

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

JARDEL NIMET

HISTOPATOLOGIA EM *Astyanax bifasciatus* (Garavello, 2010) COMO
BIOMARCADOR PARA BIOMONITORAMENTO DE RIACHOS COM
DIFERENTES USOS E OCUPAÇÃO DO SOLO.

CASCADEL-PR

Agosto/2016

JARDEL NIMET

HISTOPATOLOGIA EM *Astyanax bifasciatus* (Garavello, 2010) COMO
BIOMARCADOR PARA BIOMONITORAMENTO DE RIACHOS COM
DIFERENTES USOS E OCUPAÇÃO DO SOLO.

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 Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosilene Luciana Delariva

Coorientador: Prof^o. Dr. João Paulo de Arruda Amorim

CASCADEL-PR

Agosto/2016

Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

Aos meus pais, Arnaldo e Nelvi, dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois acredito fielmente que nada acontece sem seu consentimento.

Agradeço à minha família. Meus pais, Arnaldo e Nelvi, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando emocionalmente e financeiramente. Meu irmão Leandro e minha cunhada Fernanda, que me acolheram em sua casa durante o primeiro ano do mestrado, me ajudando e fazendo eu me sentir em casa mesmo em outra cidade.

Agradeço a professora Rosilene, que me deu a oportunidade de ser seu orientado e por tamanha compreensão com minhas dificuldades. Foram dois anos de conselhos, orientação e ajuda, foi professora, orientadora e amiga. Muito obrigado, espero um dia retribuir tudo que a professora fez por mim.

Agradeço ao meu co-orientador, professor João Paulo, por toda ajuda, conselhos e por tornar as horas no laboratório divertidas. Aprendi muito sobre histologia e técnicas histológicas, mas principalmente a manter o foco e contornar os problemas com calma e serenidade. Muito obrigado.

Agradeço a professora Ana Tereza, que me ajudou no projeto, com as técnicas em campo e laboratório, e claro, com a estatística. Muito obrigado, além de professora é uma amiga e tenho como exemplo de profissional.

Agradeço ao professor Luciano pela ajuda nas coletas e pelas discussões sobre ecologia e evolução depois do almoço junto com o professor Eliseu. Muito obrigado aos dois, aprendi muito com vocês.

Agradeço a professora Elaine, por ter se disposto em um domingo ajudar na identificação dos peixes.

Aos amigos de laboratório, Mayara, Mara, Bruna, Crislei e Thaís, pela ajuda no nas coletas e no laboratório, muito obrigado. Me sinto abençoado por fazer parte desse grupo, pessoas que nunca negaram ajuda e tornaram muito mais fácil essa caminhada.

Agradeço o grupo de pesquisa em recursos pesqueiros e limnologia - GERPEL, pela ajuda nas coletas. Muito obrigado, professor Pitágoras, Professora Diesse, Tiago, Gabriele e Patricia.

Aos colegas e amigos Lucas, Leo, Mariane e Gisele do laboratório de genética, bem como meu amigo Hudson, pela ajuda na elaboração do mapa. Muito obrigado pela ajuda.

A todos os colegas de turma, especialmente a minha amiga e colega de trabalhos, provas e estudos, Adriane. Muito obrigado.

Por último, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Abstract	i
Resumo.....	ii
1.Introdução	1
2.Material e Métodos.....	4
2.1 <i>Área de Estudo.....</i>	<i>4</i>
2.2 <i>Caracterização físico e químico da água</i>	<i>6</i>
2.3 <i>Procedimentos de campo.....</i>	<i>6</i>
2.4 <i>Análises histológicas.....</i>	<i>7</i>
2.5 <i>Análises dos dados.....</i>	<i>9</i>
3.Resultados	9
3.1 <i>Parâmetros físicos e químicos da água</i>	<i>9</i>
3.2 <i>Histopatologias na brânquia e fígado</i>	<i>10</i>
3.3 <i>Relação entre histopatologias e variáveis ambientais</i>	<i>16</i>
4.Discussão	17
5.Referências	23

Histopathology in *Astyanax bifasciatus* (Garavello, 2010) as a biomarker for biomonitoring of streams with different uses and occupation.

Abstract: This study evaluated the use of gill and liver of *Astyanax bifasciatus* as histological biomarkers for biomonitoring of streams with different uses and land occupation. The fish were collected by electric fishing technique, in six streams classified as afforested, rural and urban, in the basin of the lower Iguazu River, west region of Paraná State, in December 2014. It was tested the hypothesis that in streams that are influenced by effluents from urban and rural areas occur greater number and histopathological severity in gill and liver of *A. Bifasciatus*. In this context, the objective of this study was to correlate the presence and degree of histopathology of gill and liver with the environmental variables among streams with different uses and land occupation. The environments considered afforested showed higher values of dissolved Oxygen (DO) and lower conductivity (CO) when compared to the rural and urban environments. The gills of fish from the afforested streams indicated normal functioning of the organ, while in the rural and urban streams, the histopathology in the gills suggested light to moderate damage to the organ. In relation to the liver, the histopathology indicated light to moderate damage in rural streams and moderate to severe damage in urban streams. When considering the abiotic variables and frequencies of histopathology of gill and liver, the afforested streams were separated from rural and urban areas. The histopathology in gills and livers were significantly more severe, corroborating our hypothesis. It was possible to distinguish streams with different uses and land occupation, therefore, these histopatologias showed favorable biomarkers for studies of biomonitoring.

Keywords: Lotic environments, Gill, Liver, Biomarker.

Histopatologia em *Astyanax bifasciatus* (Garavello, 2010) como biomarcador para biomonitoramento de riachos com diferentes usos e ocupação do solo.

Resumo: Este estudo avaliou o uso de brânquia e fígado de *Astyanax bifasciatus* como biomarcadores histológicos para biomonitoramento de riachos com diferentes usos e ocupação do solo. Os peixes foram coletados por meio da técnica de pesca elétrica, em seis riachos classificados em florestados, rurais e urbanos, na bacia do baixo Rio Iguaçu, região Oeste do Estado do Paraná, em dezembro de 2014. Testou-se a hipótese de que em riachos que sofrem influências de efluentes oriundos de áreas rurais e urbanas ocorrem maior número e severidade histopatológicas em brânquia e fígado de *A. bifasciatus*. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo correlacionar a presença e o grau de histopatologias de brânquia e fígado com as variáveis ambientais entre riachos com diferentes usos e ocupação do solo. Os ambientes considerados florestados apresentaram maiores valores de Oxigênio dissolvido (OD) e menores de condutividade (CO) quando comparados com os ambientes rurais e urbanos. As brânquias dos peixes dos riachos florestados indicaram funcionamento normal do órgão, enquanto que nos riachos rurais e urbanos, as histopatologias nas brânquias sugeriram danos leves para moderados ao órgão. Em relação ao fígado as histopatologias indicaram danos leves para moderados nos riachos rurais e danos moderados para severos nos riachos urbanos. Ao considerar as variáveis abióticas e as frequências das histopatologias de brânquia e fígado, os riachos florestados foram separados dos rurais e urbanos. As histopatologias nas brânquias e fígados foram significativamente mais severas, corroborando a nossa hipótese. Foi possível distinguir os riachos com diferentes usos e ocupação do solo, portanto, essas histopatologias se mostraram biomarcadores favoráveis para estudos de biomonitoramento.

Palavras-chave: Ambientes lóticos, Brânquia, Fígado, Bioindicação.

1. Introdução

As bacias hidrográficas brasileiras caracterizam-se por uma imensa rede de pequenos cursos de água, com diferentes características fisiográficas, o que propicia a ocorrência de uma elevada diversidade de organismos (Nogueira et al., 2010). Entretanto, grande parte desses ecossistemas encontra-se extremamente ameaçados pela crescente poluição decorrente da atividade humana (Miranda, 2012), e a contínua contaminação desses ecossistemas de água doce pelo lançamento de poluentes urbanos, industriais e agrícolas, tornou-se tema de grande preocupação nas últimas décadas (Ayadi et al., 2015; Jordao et al., 2002).

De forma geral, exceto algumas poucas áreas da região amazônica, todas as bacias brasileiras estão submetidas a algum dos principais impactos sobre os ecossistemas de água doce, considerados globais, como a destruição de habitats, poluição, modificação do fluxo e introdução de espécies não nativas (Agostinho et al., 2005; Collen et al., 2014; Dudgeon et al., 2006). Nesse cenário, as regiões sul e sudeste, em função das maiores densidades populacional e desenvolvimento econômico, se destacam pelos elevados níveis de comprometimento da qualidade da água de suas bacias. Um exemplo dessa situação é o rio Iguazu no estado do Paraná, considerado o segundo rio mais poluído do Brasil, segundo estudos realizados em 2008 (IBGE, 2008).

Apesar de ser fundamental para o abastecimento de várias cidades e áreas agrícolas (SEMA, 2010), bem como apresentar elevado endemismo (Abell et al., 2008; Baumgartner et al., 2012; Nogueira et al., 2010), a bacia hidrográfica do rio Iguazu é constantemente impactada ao longo de suas margens e calha. Na região do alto e médio Iguazu, os poluentes são oriundos principalmente do esgoto urbano e industrial, enquanto que na região do baixo Iguazu, a oeste do estado, em função da intensa atividade agrícola, os principais contaminantes referem-se aos defensivos agrícolas a

base de organofosforados e carbamatos (Freire et al., 2015). Nesse sentido, estudos de biomonitoramento dos corpos de água a fim de avaliar a qualidade do ambiente, tornam-se de extrema relevância, uma vez que, esses xenobióticos podem passar por fenômenos de biotransformação no indivíduo ou biomagnificação em nível de teia alimentar, comprometendo, assim, todo o ecossistema (Silva et al., 2013).

Avaliar a qualidade ambiental através de biomonitoramento possui o diferencial de se obter análise preditiva de contaminantes que causam efeitos biológicos negativos, mesmo quando a concentração desses contaminantes no ambiente não é detectável pelos métodos instrumentais analíticos (Chiesse, 2010). Nos estudos de biomonitoramento são utilizados organismos que possam indicar sinais precoces de degradação ambiental causada por contaminantes, sendo classificados como bioindicadores (Adams, 2002; Santos, 2013). A análise da espécie bioindicadora pode ser feita através de um grupo de respostas biológicas, denominadas biomarcadores, e esses podem determinar o grau de impacto na saúde da biota, bem como identificar os possíveis estressores responsáveis por esses efeitos (Bainy, 1993; Fuentes-Rios et al., 2005; Van der Oost et al., 2003).

Bioindicadores e biomarcadores têm sido utilizados para avaliar a contaminação de áreas impactadas (Nunes et al., 2015; Samanta et al., 2015; Tabassum et al., 2016). Assim, as alterações histopatológicas são amplamente utilizadas como biomarcadores na avaliação de contaminantes, tanto em ensaios de laboratório (Cerqueira & Fernandes, 2002; Dyk et al., 2007; Hesni et al., 2011), quanto em campo (Dane & Sisman, 2015; Flores-Lopes et al., 2010; Paulino et al., 2014).

As alterações histológicas em tecidos de peixes funcionam como ferramenta sensível para detectar efeitos de compostos químicos em órgãos-alvo (Schwaiger et al., 1997). Nesse aspecto, as brânquias (Ayadi et al., 2015; Gomes et al., 2012), por estarem em contato direto com a água, torna-se importante biomarcador histológico de

peixes expostos a contaminantes (Garmendia et al., 2010). Conjuntamente, o fígado acumula muitos compostos tóxicos (Oliveira Ribeiro et al., 2005; Ileana et al., 2012), devido sua função de biotransformação de xenobióticos (Hinton et al., 2001). Sendo assim, os estudos que visam apresentar uma análise preditiva sobre a histologia desses órgãos são fundamentais para avaliação da qualidade e ações de manejo e conservação dos ambientes aquáticos (Kock et al., 1996; Lins et al., 2010; Santos et al., 2012; Van der Oost et al., 2003).

Astyanax bifasciatus é um teleósteo com ampla distribuição na bacia do rio Iguazu com elevada abundância e hábito onívoro (Baumgartner et al., 2012; Delariva et al., 2013), sendo assim, apresenta uma relação intrínseca com diversos níveis da cadeia alimentar, podendo indicar respostas de efeitos crônicos e acumulativos tanto decorrentes de efeitos diretos no indivíduo como em nível de teia alimentar. Por essa razão, torna-se potencial bioindicador para estudos de biomonitoramento nessa bacia.

Nesse contexto, o presente estudo partiu da premissa de que os diferentes usos e ocupação do solo no entorno dos riachos, podem influenciar na condição de saúde dos peixes. Assim, testamos a hipótese que ocorrem maiores alterações nos tecidos de brânquia e fígado de *Astyanax bifasciatus*, presentes em riachos expostos a contaminação por efluentes provenientes de áreas rurais e urbanas. Dessa maneira, os objetivos desse estudo foram; (I) Verificar possíveis diferenças nas variáveis ambientais entre riachos com diferentes usos e ocupação do solo; (II) avaliar a ocorrência e frequência de histopatologias em brânquia e fígado de *A. bifasciatus* em riachos com diferentes usos e ocupação do solo; (III) correlacionar a presença e o grau de histopatologias de brânquia e fígado com as variáveis ambientais entre os riachos estudados.

2. Material e Métodos

2.1 Área de Estudo

Foram realizadas amostragens em riachos de 1ª a 3ª Ordens (Strahler, 1957), que estão inseridos em bacias de rios tributários do baixo rio Iguaçu, no trecho entre a jusante da barragem de Salto Osório e a foz do rio Floriano – Parque Nacional do Iguaçu (Figura 1). Os riachos amostrados foram classificados *a priori* em função do uso e ocupação do solo das microbacias. Foi utilizado o 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.

Essa classificação foi realizada em todos os riachos e a partir da caracterização da microbacia, os riachos foram categorizados, de acordo com a porcentagem de ocupação do solo em: Florestado (considerado como menos impactado, apresentando mais de 50% de cobertura vegetal. Essa nomenclatura assemelha-se aos termos referência ou controle comumente usado na literatura), Rural (mais de 50% de uso agrícola) e Urbano (mais de 25% de áreas urbanizadas). Os pontos e suas posições geográficas estão descritos na tabela 1.

As áreas caracterizadas como rurais possuem monoculturas, principalmente de soja e milho, e utilizam diversos defensivos agrícolas para controle de pragas (IPARDES, 2013). As áreas caracterizadas urbanas são em cidades consideradas de pequeno porte, com população entre 10 a 20 mil habitantes, e tendo o comércio e serviços como principal fator econômico (IBGE, 2014).

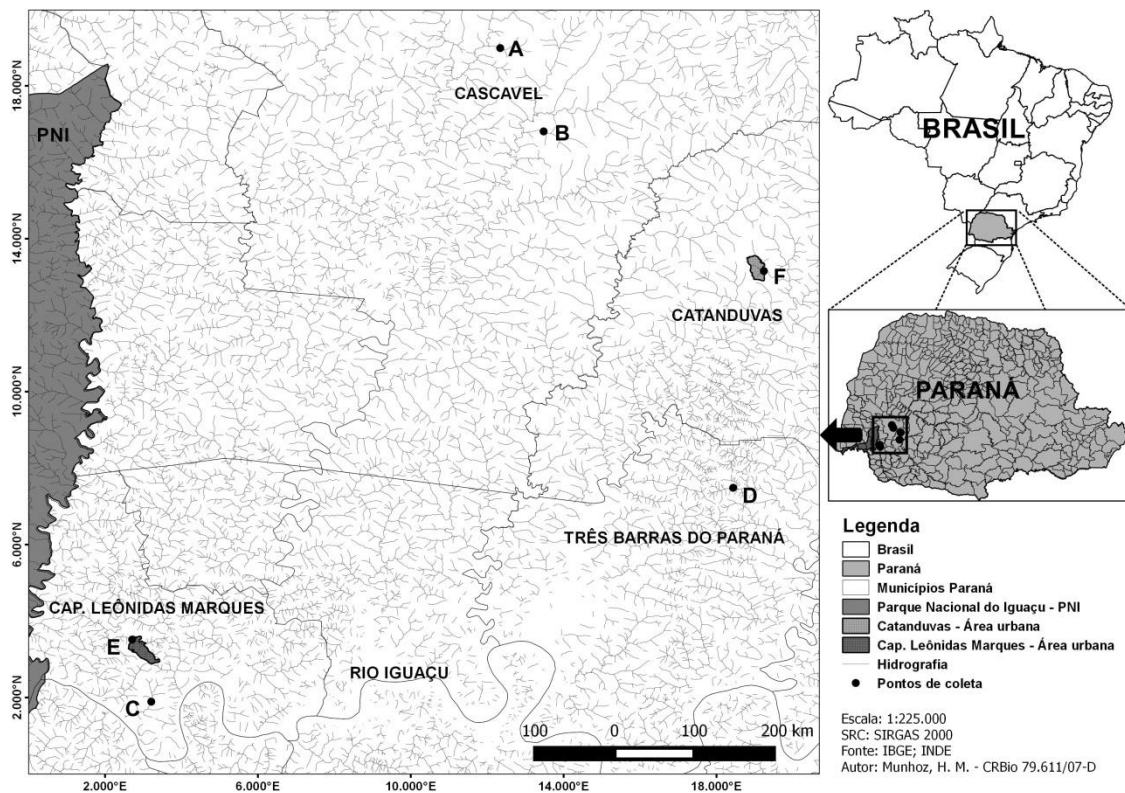


Figure 1: Área de estudo em destaque a partir do mapa hidrográfico do Estado do Paraná. As letras indicam os riachos amostrados: A. F1; B. F2; C. R1; D. R2; E. U1; F. U2.

Table 1 – Localização e classificação dos riachos com diferentes usos e ocupação do solo na bacia do Baixo rio Iguaçu. F = Florestado, R = Rural, U = Urbano. Veg = Cobertura vegetal, Agr = Área agrícola, Urb = Área urbana.

Sampled streams	Município/PR	Latitude (S)	Longitude (W)	Uso do solo %		
				Veg	Agr	Urb
F1	Cascavel	25°02'24,8"	53°20'35,9"	53%	47%	0%
F2	Cascavel	25°06'06,2"	53°18'39,8"	75%	25%	0%
R1	Capitão Leônidas Marques	25°31'15,2"	53°36'03,3"	18%	78%	4%
R2	Três Barras do Paraná	25°21'48,7"	53°10'19,3"	31%	69%	0%
U1	Capitão Leônidas Marques	25°28'31,2"	53°36'52,9"	19%	40%	41%
U2	Catanduvas	25°12'15,3"	53°08'56,6"	21%	48%	31%

2.2 Caracterização físico e químico da água

Em todos os riachos foram realizadas amostragens da temperatura da água, pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido, por meio de uma sonda multiparâmetro Horiba.

2.3 Procedimentos de campo

As coletas foram realizadas em dezembro de 2014 através da técnica de pesca elétrica com o auxílio de um gerador Branco B4T-2500T. Foi delimitado um trecho de 50m de cada riacho, foram usadas redes de bloqueio a montante e jusante do trecho, e em seguida foram realizadas três passadas sucessivas com duração aproximadamente de 40 minutos no sentido jusante-montante do rio. Autorização de coleta do SiSBio número da licença – 42565.

Para cada riacho, foram capturados 10 indivíduos adultos de *Astyanax bifasciatus* para análises histopatológicas, exceto quando a abundância total da espécie no local foi menor. A amplitude de tamanho e biomassa total registrada nos indivíduos foi está descrita na tabela 3.

2.4 Análises histológicas

Os peixes coletados foram anestesiados com cepacaína diluída em água (1:80), e eutanasiados por seccionamento medular (de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIOESTE). Os indivíduos foram medidos (comprimentos total e padrão – cm), pesados (g). Brânquia e fígado foram retirados e fixados em ALFAC (formoldeído, álcool 95% e ácido acético). Outros exemplares de *A. bifasciatus* foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e depositados na coleção Ictiológica do GERPEL (Grupo de pesquisas em recursos pesqueiros e limnologia), na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Toledo, PR, Brazil.

Para as análises histopatológicas, a brânquia (5-10 filamentos branquiais/amostra, 10 amostras/grupo) e fígado (3mm tecido/amostra, 10 amostras/grupo) foram desidratados em série crescente de etanol, clareado em xilol e incluído em Paraplast[®]. Foram feitos cortes semi-seriados no sentido longitudinal com 5µm de espessura. Os cortes obtidos foram submetidos à técnica de coloração com Hematoxilina Harris e Eosina (HE) e azul de Toluidina (AT). As secções foram observadas utilizando microscópio olímpos BX61 e as imagens foram capturadas e analisadas utilizando câmera de vídeo digital Olympus DP71 e software DP Controller 3.2.1.276.

As histopatologias foram quantificadas para brânquia e fígado (5 campos microscópicos aleatórios/secção, 3 secções/amostra, e 10 amostras/grupo) de acordo com a especificidade do tecido. A incidência e a distribuição das lesões foram avaliadas de acordo com Paulino et al. 2014, com base nos seguintes critérios: 0, ausência de lesões (ausência ou lesões em até 10% do tecido analisado); 0+, raramente presente (ocorrência de lesões de 11% a 25% do tecido analisado); +, presente (ocorrência de lesões em 26% a 50% do tecido analisado); ++, frequente (ocorrência de lesões de 51%

a 75% do tecido analisado) e +++, lesões muito frequentes (ocorrência de lesões em 76% a 100% do tecido analisado).

A presença de histopatologias para cada órgão foi avaliada semi-quantitativamente pelo índice histopatológico (IH), baseado no tipo, localização e gravidade das lesões. O IH de brânquia (IH_B) foi calculados de acordo com Cerqueira & Fernandes (2002) modificado a partir de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994). O IH de fígado (IH_F) foi calculado de acordo com Camargo & Martinez (2007). As histopatologias em cada órgão foram classificadas em estágios (S) progressivos no tecido: histopatologias SI, que não alteram o funcionamento normal do tecido; SII, que são mais graves e interferem no funcionamento do tecido; e estágio SIII, danos muito graves e irreparáveis. O IH foi calculado a partir da soma dos tipos de lesão para cada um dos três estágios e multiplicado pelo índice do estágio utilizando a seguinte equação proposta por Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994):

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

Onde a = histopatologias de estágio um (SI), b = histopatologias de estágio dois (SII) e c = histopatologias de estágio três (SIII). Um índice médio dos 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 para moderados ao órgão; valores entre 21 e 50 indicam danos moderados para severos, valores entre 51 e 100 indicam lesões severas e valores acima de 100 indicam danos irreversíveis para o órgão (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994).

2.5 Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas após avaliação dos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Levene).

Para comparar as variáveis físicas e químicas entre os riachos foi realizada análise de variância fator único (ANOVA) ($p < 0,05$), seguido do teste *pos-hoc* Fisher.

Para comparar o índice histopatológico (IH) de *Astyanax bifasciatus* em ambientes com diferentes usos e ocupação do solo, foi realizada análise não paramétrica Kruskal-Wallis, assumindo um nível de significância de 0,05. Em seguida, foi realizado teste *post-hoc* de comparação múltipla das médias para todos os grupos para verificar possível diferença entre os grupos.

Para sumarizar a relação entre as histopatologias de brânquia e fígado com as variáveis ambientais nos ambientes com diferentes usos e ocupação do solo, foi realizada a Análise de Correspondência Canônica – ACC. Nessa análise os eixos da ordenação são combinações lineares das variáveis ambientais em gradiente conhecido *a priori* (riachos com diferentes usos e ocupação do solo) e as abundâncias (frequência de histopatologias), consideradas como sendo respostas ao gradiente (Legendre & Legendre 1998). A análise Kruskal-Wallis foi realizada no programa STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., 2004) e a ACC no programa Past 2.14 (Hammer, et al., 2001).

3. Resultados

3.1 Parâmetros físicos e químicos da água

As variáveis ambientais físicas e químicas da água apresentaram diferenças significativas entre os riachos amostrados ($p < 0,05$). Temperatura, oxigênio dissolvido (OD), condutividade e turbidez foram as que mais diferenciaram os grupos de riachos.

Para a temperatura, de forma geral, os riachos florestados apresentaram os menores valores. Os maiores valores de OD e menores valores de condutividade foram registrados nos riachos florestados. A turbidez destaca-se com maior valor no riacho U2 (Tabela 2).

Table 2 - Caracterização física e química da água nos riachos com diferentes usos e ocupação do solo na Bacia do Baixo rio Iguaçu. TE= Temperatura; OD= Oxigênio dissolvido; CO= Condutividade; TU= Turbidez; F = Florestado; R = Rural; U = Urbano. As letras representam diferença estatística (ANOVA One-way, pos-hoc Fisher).

Streams	pH	TE (°C)	DO (mg/L ⁻¹)	CO (µS cm ⁻¹)	TU (mg/L de SiO ₂)
F1	7,19 ^{bc}	20,2 ^b	7,3 ^a	13,1 ^d	3,14 ^b
F2	7,01 ^{ac}	21,3 ^{ab}	6,81 ^b	27,8 ^c	2,8 ^c
R1	7,21 ^{bc}	23,5 ^c	5,77 ^d	50,1 ^b	2,1 ^d
R2	6,92 ^a	24,2 ^c	5,72 ^d	67,9 ^e	2,3 ^d
U1	7,13 ^{bc}	24,1 ^c	5,61 ^d	146,6 ^a	2,24 ^d
U2	7,32 ^b	22,9 ^{ac}	6,2 ^c	68,6 ^e	10,8 ^a
<i>p</i> value	0,004	0,006	<0,0001	<0,0001	<0,0001
F	6,1537	5,6724	116,05	726,92	1591,8

3.2 Histopatologias na brânquia e fígado

A estrutura geral das brânquias de *Astyanax bifasciatus* é formada por oito arcos branquiais dispostos lateralmente na cavidade orofaríngea protegida pelo opérculo, onde em cada arco branquial estão dispostos os filamentos branquiais e acima e abaixo desses as lamelas, onde ocorrem as trocas gasosas (Figura 2A). As histopatologias mais frequentes registradas nesse estudo foram, edema lamelar nos peixes de todos os riachos, aneurisma lamelar e hiperplasia de células de cloreto nos peixes dos riachos rurais e urbanos (Figura 2B, C, G), seguidas por hiperplasia lamelar e hiperplasia de células de muco nos peixes do riacho urbano 2 (U2) (Figura 2D, G). Fusão parcial de lamelas e ruptura de epitélio e hemorragia foram observadas em menos de 10% dos

peixes em todos os riachos (Figura 2E, F). A menor frequência de histopatologias foi registrada nas brânquias dos animais dos riachos considerados florestados. Não foram encontradas necrose, fusão total de lamelas e hipertrofia lamelar nos animais analisados (Tabela 3). O índice histopatológico de brânquia (IH_B) foi maior que 10, o que indica danos leves para moderados ao órgão, somente nos peixes dos riachos rurais e urbanos, diferindo dos peixes dos riachos florestados ($H = 27,55771$; $p = 0,00001$) (Figura 4).

O aspecto geral do tecido hepático normal de *A. bifasciatus* é constituído por um parênquima que compreende hepatócitos dispostos em um padrão circular, formando uma estrutura de cordão acompanhando os vasos sinusóides (Figura 3A, B). As histopatologias hepáticas mais frequentes visualizadas foram congestão vascular e vacuolização citoplasmática, ambas nos peixes dos riachos rurais e urbanos (Figura 3D, G). As maiores frequências de histopatologias foram observadas nos peixes dos riachos urbanos, seguidos dos rurais. Não foi registrado necrose em nenhum peixe analisado (Tabela 3). Verificou-se diferenças significativas entre o IH_F dos riachos florestados quando comparado com os demais ($H = 21,39156$; $p = 0,00001$) (Figura 5). Os peixes dos riachos rurais (R) apresentaram IH_F de 12, indicando danos leves para moderado ao órgão, enquanto que para os peixes dos riachos urbanos (U) foi de 27, considerado como danos teciduais de moderados à severos.

Table 3 – Histopatologia em brânquia e fígado de *Astyanax bifasciatus* amostrados em diferentes riachos com diferente uso e ocupação do solo na bacia do Rio Iguaçu. F = Florestado; R = Rural; U = Urbano. 0 Ausente; 0+ raramente presente; + presente; ++ frequente; +++ muito frequente.

Histopatologias	Estágio	Riachos amostrados					
		5,4-9,9cm	5,6-8,9cm	4,6-7,7cm	5,0-6,3cm	3,0-3,2cm	5,1-8,4cm
		2,35-18,44g	3,91-15,52g	1,89-9,28g	2,1-5,87g	0,46-0,9g	2,44-12,07g
		F1	F2	R1	R2	U1	U2
<i>Brânquia</i>							
Edema lamelar	I	+	0+	++	0+	0+	+
Hipertrofia lamelar	I	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia lamelar	I	0	0	0	0	0	0+
Fusão parcial de lamela	I	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia de células de muco	I	0	0	0	0	0	0+
Hiperplasia de células de cloreto	I	0	0	0+	0+	0+	+
Ruptura de epitélio e hemorragia	II	0	0	0	0	0	0
Fusão total de lamela	II	0	0	0	0	0	0
Aneurisma lamelar	II	0	0	0+	0+	0+	0+
Necrose	III	0	0	0	0	0	0
<i>Fígado</i>							
Hipertrofia nuclear	I	0	0	0	0	0	0
Núcleo em posição lateral	I	0	0	0	0+	0	0+
Vacuolização citoplasmática	I	0	0	0+	+	0+	+++
Agregado de melanomacrófagos	I	0	0	0	0	0	0
Infiltração leucocitária	I	0	0	0	0	0+	0+
Degeneração citoplasmática	II	0	0	0	0	0	0+
Congestão vascular	II	0	0	0+	0	0+	0+
Núcleo picnótico	II	0	0	0	0	0	0
Necrose	III	0	0	0	0	0	0

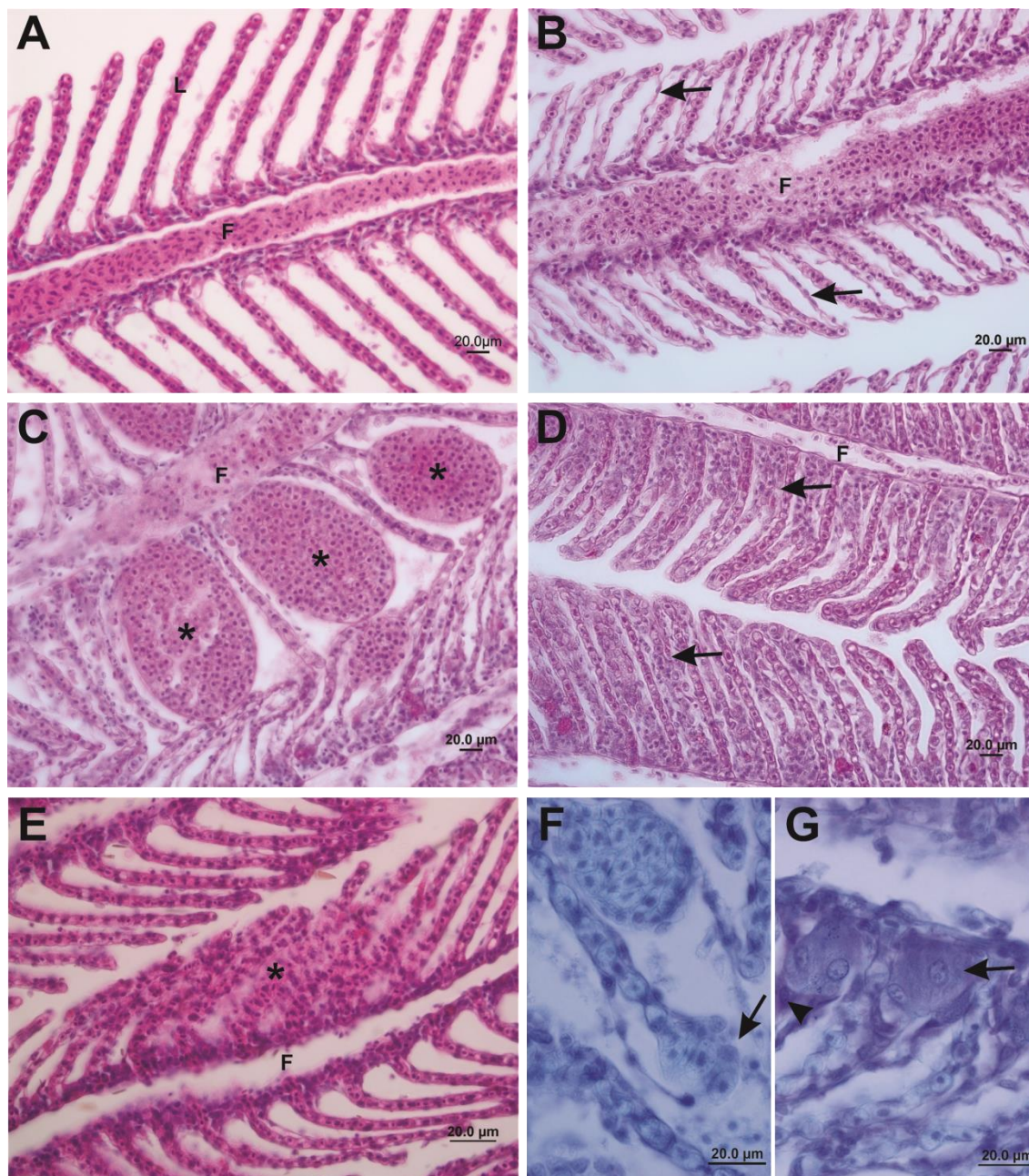


Figure 2 - Fotomicrografia de brânquia de *Astyanax bifasciatus* amostrados em riachos da bacia do Baixo Rio Iguaçu. A- Aspecto normal da brânquia, *F* – Filamento, *L* – Lamela. B- Edema (setas). C- Aneurisma lamelar (*). D- Hiperplasia lamelar (setas). E- Fusão parcial de lamela (*). F- Ruptura de epitélio e hemorragia (seta). G- Células de cloreto (seta) e células de muco (cabeça de seta). Coloração Hematoxilina de Harris e Eosina e Azul de Toluidina.

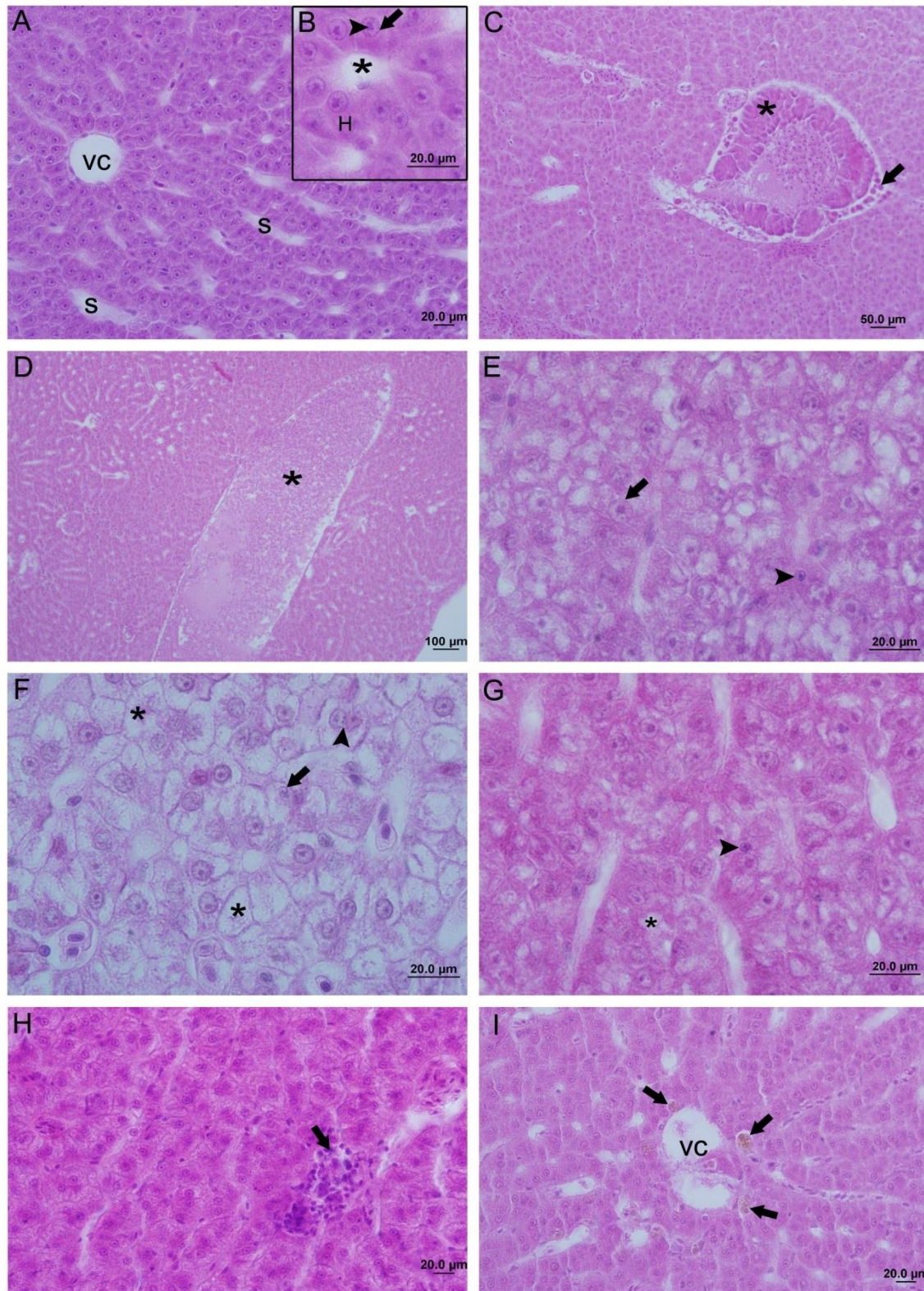


Figure 3. Fotomicrografia de fígado de *Astyanax bifasciatus* amostrados em riachos da bacia do Baixo Rio Iguaçu. A- Fígado normal, veia central (VC) e capilares sinusóides (S). B- Observe o arranjo tubular dos hepatócitos (H) núcleo (seta), nucléolo (cabeça de seta) e lúmen do canalículo biliar (*); C- Tecido pancreático (*), presença de neutrófilos ao redor do tecido hepatopancreático (seta). D- Presença de congestão vascular no interior do fígado (seta). E- Presença de núcleo picnótico (cabeça de seta) e hipertrofia nuclear (seta). F- Degeneração citoplasmática (*), núcleo picnótico (seta), núcleo em posição lateral (cabeça de seta). G- Núcleo picnótico (cabeça de seta) e vacuolização citoplasmática (*). H- Infiltração leucocitária (seta). I- Agregados de melanomacrófagos (*) ao redor da veia central (VC). Coloração Hematoxilina Harris e Eosina.

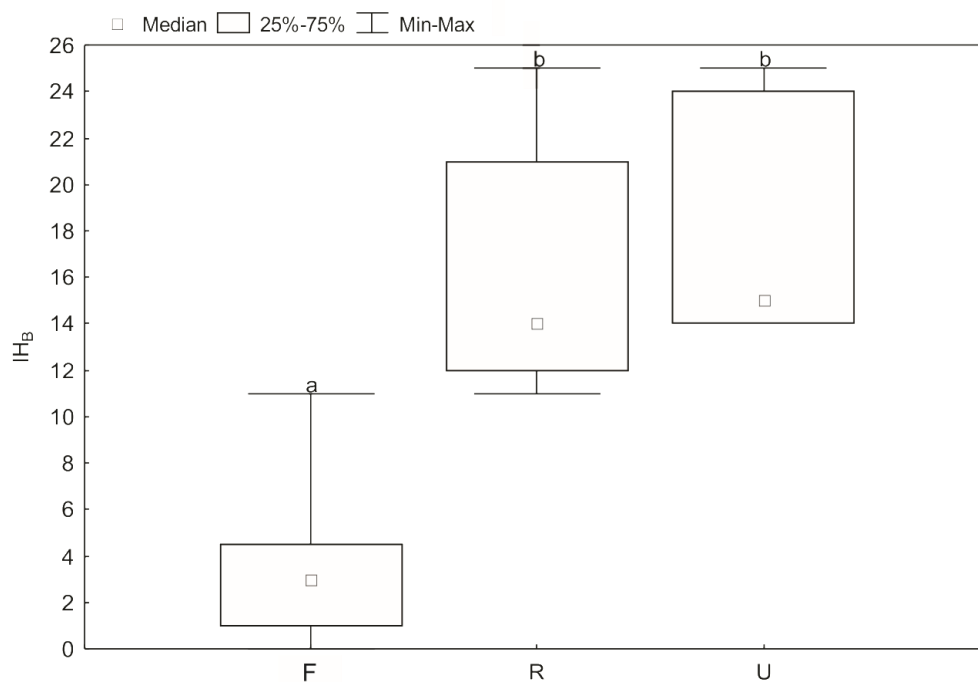


Figure 4 – Índice histopatológico em brânquia (IH_B) de *Astyanax bifasciatus* para os diferentes ambientes amostrados na bacia do Baixo Rio Iguaçu. F – Florestado; R – Rural; U – Urbano. As letras representam diferença estatística.

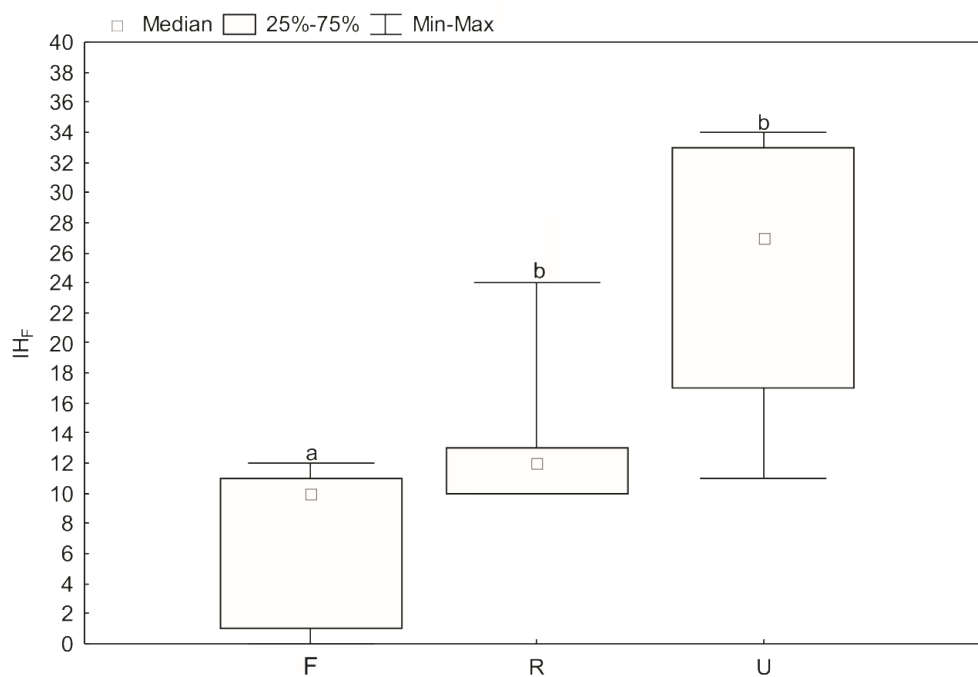


Figure 5 – Índice histopatológico em fígado (IH_F) de *Astyanax bifasciatus* em riachos com diferentes usos e ocupação do solo na bacia do Baixo Rio Iguaçu. F = Florestado; R = Rural; U = Urbano. As letras representam diferença estatística.

4. Discussão

As evidentes diferenças entre a frequência e severidade das histopatologias observadas nos diferentes ambientes aqui analisados, ratifica o uso desses biomarcadores na avaliação da qualidade ambiental de riachos. Tecidos de brânquia e fígado de peixes têm sido utilizados como ferramenta para análise de respostas biológicas em estudos recentes (Greenfield et al., 2008; Paulino et al., 2014; Reiser et al., 2010; Shiogiri et al., 2012; Sinha et al., 2014; Vasanthi et al., 2013). Esses órgãos alvos são biomarcadores da exposição a estressores ambientais que sinalizam os efeitos resultantes de um ou mais agentes contaminantes (Carvalho-Neta et al., 2012; Nogueira et al., 2008; Santos et al., 2012).

A maior ocorrência e frequência de histopatologias como edema lamelar, hiperplasia de células de cloreto e aneurisma lamelar em brânquias de peixes dos riachos rurais (R1, R2) e urbanos (U1, U2), demonstram possíveis efeitos de contaminantes como defensivos agrícolas e esgoto doméstico, oriundos das monoculturas e moradias presentes no entorno. O edema lamelar resulta no destacamento do epitélio da lamela, que ocorre por alteração na estrutura de membrana das células (Zaconeg et al., 1985; Gardner & Yevich 1970). Hiperplasia de células de cloreto é uma resposta do animal quanto às flutuações dos parâmetros físicos, químicos e biológicos do ambiente aquático (Reis et al., 2009). Ambas as histopatologias reduzem o espaço entre as lamelas o que resulta no aumento da distância de difusão da água com o sangue. O Aneurisma lamelar ocorre devido a ruptura de células pilares (Heath, 1987), com a consequente perda de sua função de apoio (Garcia-Santos et al., 2006). Essa histopatologia pode ser causada por ação de contaminantes presentes na água (Camargo et al., 2007; Paulino et al., 2014), e sob exposição crônica, leva a

ruptura do epitélio e hemorragia, afetando as trocas gasosas nas brânquias (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994).

Todas essas histopatologias podem ocorrer para minimizar a absorção de poluentes presentes na água (Cerqueira & Fernandes, 2002; Mallat, 1995), sendo uma resposta comum a uma grande classe de contaminantes, como organofosforados e metais pesados, bem como a elevada presença de matéria orgânica suspensa na coluna de água. Aqui nesse estudo, os maiores valores do IH_B , representando histopatologias de estágio I e II em riachos rurais e urbanos, indicam danos leves para moderados ao órgão. Esses registros apontam para uma pior qualidade da água, corroborando uma possível maior exposição desses peixes a variados poluentes nos ambientes com maior uso e ocupação antrópica. Essa hipótese ganha apoio, uma vez que nos pontos florestados a frequência dessas histopatologias foi significativamente menor. Resultados semelhantes foram registrados em vários estudos com peixes em rios (Abdel-Moneim et al., 2012; Camargo & Martinez, 2007; Dey et al., 2015; Ileana et al., 2012; Montes et al., 2015) e reservatórios (Cerqueira & Fernandes, 2002; Nero et al., 2006; Paulino et al., 2014; Poleksic et al., 2010).

As brânquias estão em contato direto com a água, bem como, com os poluentes, fazendo com que as histopatologias sejam um indicativo de impacto. Entretanto, esse indicativo ocorre de maneira inespecífica, uma vez que não é possível afirmar qual foi o agente tóxico responsável. Nesse sentido, as histopatologias nas brânquias observadas nesse estudo, principalmente de estágio II nos riachos rurais e urbanos, são inespecíficas, mas possivelmente relacionadas com a redução da resistência imunológica (Freire et al., 2015), uma vez que baixos níveis de oxigênio dissolvido (OD), baixo pH ou alterações na qualidade da água causam estresse ao peixe, diminuindo sua resistência. Essas alterações fisiológicas potencializam a ação dos

contaminantes presentes no ambiente aquático, aumentando a presença e frequência de histopatologias (Tavares-Dias, 2009).

O fígado desempenha inúmeras funções vitais ao organismo, como síntese de proteínas e armazenamento de glicogênio (Heath, 1987) e constitui o principal centro de detoxificação (Heath, 1987; Takashima & Hibiya, 1995). As histopatologias vacuolização citoplasmática, congestão vascular, núcleo em posição lateral e infiltração leucocitária foram as mais comuns no fígado de *A. bifasciatus*, especialmente nos ambientes mais antropizados. Assim, estas histopatologias no fígado dos peixes podem levar a complicações severas ao metabolismo do organismo, sendo um indicador de exposição à toxinas presentes no ambiente aquático (Boran et al., 2010).

A vacuolização citoplasmática resulta da metabolização anormal de lipídeos, associada com a inibição da síntese protéica e desagregação de microtúbulos, sendo que em estágios mais avançados há o deslocamento do núcleo para periferia. Esta variação metabólica pode estar relacionada com a falha das funções de metabolização e excreção de substâncias no fígado (Lee et al., 2012), devido a combinação de agentes tóxicos com os lipídios intracitoplasmáticos (Rodrigues & Fanta, 1998), sugerindo uma maior demanda de energia para o reparo dos danos causados pelos poluentes (Lee et al., 2012).

A congestão vascular é uma histopatologia definida pelo acúmulo de sangue, que causa dilatação dos vasos sanguíneos, diminuindo a velocidade da circulação no local (Roberts, 1989; Verlag, 1982). A infiltração leucocitária indica sinais de inflamação e hipersensibilidade a agentes tóxicos, e a elevada presença de leucócitos é uma importante resposta diante de qualquer efeito prejudicial que esteja ocorrendo no tecido. Essas histopatologias podem ocorrer na presença de agentes tóxicos, gerando um aumento da irrigação do tecido e elevando a quantidade de células do sistema imune circulantes no local afetado (Santos et al., 2004; Santos, 2009; Tripathi & Srivastav,

2010). A invasão de leucócitos observada no fígado de *A. bifasciatus* nesse estudo indica relação com as demais histopatologias, agindo como resposta do organismo à presença de lesões hepáticas.

A degeneração citoplasmática leva à perda da forma poligonal dos hepatócitos, causando o desarranjo na estrutura cordonal, o que pode levar a degeneração e a redução da célula, causando prejuízos funcionais e estruturais no fígado de peixes (Stentiford et al., 2003). Essa histopatologia pode indicar disfunções induzidas por algum agente tóxico, uma vez que áreas metabolicamente ativas do fígado ficam restringidas, levando a uma possível redução geral nas funções desempenhadas por este órgão (Hinton et al., 1992; Teh et al., 1997). A ocorrência e maior frequência dessa histopatologia apenas nos fígados dos peixes do riacho U2, indica menor qualidade da água nesse ambiente. Essa hipótese ganha sustentação uma vez que a degeneração citoplasmática, considerada uma alteração de estágio II, implica em comprometimento das funções do órgão.

Os valores de IH_F mais elevados nos peixes amostrados em riachos rurais e urbanos robustecem os efeitos de diferentes tipos de efluentes resultantes dos variados usos e ocupação do solo na área do entorno. Essas afirmações corroboram com as de Suiçmez et al. (2006) e Hued et al. (2012), que observaram histopatologias em fígado de peixes expostos a contaminantes comuns em águas residuais e defensivos agrícolas.

Uma vez que os agentes tóxicos são metabolizados no fígado, as possíveis alterações nesse órgão dependem do tipo de poluente, concentração e tempo de exposição (Fernandes et al., 2008; Corbett et al., 2014). Assim, a maior frequência de histopatologias, bem como maior IH_F , nos pontos urbanos em relação aos rurais, podem estar relacionados não somente com os diferentes tipos de poluentes presentes no esgoto doméstico, mas principalmente com a descarga e exposição contínua. Nesse sentido, os

maiores valores e severidades de histopatologias (estágio II), no fígado em comparação com a brânquia, podem ser explicados pela função fundamental de detoxicação do órgão. Outros estudos realizados por Camargo & Martinez (2007), Raškovic et al. (2014) e Santos et al. (2014), corroboram e enfatizam a ação dos agentes tóxicos presentes em ambientes mais atropizados, sobre a saúde dos peixes.

A sumarização conjunta das histopatologias e suas relações com as variáveis ambientais nos riachos com diferentes usos e ocupação do solo, suporta a inferência de que a descarga constante de efluentes por meio de águas residuais nos riachos rurais e urbanos interfere de forma crônica na saúde dos peixes. Essa hipótese ganha suporte pela maior ocorrência de histopatologias hepáticas de estágio I e II, nos pontos urbanos.

Ressalta-se que as alterações como presença de núcleo em posição lateral, vacuolização citoplasmática, núcleo picnótico e degeneração citoplasmática, que foram as mais observadas nesses ambientes, são consideradas mais graves e comprometem o funcionamento do tecido.

A menor relação dos riachos rurais com histopatologias moderadas e severas (escores negativos da ACC) pode ser explicada pela menor frequência de contaminantes oriundos da área de entorno. Isso se justifica porque a principal fonte poluidora nesses ambientes, como os defensivos agrícolas, ocorre de forma descontínua, seguindo a sazonalidade e períodos do cultivo, que na região do estudo tem como principal representante a cultura de soja e milho (IPARDES, 2013). Além disso, o contato desses efluentes com os corpos de água ocorre de forma indireta, especialmente naqueles que ainda mantêm áreas de vegetação ciliar. Nesse sentido, esses poluentes provavelmente alcançam os corpos hídricos em baixas concentrações. Por outro lado, os efluentes urbanos atingem de forma direta e contínua os riachos, afetando mais severamente os peixes desses locais.

Em conclusão, nesse estudo, verificamos que o uso das histopatologias de brânquia e fígado de *Astyanax bifasciatus* como biomarcadores foi eficaz para uma análise preditiva da qualidade do ambiente aquático dos riachos estudados. As histopatologias mais severas como, aneurisma, núcleo picnótico, degeneração e vacuolização citoplasmática encontradas nos peixes dos riachos rurais e urbanos, correlacionadas com os dados abióticos evidenciam a baixa qualidade da água desses ambientes, indicando a provável presença de poluentes nesses riachos e corroborando com nossa hipótese. Sendo assim, constituem excelentes ferramentas em estudos de biomonitoramento na bacia do baixo rio Iguaçu, que apresenta uma fauna endêmica relevante.

5. Referências

- Abdel-Moneim, A.M., Al-Kahtani, M.A., Elmenshawy, O.M. 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*. 88, 1028-1035.
- Abell, R., Thieme, M.L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad, B., Mandrak, N., Balderas, S.C., Bussing, W., Stiassny, M.L.J., Skelton, P., Allen, G.R., Unmack, P., Naseka, A., Ng, R., Sindorf, N., Robertson, J., Armijo, E., Higgins, J.V., Heibel, T.J., Wikramanayake, E., Olson, D., López, H.L., Reis, R.E., Lundberg, J.G., Pérez, M.H.S., Petry, P. 2008. Freshwater ecoregions of the world: A new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *Bioscience*. 58(5): 403-414.
- Adams, M. 2002. Biological Indicators of aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society. 656pp.
- Agostinho, A.A., Thomaz, S.M., Gomes, L.C. 2005. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conservation Biology* Blakwel. 19(3): 646-652.
- Ayadi, I., Monteiro, S.M., Regaya, I., Coimbra, A., Fernandes, F., Oliveira, M.M., Peixoto, F., Mnif, W. 2015. Biochemical and histological changes in the liver and gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to Red 195 dye. *RSC adv.* 5, 87168-87178.
- Bainy, A.C.D., 1993. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. *Ciência e Cultura*. 45, 10-11.
- Baumgartner, G., Pavanelli, C.S., Baumgartner, D., Bifi, A.G., Debona, T., Frana, V.A. 2012. Peixes do baixo rio Iguaçu. EDUEM, Maringá, 224pp.
- Boran, H., Altinok, I., Capkin, E., 2010. Histopathological changes induced by maneband carbaryl on some tissues of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Tissue Cell*. 42, 158-164.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in na urban stream. *Neotropical Ichthyology*. 5(3): 327-336.
- Carvalho-Neta, R. N. F.; Torres, A. R.; Abreu-Silva, A. L. 2012. Biomarkers in Catfish *Sciadesherzbergii* (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos Bay, Northeastern Brazil). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, New Jersey. 166, 1-12.
- Cerqueira, C.C.C. Fernandes. M.N. 2002. Gill Tissue Recovery after Copper Exposure and Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 52, 83-91.

Chiesse, J.S. 2010. Biomarcadores morfológicos e análise química dabile em peixes para a avaliação da qualidade da água do rio Iguaçu. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná –UFPR. Curitiba, Paraná. 69pp.

Collen, B., Whitton, F., Dyer, E.E., Baillie, J.E.M., Cumberlidge, N., Darwall, W.R.T., Pollock, C., Richman, N.I., Soulsby, A.M., Böhm, M. 2014. Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism. 23, 40-51.

Corbett, P.A., King, C.K., Stark, J.S., Mondon, J.A. 2014. Direct evidence of histopathological impacts of wastewater discharge on residente Antarctic fish (*Trematomus bernacchii*) at Davis Station, East Antarctica. Marine Pollution Bulletin. 87, 48-56.

Dane, H., Sisman, T. 2015. Histopathological Changes in Gill and Liver of *Capoeta capoeta* living in the Karasu River, Erzurum. Environmental Toxicology. DOI 10.1002/tox.

Delariva, R.L., Hahn, N.S., Kashiwaqui, E.A. 2013. Diet and trophic structure of the fish fauna in a subtropical ecosystem: impoundment effects. Neotropical ichthyology, 11(4): 891-904.

Dey, S., Rajguru, U., Pathak, D.C., Goswami, U.C. 2015. Analysis of Gill Structure from a Fresh Water Fish (*Heteropneustes fossilis*) Exposed to Bleached Sulfite Pulp Mill Effluents. Microsc. Microanal. 21, 385-391.

Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I. Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. Biol. Rev. 81, 163-182.

Dyk, J.C., Pieterse, G.M., Van Vuren, J.H.J. 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cádmium and zinc. Ecotoxicology and Environmental Safety. 66, 432-440.

Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E., Salgado, M. A. 2008. Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. Environ Monit Assess. 145, 315-322.

Flores-Lopes, F., Cetra, M., Malabarba, L.R. 2010. Utilização de índices ecológicos em assembleias de peixes como instrumento de avaliação da degradação ambiental em programas de monitoramento. Biota Neotropica. 10 (4): 183-193.

Freire, C.A., Souza-Bastos, L.R., Chiesse, J., Tincani, F.H., Piancini, L.D.S., Randi, M.A.F., Prodócimo, V., Cestari, M.M., Silva-de-Assis, H.C., 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. 22, 13263-13277.

Fuentes-Rios, D., Orrego, R.; Rudolph, A., Mendoza, G., Gavilan, J.F., Barra, R. 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot

1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere*. 61(2): 192-199.

Garcia-Santos S., Fontainhas-Fernandes A., Wilson J.M. 2006. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ. Toxicol.* 21(6):33- 46.

Gardner, R., Yevich, P. P. 1970. Histological and hematological responses of an estuarine teleost to cadmium. *J. Fisheries Res. Board Can.* 27, 2185-2196.

Garmendia, L., Soto, M., Cajarville, M. P., & Marigómez, I. 2010. Seasonality in cell and tissue-level biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: Relevance for long-term pollution monitoring. *Aquatic Biology*. 9(3): 203–219.

Gomes, I.D., Nascimento, A.A., Sales, A., Araújo, F.G. 2012. Can fish fill anomalies be used to assess water quality in freshwater Neotropical systems?. *Environ. Monit. Assess.* 184, 5523-5531.

Greenfield, B.K., Teh, S.J., Ross, J.R.M., Hunt, J., Zhang, G.H., Davis, J.A., Ichikawa, G., Crane, D. Hung, S.S.O., Deng, D.F., Teh, F.C., Green, P.G. 2008. Contaminant concentrations and histopathological effects in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 55(2): 270-281.

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*. Boca Raton, CRC Press. 384pp.

Hesni, M.A., Savari, A., Sohrab, A.D., Mortazavi, M.S. 2011. Gill Histopathological changes in Milkfish (*Chanos chanos*) exposed to acute toxicity of diesel oil. *World Applied Sciences Journal*. 14(10): 1487-1492.

Hinton, D.E., Segner, H., Braunbeck T. 2001. Toxic responses of the liver. In: Schlegel D, Benson WH (eds) *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*. Taylor & Francis, Boca Raton. 224–268.

Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihira, M.S. *Histopathologic Biomarkers*. In: Huggett R.J., Kimerli, R.A., Mehrle Jr, P.M., Bergman, H.L. 1992. *Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Boca Raton: Lewis Publishers. 4, 155 –196.

Hued, A.C., Oberhofer, S., Bistoni, M.A. 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.

IBGE. 2008. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Indicadores de desenvolvimento sustentável*. Brasília. 472.

IBGE. 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades do Paraná. in: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=41&search=parana>.

Ilena, C. Troncoso, H.C., Cazenave, J., Bacchetta, C., Bistoni, M.A. 2012. Histopathological changes in the gills and liver os *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Fish Physiol Biochem.* 38: 693-702.

IPARDES. 2013. Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do estado do Paraná. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Curitiba. 245.

Jordao, C.P., Pereira, M.G., Bellato, C.R., Pereira, J.L., Matos, A.T. 2002. Assessment of water systems for contaminants from domestic and industrial sewages. *Environ Monit Assess.* 79, 75–100.

Kock G, Triendl M, Hofer R. 1996. Seasonal patterns of metal accumulation in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from an oligotrophic Alpine lake related to temperature. *Can J Fish Aquat Sci.* 53, 780–786.

Lee, J.W., et al. 2012. Histopathological alterations of juvenile green (*Acipenser medirostris*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) exposed to graded levels of dietary methylmercury. *Aquatic Toxicology.* 109, 90-99.

Legendre, P., Legendre, L. 1998. *Numerical Ecology*, 2nd English ed. Elsevier, 853 pp.

Lins, J.A.P.N., Kirschnik, P.G., Queiroz, V.S., Cirio, S.M. 2010. Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment. *Ver. Acad. Ciênc. Agrár., Curitiba.* 8(4): 469-484.

Mallat, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 630.

Miranda, J.C. 2012. Ameaças aos peixes de riachos da Mata Atlântica. *Natureza on line* 10(3): 136-139.

Montes, C.S., Ferreira, M.A.P., Santos, S.S.D., Rocha, R.M. 2015. Environmental quality of na estuary in Amazon delta using immunohistochemical and porphological analyses of gill as biomarkers. *Acta Scientiarum Biological Science.* 37(1): 113-121.

Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van Der Kraak, G., Lee, L.E.J., Van Meer, T., MacKinnon, M.D., Dixon, D.G. 2006. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 63, 365-377.

Nogueira, C., Buckup, P.A., Menezes, N.A., Oyakawa, O.T., Kasecker, T.P., Neto, M.B.R., da Silva, J.M.C. 2010. Restricted-Range fishes and the conservation of Brazilian freshwaters. *Plos one.* 5(6): e11390.

Nogueira, D.J., Castro, S.C., Sá, O.R. 2008. Avaliação da qualidade da água no reservatório UHE Furnas-MG, utilizando as brânquias de *Pimelodus maculatus*

(LACÈPÈDE, 1803) como biomarcador de poluição ambiental. *Ciência et Praxis*, Passos.1, 15-20.

Nunes, B., Antunes, S.C., Gomes, R., Campos, J.C., Braga, M.R., Ramos, A.S., Correia, A.T. 2015. Acute effects of Tetracycline exposure in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*: Antioxidant effects, Neurotoxicity and Histological alterations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 371-381.

Oliveira-Ribeiro C.A., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H. 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquat Toxicol.* 74, 53-69.

Paulino, M.G., Benze, T.P., Sadauskas-Henrique, H., Sakuragui, M.M., Fernandes, J.B., Fernandes, M.N. 2014. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Science of the total environment.* 497-498, 293-306.

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.* Oxford, Fishing News Books.

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).

Rašković, B., Poleksić, V., Višnjić-jeftić, Z., Skorić, S., Gačić, Z., Djikanović, V., Jarić, I., Lenhardt, M. 2014. Use of histopathology and elemental accumulation in different organs of two benthophagous fish species as indicators of river pollution. *Environmental Toxicology.* 30(10): 1153-61.

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*). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 29(4): 303-311.

Reiser, S., Schoroeder, J.P., Wuertz, S., Kloas, W., Hanel, R. 2010. Histological and physiological alterations in juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.) exposed to sublethal concentrations of ozone-produced oxidants in ozonated seawater. *Aquaculture.* 307(1-2): 157-164.

Roberts, R. J. 1989. *Fish pathology.* 2^o Ed. London: Braillière Tindall, 467p.

Rodrigues, E.L., Fanta, E. 1998. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoato 500. *Revista Brasileira de Zoologia.* 15, 441-450.

Samanta, P., Bandyopadhyay, N., Pal, S., Mukherjee, A.K., Ghosh, A.R. 2015. Histopathological and ultramicroscopical changes in gill, liver and kidney of *Anabas testudineus* (Bloch) after chronic intoxication of almix (metsulfuron methyl 10.1% +

chlorimuron ethyl 10.1%) herbicide. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 122, 360-367.

Santos, D.M.S., Melo, M.R.S., Mendes, D.C.S., Rocha, I.K.B.S., Silva, J.P.L., Cantanhêde, S.M., Meletti, P.C. 2014. Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 11, 12927-12937.

Santos, D.R. 2013. Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de peixes à poluição aquática nos reservatórios do Iraí e Passaúna. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, Paraná. 92pp.

Santos, D.M.S., Cruz, C.F., Pereira, D.P., Alves, L.M.C., Moraes, F.R. 2012. Qualidade microbiológica da água e histopatologia de brânquias de peixes provenientes de pisciculturas do município de Itaipuru-Mirim-Maranhão. *Acta Scientiarum Biological Sciences (Online)*, Maringá. 34, 199-205.

Santos, D.C.M. 2009. Toxidez aguda do zinco em lambari *Astyanax aff. bimaculatus* (Linnaeus,1758). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 115p.

Santos, A.A., Ranzani-Paiva, M.J.T., Felizardo, N.N., Rodrigues, E.L. 2004. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*. 30(2): 141-145.

Schwaiger, J, Wanke, R, Adam, S, Pawert, M, Wolfgang, H, Triebkorn, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J Aquat Ecosyst Stress Recov*. 6, 75–86.

SEMA. 2010. Bacias hidrográficas do Paraná – Série Histórica. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Curitiba.

Shiogiri, N.S., Paulino, M.G., Carraschi, S.P., Baraldi, F.G., Cruz, C., Fernandes, M.N. 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 34, 388-396.

Silva, M.R., Campos, A.C.E., Bohm, F.Z., 2013. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*. 8(2): 46-58.

Sinha, A. K., Matey, V., Giblen, T., Blust, R., De Boeck, G.2014. Gill remodeling in three freshwater teleosts in response to high environmental ammonia. *Aquatic Toxicology*. 155, 166-180.

Statsoft Inc. Statistica (data analysis software system), version 7.0. Tulsa. 2004. Available at: <http://www.statsoft.com>.

Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W. 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*. 55, 137–159.

Strahler, A.N. 1957. Quantitative Analysis of Watershed Geomorphology. American Geophysical Union. 38(6): 913-920.

Suiçmez, M., Kayım, M., Köseoğlu, D., Hasdemir, E. 2006. Toxic effects of lead on the liver and gills of *Oncorhynchus mykiss* WALBAUM 1792. *Bull. Environ. Contami. Toxicol.* 77, 551–558.

Tabassum, H., Ashafaq, M., Khan, J., Shah, M.D.Z., Raisuddin, S., Parevez, S. 2016. Short term exposure of pendimethalin induces biochemical and histological perturbations in liver, kidney and gill of freshwater fish. *Ecological Indicators*. 63, 29-36.

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

Tavares-Dias, M. 2009. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Embrapa Amapá, Macapá.

Teh, S.J., Adams, S.M., Hinton, D.E. 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*. 37, 51 – 70.

Tripathi, S., Srivastav, A.K. 2010. Liver profile of rats after long-term ingestion of different doses of chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 97, 60-65.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13, 57–149.

Vasanthi, L.A., Revanthi, P., Mini, J., Munuswamy, N. 2013. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. *Chemosphere*, v. 91, n. 8, p. 1156-1164.

Verlag, G. F. 1982. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Tokyo: Kodansha. 147p.

Zaccone, G.S., Fasulo, P., Lo Cascio, Licata, A. 1985. Patterns of enzyme activity in the gills of the catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) exposed to anion-active detergent N-alkyl-benzene sulphonate (LAS). *Histochemistry*. 82, 341-343.