolas e histopatologias mais severas

Influence of land use on the health of a detritivorous fish (*Ancistrus mullerae*) endemic to Iguassu ecoregion: relationship between land use agricultural and more severe histopathology

Mayara Pereira Neves^a, João Paulo de Arruda Amorim^b and Rosilene Luciana Delariva^c

^aPrograma de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Rua Universitária 2069, Caixa postal 711. CEP 85819-110. Cascavel, Paraná (PR), Brasil. Email: mayara-nevesbio@hotmail.com

^bDocente Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Rua Universitária 2069, Caixa postal 711. CEP 85819-110. Cascavel, Paraná (PR), Brasil. Email: amorimjpa@yahoo.com.br

^cDocente Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Rua Universitária 2069, Caixa postal 711. CEP 85819-110. Cascavel, Paraná (PR), Brasil. Email: rosilene.delariva@unioeste.br.

*Corresponding author

E-mail: mayara-nevesbio@hotmail.com

Highlights

- Efeitos da influência agrícola em biomarcadores de um cascudo endêmico.
- Histopatologias mais severas em peixes de riachos com maior influência agrícola.
- Riachos florestados apresentaram maior qualidade ambiental.
- Sazonalidade climática foi importante apenas para frequências de patologias em brânquias.
- Índice histopatológico em fígado maior do que em brânquias.

1. Introdução

O crescimento populacional e a conseqüente demanda por recursos naturais, especialmente por produção agrícola em grande escala, levaram a drásticas mudanças no uso da terra em todo o mundo (Cogo et al., 2009; Santos et al., 2013; Constantini et al., 2015), sendo que o Brasil figura entre os principais países produtores mundial. Nesse cenário, um dos maiores impactos refere-se à utilização desenfreada de pesticidas para o controle de pragas em monoculturas. Assim, o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos e o Estado do Paraná é terceiro no ranking nacional (SESA, 2013). Dessa maneira, a expansão agrícola acoplada ao uso excessivo de agrotóxicos e a diminuição da cobertura vegetal tornaram-se práticas comuns e amplamente disseminadas (Zia et al., 2013; Carrasco et al., 2014; Rebelo e Caldas, 2014; Aazami et al., 2015; Fonseca et al., 2016).

A vegetação ciliar desempenha um importante papel mitigador, especialmente por interceptar sedimentos, fertilizantes e pesticidas que são drenados para os corpos hídricos por meio do escoamento superficial ou subterrâneo e lixiviação (Casatti, 2010; Teresa et al., 2015). Entretanto, pouca atenção ainda é direcionada em avaliações dos

potenciais efeitos do uso do solo e gradientes de vegetação marginal, sobre as comunidades aquáticas, como por exemplo, efeitos fisiológicos, alterações no crescimento e desenvolvimento, diminuição da sobrevivência, bem como extinção de espécies locais e diversidade funcional (Relyea, 2005; Lanctôt et al., 2014).

Nesse contexto, avaliar ambientes perturbados por atividades agrícolas, por meio do biomonitoramento, nos permite analisar de maneira preditiva, os efeitos biológicos devido à exposição e interações de vários estressores ambientais (Flores-Lopes and Thomaz, 2011; Hermoso and Clavero, 2013; Freire et al., 2015). Nesse tipo de avaliação, a utilização de espécies bioindicadoras, retrata com veracidade a realidade de um ambiente (Aazami et al., 2015), sendo os peixes, excelentes bioindicadores (Viarengo et al., 2007; Jesus and Carvalho, 2008; Lins et al., 2010; Freire et al., 2015; Yancheva et al., 2016). Vários órgãos, tecidos e processos bioquímicos de peixes têm sido consolidados na literatura como biomarcadores (Bernet et al., 1999; Ramade, 1998; Freire et al., 2015; Colin et al., 2016), para avaliação de impactos ambientais.

A exposição e contato direto dos peixes com substâncias tóxicas presentes na água promovem alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos do organismo (Van der Oost et al., 2003). Nesse sentido, a histopatologia é uma ferramenta corriqueira utilizada para avaliar efeitos de contaminantes específicos em condições laboratoriais (Santos and Martinez, 2014; Yancheva et al., 2016). Por outro lado, em condições naturais, onde ocorrem a interação de diversos xenobióticos, estudos que investiguem os efeitos negativos dessa exposição dos peixes têm sido mais explorados recentemente (Liebel et al., 2013; Paulino et al., 2014a; Freire et al., 2015; Fonseca et al., 2016; Ghisi et al., 2016; Dang et al. 2017). Deste modo, considera-se de elevada relevância o estudo

das características morfohistológicas de peixes submetidos à diferentes estressores decorrentes do uso do entorno dos corpos hídricos e suas áreas de proteção.

Os riachos de cabeceira são ambientes que estão mais propensos aos efeitos diretos do uso de contaminantes nas áreas adjacentes. Nesse aspecto, a região centro-oeste do Paraná segue a tendência brasileira de ser grande polo agroindustrial e se destaca pelo elevado consumo de agrotóxicos (15 a 23 Kg/ha/ano), principalmente de herbicidas de alta periculosidade (SEAB, 2008). Essa região é drenada pela bacia do baixo rio Iguaçu, um importante corpo hídrico do Estado e também considerado o segundo rio mais poluído do Brasil (CIESP, 2013). Estudo recente realizado por Freire et al. (2015), constatou danos severos a saúde de peixes em trechos da calha principal do rio Iguaçu, provenientes de fontes difusas de contaminantes. Entretanto, para ambientes de riachos, estudos com esta abordagem ainda são incipientes (Nimet et al., in press). Assim, devido a relevância para o abastecimento público, crescente antropização e a presença de uma fauna endêmica, estudos nesses ambientes, são de extrema importância em abordagens de biomonitoramento (Baumgartner et al., 2012; Bueno-Krawczyk et al., 2015).

Nesse cenário, esse trabalho utilizou como bioindicador, uma espécie conhecida popularmente como cascudo, *Ancistrus mullerae* Bifi, Pavanelli & Zawadzki, 2009, para avaliar biomarcadores histológicos em brânquia e fígado. O cascudinho é um peixe bentônico, detritívoro (Neves et al., 2015), abundante e endêmico da bacia do baixo rio Iguaçu (Baumgartner et al., 2012). Espécies bentônicas e especialmente de loricarídeos têm sido utilizadas em redes de biomonitoramento em vários países, devido ao fato de exibirem vários graus de tolerância em relação aos diversos tipos de impacto, além de possuírem baixa mobilidade (Arauco et al., 2005; Ghisi et al., 2016). Além disso, os contaminantes podem permanecer associados à matéria orgânica particulada e ao

sedimento (Trevisan et al., 2014), sendo, portanto, seus efeitos mais severos sobre espécies que ocupam esse tipo de habitat e consomem preferencialmente detrito, como é o caso da espécie utilizada nesse estudo.

Diante do exposto, nós testamos a hipótese de que, em ambientes sob o uso intenso de terras pelas atividades agrícolas, *A. mullerae* apresente alterações histopatológicas mais severas do que nos riachos florestados. Assim, os objetivos deste estudo foram: (i) verificar diferenças entre as variáveis ambientais nos diferentes riachos, (ii) verificar a influência da sazonalidade climática na ocorrência de alterações histopatológicas e (iii) avaliar se existem correlações entre as variáveis ambientais, frequência e grau de alterações histopatológicas em brânquias e fígado de *A. mullerae*, nos diferentes riachos. Nós esperamos encontrar histopatologias mais severas em riachos que apresentem maior utilização do entorno por atividades agrícolas, baseada na premissa de que ocorre maior entrada de poluentes nesses riachos devido à redução/ausência de floresta ripária.

2. Materiais e Métodos

2.1. Declaração de ética

Os peixes foram coletados com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - (ICMBio) (número de licença 30182, 25039-1) e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA) de acordo com protocolos em seus aspectos éticos e metodológicos, para o uso de peixes.

2.2 Área de estudo

A bacia do rio Iguaçu possui uma área de aproximadamente 55. 110 Km² e compreende 116 municípios (Parolin et al., 2010). Apresenta clima subtropical úmido, temperaturas quentes no verão e sem estação seca no inverno.

Foram selecionados oito riachos inseridos em bacias com diferentes usos e ocupação do solo, pertencentes à região do baixo rio Iguaçu, distribuídos nos municípios de Cascavel, Catanduvás, Santa Tereza do Oeste e Céu Azul (Tabela 1). A escolha e distribuição dos riachos seguiram o critério de que não apresentam ligação entre afluentes, sendo, portanto, considerados como réplicas de amostragem (Gotelli e Ellison, 2011). Além disso, foram delimitados trechos com diferentes usos do solo no entorno.

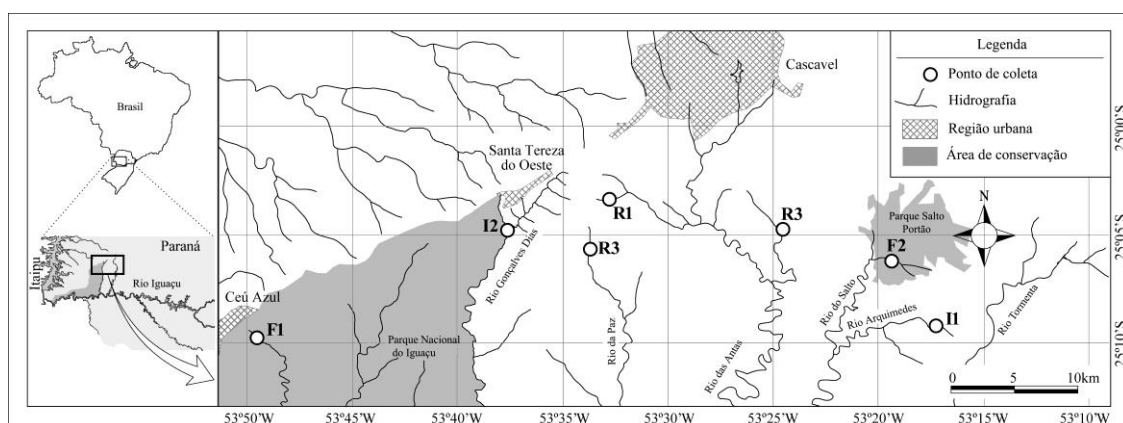


Fig. 1. Área de estudo em destaque a partir do mapa hidrográfico do Estado do Paraná. Os pontos indicam os pontos de coleta: florestado: F1/F2; intermediário: I1/I2; rural: R1/R2/R3.

O cálculo da porcentagem de cobertura vegetal, bem como, áreas agrícolas e urbanas foi obtido por meio do programa Google Earth Pro para delimitação da área da microbacia (km²). Por meio da constatação do ponto em que a elevação do terreno passa a decair, foram marcados vários pontos para a definição de um polígono da área da microbacia, e realizada categorizações de acordo com os seguintes critérios:

- Área com vegetação: remanescentes de floresta e presença de mata ciliar dentro da área da microbacia;
- Área rural: definida pela presença de áreas de pastagens, plantios e construções de propriedades;
- Área urbanizada: locais de impermeabilização do solo com construções e atividades industriais.

Por meio dessa caracterização, os riachos foram classificados em: minimamente impactado, quando estavam inseridos em áreas de preservação; intermediários, quando possuíam mais de 50% de cobertura vegetal, mas não estavam inseridos em áreas de preservação, e rurais, quando apresentavam mais de 50% do uso e ocupação da microbacia composta por atividades agrícolas.

2.3 Coleta de dados em campo

2.3.1 Caracterização física e química da água

As coletas foram realizadas trimestralmente entre agosto de 2015 e fevereiro de 2016, em sete riachos. As variáveis abióticas avaliadas foram a temperatura, pH, oxigênio dissolvido, condutividade e sólidos totais, medidos usando a sonda de qualidade de água com parâmetros múltiplos Horiba U-50. As medidas foram feitas com três repetições ao longo dos locais de amostragem em todos os fluxos.

2.3.2 Peixes

As amostragens foram realizadas em agosto/2015 e fevereiro/ 2016, em oito riachos, por meio da técnica de pesca elétrica. Neste procedimento foi utilizado um equipamento constituído de um gerador portátil de corrente elétrica alternada (220V, 50-60Hz, 3,4-4,1 A, 100W), ligado a dois eletrodos por um cabo multifilamento e

realizadas três capturas sucessivas de aproximadamente 40 min cada no sentido jusante-montante. Os peixes foram coletados sob a licença do *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* – (ICMBio) (Números 30182, 25039-1).

Após as capturas, foram selecionados 10 espécimes de *A. mullerae*, para cada local amostrado (exceto quando esse número não foi obtido em todas as pescas), anestesiados (de acordo com os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná). Os arcos branquiais e fígado foram retirados e acondicionados em AIFAc (85 mL de álcool 95%, 10 mL formol PA e 5 mL de ácido acético PA) por 24 horas e transferidos para álcool 70% para a realização de análises histológicas. O restante dos indivíduos amostrados foi fixado em formol 4%. Exemplares testemunhos foram depositados na coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUP 19022, 19023), Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil.

2.4 Análises histológicas

Para as análises histopatológicas, o segundo arco branquial e fígado (5 cortes/amostra, 1 amostra/ peixe), dos indivíduos coletados foram desidratados em série crescente de etanol, clareado em xilol e incluído em Paraplast[®]. Foram feitos cortes transversais, longitudinais e semi-seriados com 5µm de espessura para brânquia e 4µm para fígado. Os cortes obtidos foram submetidos à técnica de coloração Hematoxilina Harris e Eosina (HE), para padrão histológico, Azul de Alcian (AB)/Ácido Periódico de Schiff (PAS) com pH 2.5 para distinguir diferentes tipos de mucina nas células de muco (mucinas sulfatadas/carboxiladas e neutras) (Sabóia-Moraes et al., 1996) e Azul de Toluidina para identificar células de cloreto (CCs) (Evans et al., 2005).

A seleção das áreas branquiais para a quantificação das células de muco e cloreto foi realizada utilizando o método adaptado de Roberts e Powell (2003), onde foram selecionados cinco filamentos bem orientados (que apresentaram comprimentos relativamente semelhantes de lamelas secundárias em ambos os lados do filamento), ou seja, que representavam uma distribuição regular através do arco branquial. A quantificação de células de muco e cloreto baseou-se no número dessas células por unidade interlamelar (ILU) definida como uma camada epitelial que se estende do ponto médio de uma lamela ao ponto médio da lamela adjacente (Powell et al., 1995). Um total de 10 ILU (5 em cada lado do filamento) foram contados e o número de células de muco e cloreto em cada ILU foi registrado. Os números de células de muco neutras e ácidas (mucinas sulfatadas/carboxiladas) foram contados separadamente em secções coradas com AB / PAS (pH 2,5) (Jones e Reid, 1978).

Todos os cortes foram observados por meio de microscópio BX61 e as imagens foram registradas usando câmera digital Olympus DP71 com o software DP Controller 3.2.1.276. As alterações histopatológicas foram quantificadas em brânquias e em fígados (cinco campos microscópicos aleatórios/seção, cinco seções/amostra). A incidência e distribuição das lesões foram avaliadas com base nos seguintes critérios: ausência de lesões (ausência ou lesões até 10% do tecido analisado); raramente presente (ocorrência de lesões em 11% a 25% do tecido analisado); presente (ocorrência de lesões em 26% a 50% do tecido analisado); comum (ocorrência de lesões em 51% a 75% do tecido analisado) e lesões muito frequentes (ocorrência de lesões em 76% a 100% do tecido analisado) (Paulino et al., 2014).

A presença de alterações histopatológicas para cada componente foi avaliada semi-quantitativamente pelo índice histopatológico (IH), com base no tipo, localização e gravidade das lesões. O IH de brânquias (IH_B) e o fígado (IH_F) foram calculados de

acordo com Cerqueira e Fernandes (2002) e Camargo e Martinez (2007), modificados de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

As alterações histopatológicas em cada órgão foram classificadas em estádios progressivos (S) nos tecidos: SI, alterações histopatológicas que não alteram o funcionamento normal do tecido; SII, alterações que são mais graves e interferem no funcionamento do tecido; E estágio SIII, dano muito grave e irreparável. O IH foi calculado a partir dos tipos de lesão para cada um dos três estágios e multiplicado pelo índice do estágio, utilizando a seguinte equação proposta por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994):

$$IH = 10^0 \sum_{i=1}^a ai + 10^1 \sum_{i=1}^b bi + 10^2 \sum_{i=1}^c ci$$

Onde a = alteração histopatológica do primeiro estágio (SI), b = alterações histopatológicas do segundo estágio (SII) e c = alterações histopatológicas do estágio três (SIII). Um índice médio de peixes amostrados em cada riacho foi calculado a partir do índice obtido de cada indivíduo. Os valores de IH entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do órgão, valores entre 11 e 20 indicam danos leves ou moderados ao órgão, valores entre 21 e 50 indicam danos moderados a graves, valores entre 51 e 100 indicam lesões graves e valores e acima de 100 indicam danos irreversíveis ao órgão (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994).

2.5 Análises dos dados

A fim de verificar diferenças significativas nas variáveis abióticas entre os locais e o período (Seco = outono/inverno, chuvoso = primavera/verão) utilizou-se a *two-way* Análise de Variância com atendimento aos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene's teste).

O índice histopatológico (IH) de brânquia e fígado de *A. mullerae* em locais e períodos amostrados foi comparado por meio da *two-way* ANOVA, seguido pelo teste pós-hoc Fisher LSD.

Com base nos dados das variáveis abióticas e bióticas (frequência de alterações histopatológicas branquiais e hepáticas), foi realizada uma Análise de Correlação Canônica (Legendre e Legendre, 1998), a fim de resumir os dados e avaliar se os riachos submetidos ao uso intensivo da terra por atividades agrícolas apresentam respostas dos biomarcadores histopatológicos de *A. mullerae* que indicam distúrbios. A multicolinearidade das variáveis foi diagnosticada para selecionar variáveis redundantes e para obter o modelo mais apropriado. Os eixos 1 e 2 também foram submetidos ao teste de permutação (Permutest, 1000 permutações) para verificar sua significância.

A CCA foi realizada no programa PAST (Paleontological Statistics Software) versão 2.08 (Hammer et al., 2001). As outras análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., 2005) e o valor de $p < 0,05$ foi adotado como o limite de significância.

3. Resultados

3.1 Parâmetros físico-químicos da água

As variáveis ambientais físicas e químicas da água apresentaram diferenças significativas entre os pontos de amostragem ($F=11.82$; $p=0.00$). Maiores valores de condutividade elétrica e sólidos totais foram observados nos riachos rurais (R3). As variáveis também diferiram entre os períodos de amostragem ($F=72.26$; $p=0.00$), principalmente pelos maiores valores de temperatura em pontos rurais (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos parâmetros abióticos da água e porcentagens de uso do solo em riachos da bacia do Baixo Iguaçu, durante o período seco e chuvoso/2015-2016. OD = oxigênio dissolvido; ST = sólidos totais. Pontos: florestados: F1/F2; Intermediário: I1/I2; Rural: R1/R2/R3.

Pontos	F1		F2		I1		I2		R1		R2		R3	
	Manoel Gomes		Pedregulho		Arquimedes		Jumelo		Nene		Rio da Paz		Bom Retiro	
Descrição	Inserido no Parque Nacional do Iguaçu (PNI), floresta nativa, leito do rio com diversidade de substratos		Inserido em Reserva Natural Privada (RPPN), área com floresta nativa e criação de animais, leito do rio com diversidade de substratos		Cobertura vegetal, casas e criação de animais, floresta ripária nativa e grama, leito do rio com diversidade de substratos e alguns trechos de sedimentação		Margem direita com PNI, floresta ripária nativa, casas e criação de suínos, leito do rio com diversidade de substratos		Monocultura, floresta ripária constituída de floresta nativa, leito do rio com diversidade de substratos		Área circundante com monocultura (soja e milho), pequena floresta ciliar, assoreamento e pneus no leito do rio		Área de cultivo, casas e avicultura a montante, sedimentação, plástico e carcaças de animais no leito do rio	
Latitude (S)/ Longitude (W)	25°09'43.4"	53°49'46.1"	25°06'6.10"	53°18'41.3"	25°09'10.6"	53°16'39.4"	25°04'46.6"	53°37'26.4"	25°03'25.6"	53°32'28.9"	25°05'38.1"	53°33'24.8"	25°04'47.4"	53°24'02.9"
Cobertura vegetal (%)	100		75		66		62		7		20		27	
Área agrícola (%)	0		25		34		25		93		80		73	
Área urbana (%)	0		0		0		13		0		0		0	
Parâmetros da Água (média)/períodos	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso
pH	7	7.2	6.7	7.2	6.5	7.3	6.6	6.9	7	7.2	7	6.4	6.7	7.4
Temperatura (°C)	17.3	22.4	16.8	21.1	16.7	21.5	18.8	22.5	19.8	22	17.2	22.6	18.3	22.8
OD (mg/L-1)	9.3	8.5	10.7	8.5	11	9.3	9.5	8.5	9.1	8.9	9.8	8.4	9.9	8.4
OD %	100.5	100.6	111.4	98	110.1	107.9	106	101	119	105.4	102.1	98.8	114.6	98
Condutividade (mS/cm-1)	0.045	0.041	0.029	0.029	0.022	0.031	0.026	0.021	0.015	0.018	0.028	0.03	0.067	0.074
ST (ml.L-1)	0.029	0.027	0.019	0.016	0.014	0.02	0.016	0.013	0.008	0.012	0.018	0.019	0.041	0.048

3.2 Alterações histopatológicas em brânquia e fígado

Foram analisados no total, 122 indivíduos de *A. mullerae* (Tabela 2). A estrutura geral das brânquias possui características semelhantes a outros teleósteos, com fileiras duplas de filamentos (lamelas), que se projetam dos arcos branquiais (Fig. 2A). A lamela primária é constituída de epitélio, capilar sanguíneo e vários tipos celulares, tais como células de cloreto, mucosas e de pavimento. Já, as lamelas secundárias são compostas por epitélio simples.

As alterações mais frequentes registradas nesse estudo foram edema, cuja ocorrência foi verificada nos peixes de todos os riachos. Hiperplasia, fusão parcial e total de lamelas foram registradas em maior frequência nos indivíduos dos riachos rurais. Baixa frequência de aneurisma em baixa ocorreu em indivíduos de riachos intermediários (I2) e rurais (R1 e R2) (Fig. 2 B-H). A menor frequência de todas as histopatologias foi registrada nas brânquias dos indivíduos de F1. Não foram encontradas hipertrofia, presença de parasitas e necrose (Tabela 2).

A abundância de células de cloreto aumentou significativamente nas brânquias de *A. mullerae* coletados em riachos rurais ($F = 54.35$; $p = 0.00$) (Fig. 2 e 3). Células de muco (neutras e ácidas) não apresentaram uma distribuição relacionada com o gradiente de influência agrícola, porém, observou-se que na maioria dos riachos, a abundância desses tipos celulares foi maior no período chuvoso, com diferenças significativas entre local/período ($F = 2.46$, $p = 0.03$) (Fig. 2 e 3).

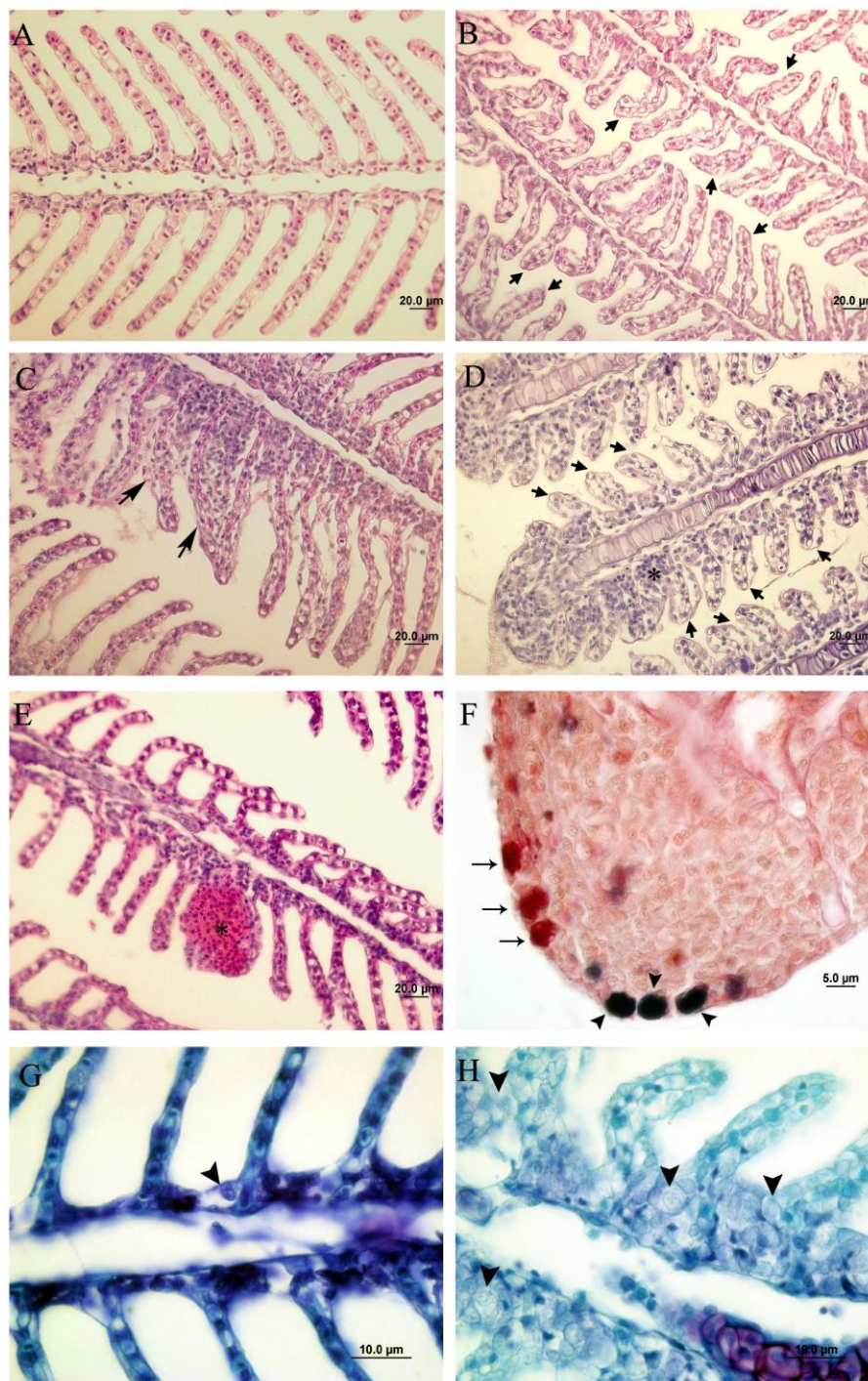


Fig. 2. Seções de tecido branquial de *A. mullerae* amostrado em riachos com diferentes usos do solo na bacia do Baixo Iguaçu. A- Lamelas normais em riacho florestado (F1). B- Edema (setas) em riacho rural (R1). C- Fusão parcial e total de lamelas (setas) em riacho rural (R2). D- Edema (flechas) e hiperplasia epitelial lamelar (*) em riacho

intermediário (I1). E- Aneurisma lamelar (*) em riacho intermediário (I2). F- Células de muco: neutro (flechas) e ácido (seta) em riacho florestado (F2). G- Célula de cloreto normal (em riacho florestado) em riacho florestado (F1). H- Hiperplasia de células de cloreto (ponta de flecha) em riacho rural (R3). A-E: Hematoxilina e Eosina de Harris (HE); F: Azul de Alcian/Ácido Periódico de Schiff; G-H: azul de Toluidina.

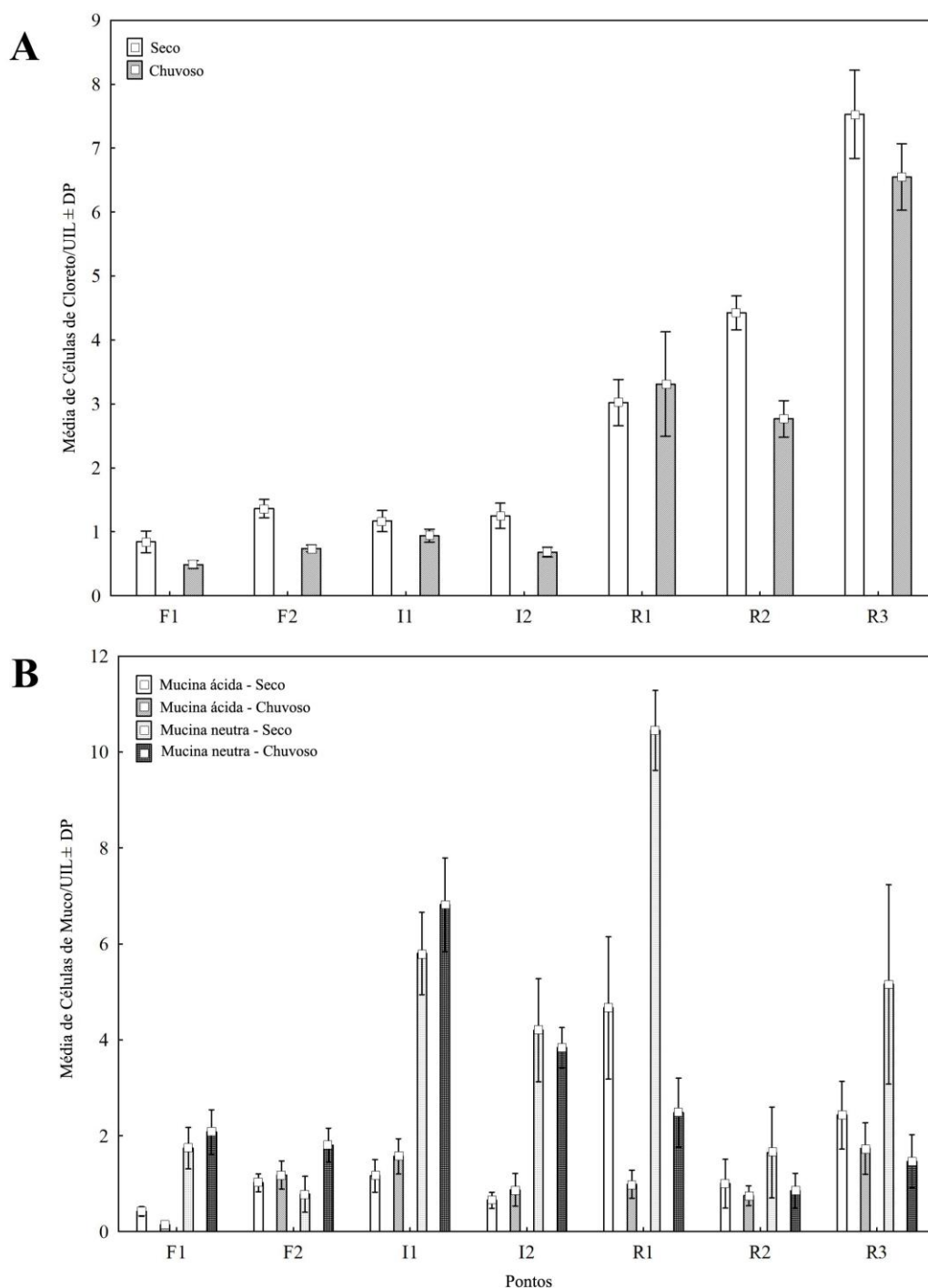


Fig. 3. Comparação da média de células de cloreto e de muco por ILU nas brânquias de *Ancistrus mullerae* (média \pm DP) amostradas em riachos com diferentes porcentagens de uso do solo na bacia do Baixo Iguaçu, Brasil, durante o período seco e chuvoso/2015-2016. Pontos: florestados: F1/F2; Intermediário: I1/I2; Rural: R1/R2/R3.

O aspecto geral do tecido hepático normal de *A. mullerae* foi constituído por parênquima que compreende hepatócitos dispostos em padrão circular, formando uma estrutura de cordão acompanhando os vasos sinusóides (Figura 4A). Na maioria dos riachos foram observados indivíduos com congestão vascular e infiltração leucocitária (menor frequência). Agregados de melano-macrófagos foram observados somente em um único indivíduo em F2. Hipertrofia nuclear, vacuolização citoplasmática, núcleo em posição lateral e degeneração citoplasmática foram mais frequentes em peixes dos pontos com maior influência agrícola (R1, R2 e R3) (Table 2; Fig. 4). Além dessas, indivíduos pertencentes aos riachos rurais R1 e R2 se destacaram pela presença de núcleo picnótico. Não houve registro de necrose.

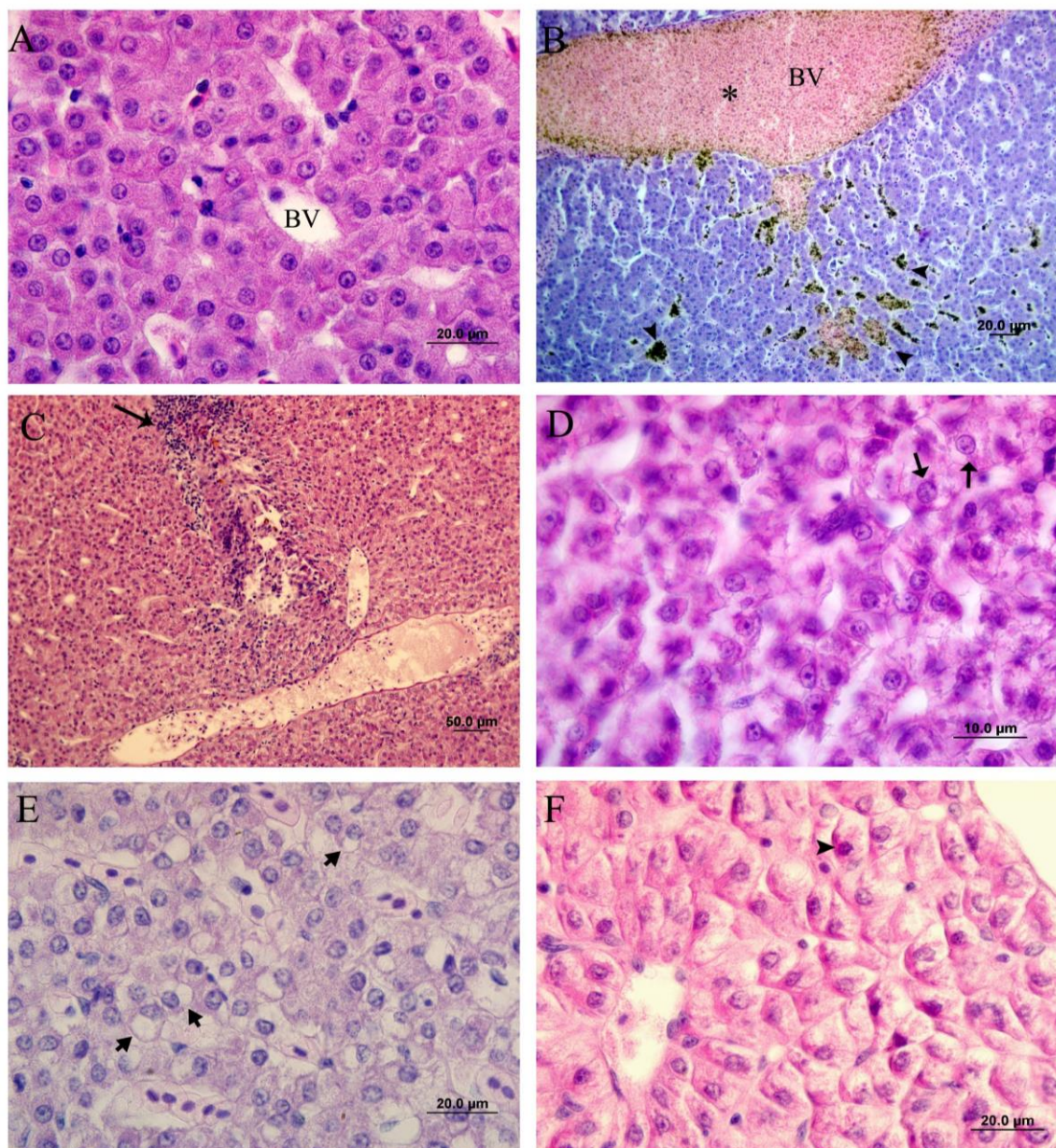


Fig. 4. Seções de tecido hepático de *A. mullerae* amostradas em riachos com diferentes porcentagens de uso do solo na bacia do Baixo Iguaçu, Brasil, durante o período seco e chuvoso/2015-2016. A- Hepatócitos normais e vasos sanguíneos (BV) em riacho florestado (F1). B- Congestão vascular (*) e agregados de melano-macrófagos (seta) em riacho florestado (F2). C - Infiltração leucocitária (seta) em riacho florestado (F1). D- Hipertrofia nuclear em riacho rural (R1). E- Vacuolização citoplasmática com núcleo na posição lateral em riacho rural (R3). F- Núcleo picnótico (ponta de seta) em riacho rural (R2). Hematoxilina e Eosina de Harris (HE).

Diferenças significativas no índice de alteração histológica de brânquia (IH_B) foram observadas entre os pontos ($F=24.57$; $p=0.00$), porém não diferiram entre os períodos amostrados ($F=1.37$; $p=0.24$). Os riachos rurais R2 e R3 se segregaram dos demais por exibirem valores médios acima de 11, o que indica danos leves para moderados ao órgão. Os demais riachos apresentaram valores médios inferiores a 10, indicando funcionamento normal do órgão (Fig. 5; Table 2). Diferenças significativas também foram verificadas no índice de alteração histológica de fígado (IH_F) entre riachos amostrados ($F=24.12$; $p=0.00$). Assim como no IH_B , períodos de amostragem não apresentaram diferenças significativas ($F=1.05$; $p=0.31$). Os valores médios do IH_F nos riachos florestados (F1 e F2) e intermediários (I1 e I2) foram inferiores à 10, classificado como valores para funcionamento normal do órgão. Os riachos rurais exibiram valores médios entre 11 e 20, indicando danos leves para moderado ao órgão. No inverno, R2 e R3 (rurais) apresentaram valores médios acima de 21, considerados como danos moderados para severos (Fig. 5, Tabela 2).

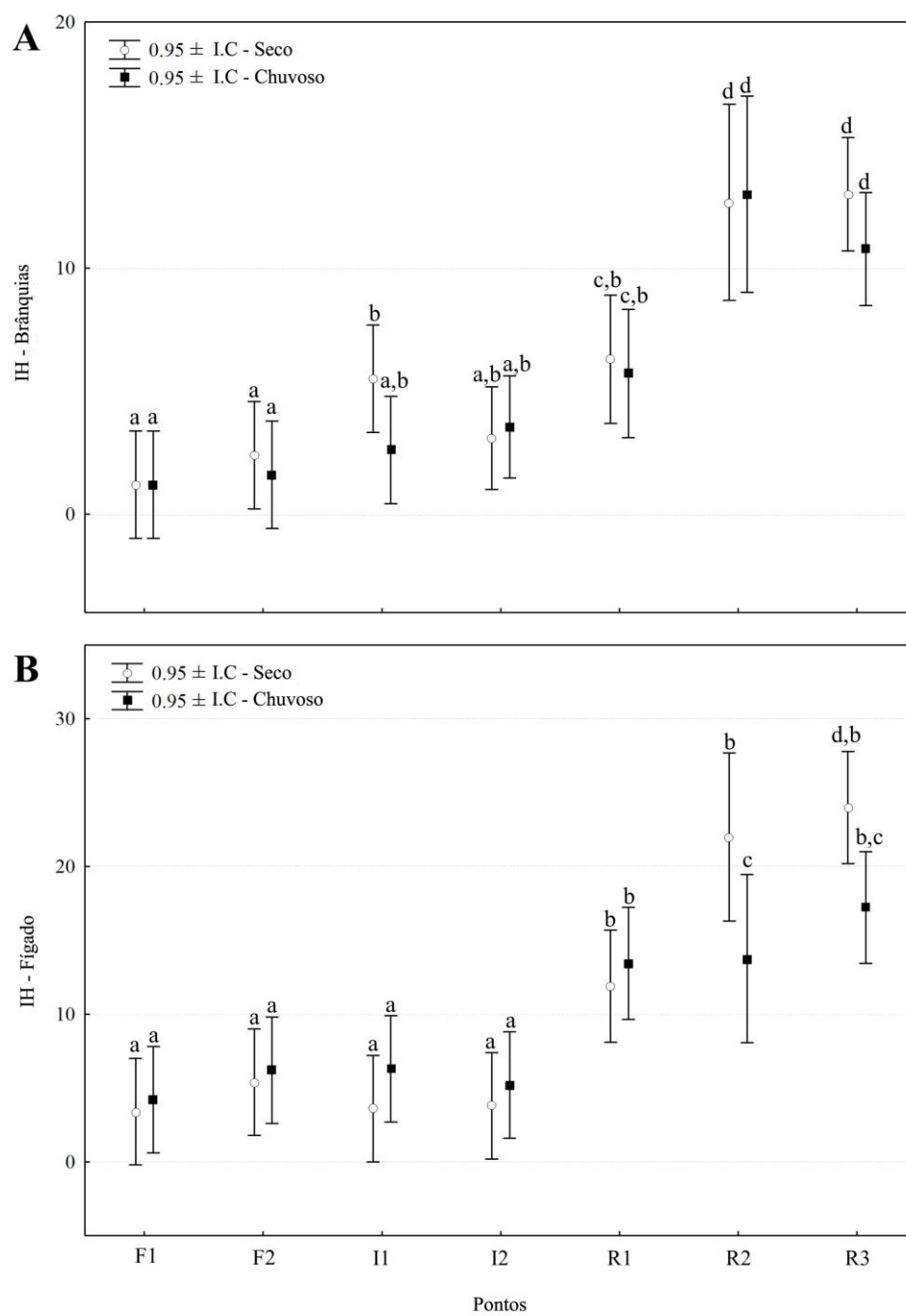


Fig. 5. Resultados obtidos da *two-way* ANOVA para: A) índice histopatológico (IH) de brânquias (A) e fígado (B) de *A. mullerae* amostrados em riachos com diferentes usos do solo na bacia do Baixo Iguaçu, Brasil, durante o período seco e período

chuvoso/2015-2016. Pontos: Florestado: F1/F2; Intermediário: I1/I2; Rural: R1/R2/R3. Letras diferentes (a, b, c, d) representam diferença significativa no teste Fisher LSD pós-hoc ($p < 0,05$). C.I. = Intervalo de confiança.

A análise de correspondência canônica (CCA) resumizou as métricas dos biomarcadores e suas relações com as variáveis ambientais, com variação acumulada de 97.3% para os dois primeiros eixos (CCA1 – Autovalores = 0.13; $p=0.01$; CCA2 – Autovalores = 0.08; $p=0.00$). Os riachos rurais com maior porcentagem de uso agrícola (R1, R2 e R3) segregaram-se negativamente no eixo 1 (CCA1). As principais variáveis que proporcionaram essa separação foram maiores valores de temperatura, condutividade e sólidos totais, conjuntamente com as maiores frequências de histopatologias mais severas de brânquia (aneurisma) e fígado (núcleo picnótico). Riachos com maior porcentagem de cobertura vegetal apresentaram poucas alterações (Fig. 6).

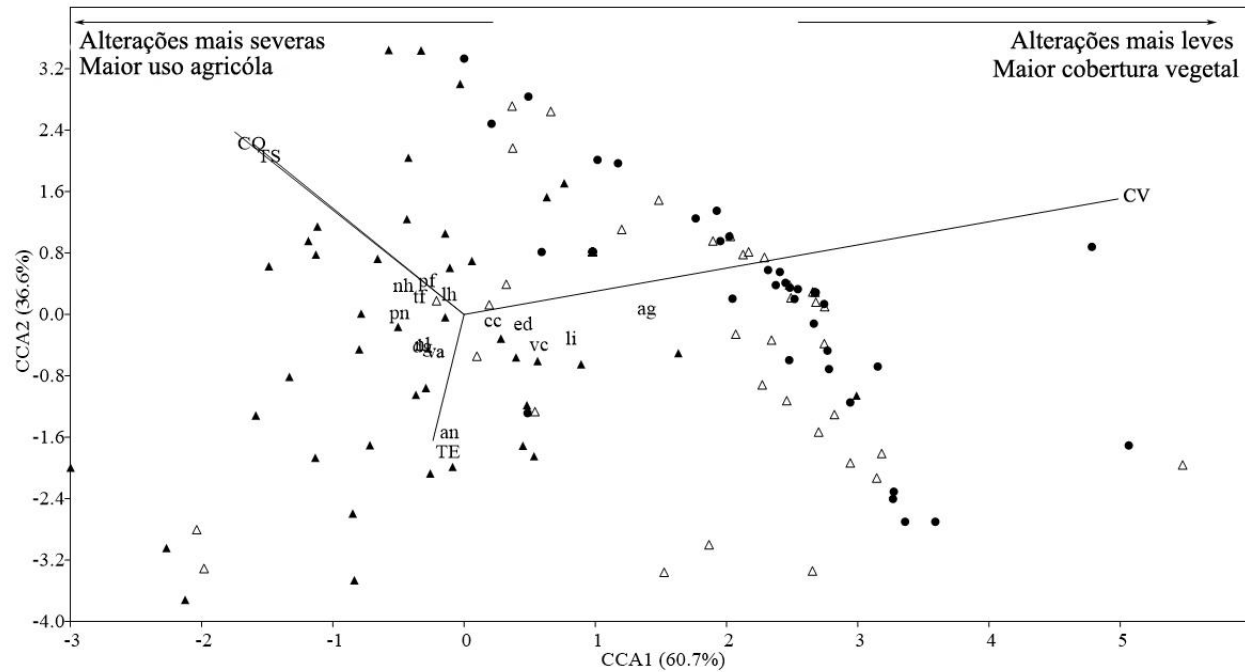


Fig. 6. Análise de Correspondência Canônica (CCA) aplicada em todos os locais sobre a frequência de alterações histopatológicas de variáveis branquiais/hepáticas e ambientais e cobertura vegetal. ● (círculo preenchido) = florestado, Δ (triângulo) = intermediário, ▲ (triângulo cheio) = rural. Variáveis ambientais: CO- Condutividade; TE- Temperatura; TS- Sólidos totais; CV- Cobertura vegetal. Alterações histopatológicas: ed - Edema; Lp - hiperplasia epitelial lamelar; Cc- células de cloreto; Pf - Fusão parcial de lamelas; Tf - Fusão total de lamelas; Na - aneurisma lamelar; Hp- hipertrofia nuclear; Va - Vacuolização citoplasmática; Ag- agregados de melano-macrófagos; NI- Núcleo em posição lateral; De - degeneração citoplasmática; Il -Infiltração de leucócitos; Vc- congestão vascular; Pn- Núcleo picnótico.

4. Discussão

Os biomarcadores da espécie alvo, aqui avaliada, responderam de maneira distinta com indicativos de maiores severidades histopatológicas em riachos com maior uso do entorno por atividades agrícolas. Esse tipo de abordagem, com uso de patologias em brânquia e fígado têm se mostrado eficiente em avaliar a qualidade da água sob diferentes influências antrópicas, principalmente, em ecossistemas aquáticos que são constantemente submetidos a diversos tipos de estressores (Oliveira-Ribeiro et al., 2006; Pinto et al., 2009; Dyke et al., 2012; Yancheva et al., 2016; Nimet et al. submetido). A novidade nesse estudo foi demonstrar a influência direta do uso agrícola na qualidade ambiental e biomarcadores em peixes de riachos.

Edema e hiperplasia nas brânquias foram as alterações mais frequentes observadas em todos os riachos avaliados. Edema se inicia a partir do descolamento do epitélio lamelar, seguido da proliferação celular (hiperplasia) e, conseqüente, fusão, diminuindo a eficiência das trocas gasosas (Figueiredo-Fernandes et al., 2007). Essas patologias são consideradas como os primeiros mecanismos de defesa contra estressores ambientais (Yancheva et al., 2016), incluindo as oscilações físicas e químicas do próprio ambiente (Reis et al., 2009; Saber, 2011). Esse fato é corroborado em nosso estudo, visto que a presença dessas patologias, embora em baixa frequência, também foi verificada nos ambientes preservados, principalmente no período chuvoso.

Aneurisma e fusão total de lamela foram observadas somente em riachos cujas bacias possuem uso agrícola (intermediários e rurais). Aneurisma é uma alteração no sistema venoso dos peixes, constituída de uma vasodilatação prolongada que pode levar a ruptura do epitélio e hemorragia, afetando especialmente as trocas gasosas nas brânquias (Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, 1994; Martinez et al., 2004; Cengiz and Unlu, 2006). Essa alteração, juntamente com fusão total de lamela, são consideradas

mais graves, oriundas de efeitos crônicos que podem ser até irreversíveis (Roberts, 2012; Yancheva et al., 2016). Em vários estudos essas alterações têm sido consideradas como efeito-resposta frente à presença de contaminantes na água (Camargo and Martinez, 2007; Georgieva et al., 2014; Paulino et al., 2014a).

Hipertrofia e hiperplasia de células de cloreto estão relacionadas com a regulação iônica (Paulino et al., 2012b; 2014). Maior abundância dessas células foi observada nos riachos rurais, o que indica a presença de estressores não naturais que causam desequilíbrio iônico, como agrotóxicos e metais pesados. Células de muco (MCs) desempenham papel importante na proteção das brânquias. Células que contêm glicoproteínas neutras apresentam baixa viscosidade, enquanto que aquelas que contêm glicoproteínas ácidas há um aumento na viscosidade (Fiertak and Kilarski, 2002; Paulino et al., 2012b). Nossos resultados mostraram que esses tipos celulares (MCs) foram mais relacionados com a sazonalidade do que com o gradiente de uso do solo. Assim, a maior abundância de MCs observada no período chuvoso pode ter relação com o aumento de sólidos totais. Esse fato ocorre devido ao aumento da pluviosidade, onde, conseqüentemente, há um maior aporte de matéria em suspensão para dentro do corpo hídrico (Esteves, 2011), o que também ocorre de maneira mais atenuada nos riachos florestados.

Através da combinação e pontuação das alterações representadas pelos valores de HI_B , foi possível distinguir, do ponto de vista das histopatologias encontradas em *A. mullerae*, os riachos mais preservados daqueles com maior uso agrícola, sendo que estes últimos tiveram índices acima de 10, indicando danos moderados até severos aos órgãos. Essa relação direta entre o nível de danos teciduais indica má qualidade da água nesses ambientes, fato que, possivelmente, ocorra devido à exposição dos peixes aos poluentes e maior carga de material em suspensão nos ambientes desprovidos de filtros,

como as áreas de vegetação nas margens. A presença de histopatologias de menor severidade e em baixa frequência nos ambientes mais preservados, em ambos períodos, conjuntamente com a ausência de diferenças sazonais significativas nos valores de HI_B , dão suporte a essa ideia. Esses padrões de alterações histopatológicas também foram encontrados em outros tipos de ambientes com diferentes influências antrópicas (Camargo and Martinez, 2007; Hued et al., 2012; Montes et al., 2015; Nimet et al., in submissão). Esses achados consolidam a ideia de que os riachos são diretamente afetados por fontes difusas de contaminantes decorrentes do uso antrópico do solo, corroborando a convergência de respostas dos peixes a diferentes fontes de impacto.

Conjuntamente com as brânquias, o fígado se destaca por ser um importante órgão de desintoxicação e essencial no metabolismo e na excreção de substâncias tóxicas no corpo do peixe (Takashima and Hibiya, 1995; Van der Oost et al., 2003; Salamat and Zarie, 2012). Assim, alterações histológicas no fígado de peixes podem levar a complicações severas ao metabolismo do organismo, sendo indicadoras da exposição dos peixes a estressores (Boran et al., 2010; Dyke et al., 2012). No nosso estudo, observou-se melhores condições no tecido hepático, dos peixes de riachos florestados, sendo que infiltração leucocitária e congestão vascular apresentaram baixas proporções. Em contraste, vacuolização citoplasmática, núcleo em posição lateral, degeneração citoplasmática e congestão vascular foram as histopatologias mais frequentes nos três riachos que apresentaram menor cobertura vegetal e maior uso antrópico. Essas alterações sinalizam processos degenerativos, e podem levar a danos metabólicos, geralmente relacionados à presença de agentes contaminantes na água (Pacheco and Santos, 2002; Rajeshkumar and Munuswamy, 2011; Ghisi et al., 2016).

A vacuolização citoplasmática decorre da metabolização anormal de lipídeos, podendo resultar no deslocamento do núcleo para a periferia, bem como, na

degeneração citoplasmática (Lee et al., 2012; Yancheva et al., 2016). Além disso, essa alteração é uma resposta comumente associada com a exposição a muitas substâncias tóxicas diferentes, como por exemplo, organofosforados, carbamatos e metais pesados (Mishra and Mohanty, 2008; Vinodhini and Narayanan, 2010). Adicionalmente, a presença de núcleo picnótico, reforça a hipótese de que em ambientes com maior influência agrícola, os peixes foram acometidos por efeitos mais severos. Essa patologia representa os primeiros estágios da necrose e indica a morte celular. Nessa situação ocorrem várias alterações morfológicas no citoplasma e núcleo, levando a inativação celular, sem extravasar conteúdo tóxico para o meio extracelular, portanto, sem causar dano tecidual (Roberts, 2012). Vários estudos demonstraram que as alterações no número, tamanho e forma do núcleo de hepatócitos pode ser devido a contaminantes (Ayoola, 2008; Paulino et al., 2014a; Yancheva et al., 2016). Essa ideia ganha suporte através do HI_F , cujos valores superiores a 21 (danos moderados a severos), ocorreram exclusivamente em riachos cujos entornos eram predominantemente de uso agrícola.

Em nosso estudo, maiores valores de HI_F , em relação a HI_B podem ser explicados pela função fundamental de desintoxicação do fígado. As brânquias podem ser consideradas a porta de entrada dos contaminantes. Inicialmente, elas sofrem consequências agudas devido à exposição de algum agente estressor, sendo que o sangue que passa nas lamelas para as trocas gasosas transporta as substâncias tóxicas para o fígado. Assim, alterações no fígado representam efeitos crônicos, no qual esse é o órgão acometido com maior severidade. Nele ocorre a biotransformação dos produtos tóxicos e metais pesados, e também são acumulados, de modo que os hepatócitos ficam expostos a níveis elevados de agentes químicos que podem estar presentes no ambiente ou em outros órgãos do peixe (Heath, 1987). Esse padrão de diferenciação entre fígado e brânquia, também tem sido observado para outras espécies de peixes em estudos de

campo (Poleksic et al., 2010; Paulino et al., 2014a, Ghisi et al., 2016; Nimet et al., in press).

As fortes correlações observadas entre as variáveis abióticas, proporção de cobertura vegetal e as alterações histopatológicas suportam a afirmação de que o uso do solo por atividades agrícolas exerce forte influência negativa sobre a espécie avaliada. As patologias menos severas estiveram relacionadas com os riachos mais preservados, enquanto que as mais graves, com os riachos cujos entornos são influenciados por uso agrícola. Além disso, o gradiente de uso antrópico bem disposto no eixo 1 da CCA, bem como, maiores frequências de lesões no fígado, demonstram que o nível de estressores no ambiente aumenta a incidência de lesões crônicas.

Em adição, quanto menor foram os percentuais de cobertura vegetal e temperatura, e maior a condutividade, maiores foram os valores de HI. Assim, a ausência ou redução da vegetação marginal expõe o meio aquático a temperaturas mais elevadas, sendo que o controle metabólico dos peixes (ectotérmico) pode ser afetado (Pusey e Arthington, 2003; Casatti, 2010), bem como as trocas iônicas, por exemplo, potencializando as formas mais tóxicas de amônia e suas interações com outros poluentes. Em consequência do aumento da temperatura, a quantidade de gases dissolvidos (p. ex., oxigênio) e a tolerância dos peixes a determinadas substâncias tóxicas diminuem (Linton et al., 1997). Além disso, em ambientes aquáticos, cujo uso do entorno é utilizado para atividades agrícolas, os corpos hídricos ficam expostos a entrada de sedimentos, fertilizantes e pesticidas, sendo que esses compostos facilmente alcançam os riachos por meio escoamento superficial, lixiviação ou subterrâneo (Naiman et al., 2005; Casatti, 2010; Teresa et al., 2015). A entrada de elevada carga de sedimentos pode acarretar em níveis mais elevados de condutividade elétrica da água, juntamente com sólidos totais (Prathumratana et al., 2008). Assim, os riachos com

vegetação ciliar, como foram os casos de F1 e F2, situados em unidades de conservação, o bioindicador avaliado exibiu as melhores condições de saúde.

Nesse contexto, diante das recentes alterações no Código Florestal brasileiro que permitiu a diminuição de áreas terrestres protegidas pela Reserva Legal e Áreas de Preservação Permanente (APPs) (Brasil, Lei nº 12.651, 2012), nossos resultados complementam as preocupações que vários especialistas destacaram sobre os efeitos negativos da diminuição das áreas de mata ciliares. A perda de espécies, homogeneização faunística e diminuição de biomassa íctica, traz prejuízos não só à biota aquática, mas também às populações humanas que dependem destes recursos hídricos (Casatti, 2010).

O elevado consumo de agroquímicos de alta periculosidade no Brasil e na área de estudo (SEAB, 2008; SESA, 2013), também reforça sinais de alerta para os impactos decorrentes da expansão e manejo inadequado de áreas agrícolas, haja vista que nos riachos rurais observou-se peixes com histopatologias graves, enquanto que nos riachos florestados, considerados como referência neste estudo, a frequência destas alterações histopatológicas foi significativamente menor. Adicionalmente, o loricarídeo aqui avaliado teve menor abundância nos riachos rurais, incluindo sua ausência no rio Tormenta, que é manancial de abastecimento público (Delariva et al., dados não publicados), lançando preocupações sobre a qualidade da água desses corpos hídricos para a saúde humana.

O hábito detritívoro e de pouca locomoção (Neves et al., 2015), bem como características ecológicas propensas a bioacumulação de *A. mullare*, demonstram que essa espécie é bioindicador sensível a estressores ambientais. Assim, nosso trabalho fornece contribuições importantes para a conservação e manejo de riachos, visto que é

pioneiro em demonstrar o efeito de gradientes de influência agrícola em condições de campo, sobre biomarcadores de uma espécie endêmica.

5. Conclusão

Nós relatamos histopatologias mais graves em *A. mullerae* nos riachos com maior influência agrícola (cobertura vegetal < 30%), o que nos permitem inferir que esta atividade antrópica afetou diretamente a qualidade ambiental, corroborando nossa hipótese. Adicionalmente, as baixas frequências de histopatologias, bem como, alterações que indicam funcionamento normal dos órgãos em riachos com maior percentual de vegetação, mesmo com parcial uso agrícola (intermediários), enfatizam que as funções desempenhadas pelas áreas de preservação foram efetivas para a melhor qualidade de água nesses locais. Além disso, as alterações mostraram-se mais graves em fígado do que em brânquias, reforçando a importância do uso de biomarcadores histológicos que respondam de maneira distinta a efeitos de curto e longo prazo aos estressores ambientais.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), UNIOESTE (Universidade Estadual do Oeste do Paraná) e a todos nossos colegas pela ajuda nos trabalhos de campo e em laboratório.

Referências

Aazami, J., Esmaili-Sari, A., Abdoli, A., Sohrabi, H., Van Den Brink, P.J., 2015. Monitoring and assessment of water health quality in the Tajan River, Iran using physicochemical, fish and macroinvertebrates indices. J Environ Health Sci Eng. 13, 2-12. <http://dx.doi.org/10.1186/s40201-015-0186-y>.

- Arauco, L.R.R., Cruz, C., Machado Neto, J.G., 2005. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. *Pesticidas. Pesticidas: r. ecotox. meio ambiente* 15, 55-64.
- Ayoola, S.O., 2008. Histopathological effects of glyphosate on juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 4, 362-367.
- Baumgartner, G., Pavanelli, C.S., Baumgartner, D., Bifi, A.G., Debona, T., Frana, V.A., 2012. Peixes do baixo rio Iguaçu. EDUEM, Maringá.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25-34.
- Boran, H., Altinok, I., Capkin, E., 2010. Histopathological changes induced by maneb and carbaryl on some tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Tissue Cell* 42, 158-164.
- Brasil. Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nos 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nos 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória no 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. (Available at) http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm
- Bueno-Krawczyk, A.C., Guiloski, I.C., Piancini, L.D., Azevedo, J.C., Ramsdorf, W.A., Ide, A.H., Guimarães, A.T.B., Cestari, M.M., Silva, H.C.A., 2015. Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply. *Chemosphere* 135, 257-264.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop Ichthyol.* 5, 327-336.

Carrasco, L.R., Larrosa, C., Milner-Gulland, E.J., Edwards, D.P., 2014. A double-edged sword for tropical forests. *Science* 346, 38-40.

Casatti, L., 2010. Alterações no Código Florestal Brasileiro: impactos potenciais sobre a ictiofauna. *Biota Neotrop.* 10, 31-34.

Cengiz, E.I., Unlu, E., 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 246-253.

Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill Tissue Recovery after Copper Exposure and Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa* *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 83-91.

CIESP, 2013. IBGE apresenta ranking dos 10 rios mais poluídos do Brasil - Centro das Indústrias do Estado de São Paulo. Jacaraí, São Paulo, (Available at <http://www.ciespjacarei.org.br/noticias/ibge-apresenta-ranking-dos-10-rios-mais-poluidos-do-brasil/>)

Cogo, A.J.D., Siqueira, A.F., Ramos, A.C., Cruz, Z.M.A., Silva, A.G., 2009. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadores de impactos ambientais. *Natureza online.* 7, 37-42.

Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., Sostoa, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A., 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean Rivers. *Sci. Total Environ.* 540, 307-323.

Constantini, D., 2015. Land-use changes and agriculture in the tropics: pesticides as an overlooked threat to wildlife. *Biodivers. Conserv.* 24, 1837-1839. <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-015-0878-8>.

- Dang, M., Nørregaard, R., Bach, L., Sonne, C., Søndergaard, J., Gustavson, K., Aastrup, P., Nowak, B., 2017. Metal residues, histopathology and presence of parasites in the liver and gills of fourhorn sculpin (*Myoxocephalus quadricornis*) and shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) near a former lead-zinc mine in East Greenland. *Environ. Res.* 153, 171-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.007>.
- Dyke, J.C. van, Cochrane, M.J., Wagenaar, G.M., 2012. Liver histopathology of sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere* 87, 301-311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.002>.
- Esteves, F.A., 2011. *Fundamentos de Limnologia*. 3rd ed. Rio de Janeiro, Interciência.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, C.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85, 97-177.
- Fiertak, A., Kilarski, W.M., 2002. Glycoconjugates of the intestinal goblet cells of four cyprinids. *Cell Mol Life Sci.* 59, 1724-1733.
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesqui Vet Bras.* 27, 103-109.
- Flores-Lopes, F., Thomaz, A.T., 2011. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. *Braz J Biol.* 71, 179-188.
- Fonseca, A.R., Fernandes, L.F.S., Fontainha-Fernandes, A., Monteiro, S. M., Pacheco, F.A.L., 2016. From catchment to fish: Impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. *Sci. Total Environ.* 550, 972-986. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.199>.

- Freire, C.A., Souza-Bastos, L.R., Chiesse, J., Tincani, F.H., Piancini, L.D.S., Randi, M.A.F., Prodocimo, V., Cestari, M.M., Assis, H.C.S., Abilhoa, V., Vitule, J.R.S., Bastos, L.P., Oliveira-Ribeiro, C.A., 2015. A multibiomarker evaluation of urban, industrial and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22, 13263-13277.
- Georgieva, E., Stoyanova, S., Velcheva, I., Vasileva, T., Bivolarski, V., Iliev, I., Yancheva, V., 2014. Metal effects on histological and biochemical parameters of common rudd (*Scardinius erythrophthalmus* L.). *Arch. Pol. Fish.* 22, 197-206.
- Ghisi, N.C., Oliveira, E.C., Mota, T.E.M., Vanzetto, G.V., Roque, A.A., Godinho, J.P., Bettim, F.L., 2016. Integrated biomarker response in catfish *Hypostomus ancistroides* by multivariate analysis in the Pirapó River, southern Brazil. *Chemosphere* 161, 69-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.113>.
- Gotelli, N.J., Ellison, A.M., 2011. *Princípios de estatística em ecologia*. Artmed, Porto Alegre.
- Hammer, D.A., Harper, T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4, 1-9.
- Heath, A.G., 1987. *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Boca Raton.
- Hermoso, V., Clavero, M., 2013. Revisiting ecological integrity 30 years later: non-native species and the misdiagnosis of freshwater ecosystem health. *Fish Fish.* 14, 416-423.
- Hued, A.C., Oberhofer, S., de los Ángeles Bistoni, M., 2012. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 107-117.

- Jesus, T.B., Carvalho, C.E.V., 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecol Bras.* 12, 1-14.
- Jones, R., Reid, L., 1978. Secretory cells and their glycoproteins in health and disease. *Br. Med. Bull.* 34, 9-16.
- Lanctôt, C., Navarro-Martín, L., Robertson, C., Park, B., Jackman, P., Pauli, B.D., Trudeau, V.L., 2014. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax and Vision under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 154, 291-303.
- Lee, J.W., Kim, J.W., De Riu, N., Moniello, G., Hung, S.S., 2012. Histopathological alterations of juvenile green (*Acipenser medirostris*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) exposed to graded levels of dietary methylmercury. *Aquat. Toxicol.* 109, 90-99.
- Legendre, P., Legendre, L. (Eds.), 1998. *Numerical Ecology*, 2nd English ed. Elsevier.
- Liebel, S., Tomotake, M.E.M., Oliveira-Ribeiro, C.A., 2013. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. *Ecotoxicol. Environ. Cont.* 8, 9-15.
- Lins, J.A.P.N., Kirschnik, P.G., Queiroz, V.S., Cirio, S.M., 2010. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais* 8, 469-484.
- Linton, T.K., Reid, S.D., Wood, C.M., 1997. The metabolic costs and physiological consequences to juvenile rainbow trout of a simulated summer warming in the presence and absence of sublethal ammonia. *Trans. Am. Fish. Soc.* 126, 259-272.

- Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz J Biol.* 64, 797-807.
- Mishra, A.K., Mohanty, B., 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 136-141.
- Montes, C. S., Ferreira, M.A.P., Santos, S.S.D., Rocha, R.M., 2015. Environmental quality of an estuary in Amazon delta using immunohistochemical and morphological analyses of gill as biomarkers. *Acta Sci Biol Sci* 37, 113-121.
- Naiman, R.J., Décamps, H., McClain, M.E., 2005. *Riparia: ecology, conservation, and management of streamside communities*. Elsevier Academic Press, Burlington.
- Neves, M.P., Delariva, R.L., Wolff, L.L., 2015. Diet and ecomorphological relationships of an endemic, species-poor fish assemblage in a stream in the Iguazu National Park. *Neotrop Ichthyol.* 13, 245-254. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20140124>.
- Nimet, et al., (in press). Anthropoc use of surroundings of neotropical streams results in histopathological changes in gills and liver of *Astyanax bifasciatus* (Garavello, 2010).
- Oliveira-Ribeiro, C.A., Filipack, F., Mela, M., Silva, P.H., Randi, M.A.F., Costa, J.R.A., Pelletier, E., 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead and tributyltin chloride. *Environ. Res.* 101, 74-80.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 331-347.

- Parolin, M., Volkmer-Ribeiro, C., Leandrini, J.A., 2010. Abordagem interdisciplinar em bacias hidrográficas no Estado do Paraná. Editora Fecilcam, Campo Mourão.
- Paulino, M.G., Benze, T.P., Sadauskas-Henrique, H., Sakuragui, M.M., Fernandes, J.B., Fernandes, M.N., 2014a. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Sci. Total Environ.* 497, 293-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.122>.
- Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012b. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86, 1-7. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.033>.
- Pinto, A., Varandas, S., Coimbra, A., Carrola, J., Fontaínhas-Fernandes, A., 2009. Mullet and gudgeon liver histopathology and macroinvertebrate indexes and metrics upstream and downstream from a wastewater treatment plant (Febros River-Portugal). *Environ Monit Assess.* 169, 569-585.
- Poleksic, V., Lenhardt, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G., Raskovic, B., 2010. Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 515-521.
- Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Pp. 339-352. In: Müller, R., R. Lloyd (Eds.). *Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Fishing News Books, Oxford.
- Powell, M.D., Speare, D.J., Wright, G.M., 1995. Morphological changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill epithelia following repeated intermittent exposure to chloramine.T. *Can. J. Zool.* 73, 154-165.
- Prathumratana, L., Sthiannopkao, S., Kim, K.W., 2008. The relationship of climatic and hydrological parameters to surface water quality in the lower Mekong River. *Environ Int.* 34, 860-866.

- Pusey, B.J., Arthington, A.H., 2003. Importance of the riparian zone to the conservation and management of freshwater fish: a review. *Mar. Freshw. Res.* 54, 1-16.
- Rajeshkumar, S., Munuswamy, N., 2011. Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India. *Chemosphere* 83, 415-421.
- Ramade, F., 1998. *Dictionnaire Encyclopédique Des Sciences De L' Eau*, 2nd ed. Ediscience International, Paris.
- Rebello, R.M., Caldas, E.D., 2014. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. *Quim Nova* 37, 1199-1208. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140165>.
- Reis, A. B., Sant'Ana, D.M.G., Azevedo, J.F., Merlini, L.S., Araújo, E.J.A., 2009. The influence of the aquatic environment in tanks sequentially interconnected with PVC pipes on the gill epithelium and lamellas of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesqui Vet Bras.* 29, 303–311.
- Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol Appl.* 15, 618-627.
- Roberts, R.J., 2012. *Fish Pathology*, 4th ed. Wiley-Blackell, Canadá.
- Roberts, S.D., Powell, M.D., 2003. Comparative ionic flux and gill mucous cell histochemistry: effects of salinity and disease status in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 134, 525-537.
- Saber, T.H., 2011. Histological adaptation to thermal changes in gills of common carp fishes *Cyprinus carpio* L. *Rafidain J. Scie.* 22, 46-55.
- Sabóia-Moraes, S.M.T., Hernandez-Blazquez, F.J., Mota, D.L., Bittencourt, A.M., 1996. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. *J Fish Biol.* 49, 545-548.

Salamat, N., Zarie, M., 2012. Using of fish pathological alterations to assess aquatic pollution: A Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 4, 223-231.

Santos, J.S., Souza, F.M., Santos, M.L.P., 2013. Distribuição de Zn, Pb, Ni, Cu, Mn e Fe nas frações do sedimento superficial do rio Cachoeira na região sul da Bahia, Brasil. *Quim Nova* 36, 230-236.

Santos, K.C., Martinez, C.B.R., 2014. Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula flumínea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100, 7-14.

SEAB, 2008. Análise da conjuntura agropecuária – Safra 2008/09- Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Curitiba, Paraná, (Available at) (http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/Prognostico_agropec_0809.pdf).

SESA, 2013. Vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos no Paraná - Secretária Estadual de Saúde do Paraná. Curitiba, Paraná, (Available at) (<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/setembro/02/PLano-PR.pdf>).

Statsoft, Inc., 2005. Statistica (data analysis software system). Version 7.1. (Available online at) (www.statsoft.com). <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-014-1230-9>.

Takashima, F., Hibiya, T., 1995. An atlas of fish histology normal and pathological features, 2nd.ed. Gustav Fischer Verlag, Kodansha.

Teresa, F.B., Casatti, L., Cianciaruso, M.V., 2015. Functional differentiation between fish assemblages from forested and deforested streams. *Neotrop Ichthyol.* 13, 361-370. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20130229>.

Trevisan, R., Mello, D.F., Uliano-Silva, M., Delapedra, G., Arl, M., Dafre, A.L., 2014. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. *Mar. Environ. Res.* 101, 81-90.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 281-300.

Vinodhini, R., Narayanan, M., 2010. Heavy metal induced histopathological alterations in selected organs of the *Cyprinus carpio* L. (Common Carp). *Int J Environ Res.* 3, 95-100.

Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S., Georgieva, E., 2016. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. *Appl. ecol. environ. res.* 14, 47-75.
http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1401_047075.

Zia, H., Harris, N.R., Merrett, G.V., Rivers, M., Coles, N., 2013. The impact of agricultural activities on water quality: A case for collaborative catchment-scale management using integrated wireless sensor networks. *Comput Electron Agric.* 96, 126-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2013.05.001>.