



/INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DE BRÂNQUIAS DE *Heptapterus mustelinus*
(Valenciennes 1835) COLETADOS EM RIACHOS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO
PARANÁ 3**

GIOVANNI LUCIANO SANTANA PINHEIRO

Foz do Iguaçu
2022



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DE BRÂNQUIAS DE *Heptapterus mustelinus*
(Valenciennes 1835) COLETADOS EM RIACHOS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO
PARANÁ 3**

GIOVANNI LUCIANO SANTANA PINHEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade

Orientador: Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes

Foz do Iguaçu
2022

AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada gostaria de agradecer aos meus pais, Telma e Natalino pelo suporte desde o primeiro dia de minha vida até hoje, de inúmeras maneiras, por milhares de situações e nunca deixaram de me amar. Gostaria de agradecer aos meus avós Elvira (*in memoriam*) e Pedro pelo suporte na minha criação e pelos vários mimos (geralmente contrariando meus pais) que me davam, essas 2 pessoas são modelos de vida que sempre carregarei comigo. Também em prioridade máxima, deixo meu eterno agradecimento ao meu irmão Danilo, que acima de irmão mais velho é meu melhor amigo, conselheiro e sempre esteve comigo. Saiba que dou minha vida por você, bro. Agradeço também a minha cunhada Letícia que é uma pessoa muito virtuosa, inteligente e também nunca se negou em me ajudar, desejo tudo de melhor e considero você como uma irmã também. Aos meus parentes como um todo, cada um com suas características, que tornam minha família algo único.

Ao meu professor e orientador Pablo Nunes, que me aceitou como orientando mesmo que sua agenda estava cheia, me indicou para este projeto, começando na iniciação científica em 2019, e me forneceu suporte sempre que precisei tirar uma dúvida, solicitar algo ou qualquer outros motivos. Agradeço a pós-doutoranda Lígia, que entrou para o projeto e vem me ajudando muitíssimo, desde aspectos organizacionais até de conteúdos e conversas de laboratório. A todos os professores que me deram aulas nessa graduação, pelos momentos bons, engraçados e de desafios. Seguirei os passos das senhoras e senhores para manter a ciência viva, mesmo em situações difíceis e desfavoráveis, conforme vi neste período de curso. Vocês fizeram e fazem um trabalho espetacular.

Aos meus amigos da vida, Ângelo e Wilson, que são pessoas que tenho a amizade mais forte, e, mesmo à distância, mantemos nossas melhores conversas filosóficas, compartilhamos conquistas e sempre que possível, damos rolês insanos. Estaremos juntos no topo e tenho certeza que estaremos idosos e continuaremos amigos, mesmo caducos. Aos meus amigos Allan, Jefferson, Sander, Matheus, Urias, Pedro Afonso, Gregório, Gordo e vários outros que acumulei histórias engraçadas e passíveis de serem escritas em um livro. Vocês são sangue bom e também quero ver todos vencendo na vida. Aos meus veteranos do curso (são muitos, mas todos especiais) que me deram conselhos, ideias e transmitiam calma quando a situação dos semestres parecia ficar fora do controle. A todos meus colegas de classe que também fazem parte dessa mesma maratona que é a graduação e que compartilharam de momentos bons e outros nem tão bons durante todos esses anos.

Agradeço à Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) pelas oportunidades, infraestrutura e contato com tantas pessoas diferentes, de diferentes nacionalidades, que torna essa Universidade única, e sempre estará no meu coração. Também agradeço à Itaipu e ao PTI pela bolsa de iniciação científica, pelas oportunidades, financiamento em projetos e infraestrutura, sem essas 3 instituições nada disso seria possível.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma a chegar onde estou, acabo esquecendo de dar os agradecimentos em específico, já que minha memória a curto prazo não é tão boa. Enfim, esse é só o começo.

RESUMO

Com a agricultura moderna, estratégias como a aplicação de agrotóxicos para fins de aumento na produtividade final tem ganhado espaço no cenário agrícola. Entretanto, tais substâncias são tóxicas e, geralmente, não afetam de forma exclusiva os organismos-alvos. Os agrotóxicos, portanto, podem gerar danos em organismos aquáticos, se existir o contato de tais agentes com a água de certos ambientes. Dito isso, o objetivo deste trabalho foi analisar as brânquias do bagre-de-pedra, *Heptapterus mustelinus*, de maneira semiquantitativa através dos Índices Histológicos (I_{org} e $I_{org rp}$), e observar, comparar e buscar relacionar com os micropoluentes identificados por outros trabalhos na mesma região da Bacia Hidrográfica do Paraná 3. Para o estudo, utilizou-se as brânquias de 49 indivíduos coletados nos meses de fevereiro, abril e julho de 2019, classificados em três grupos relacionados ao uso de terra próximo ao riacho (A- baixo impacto, B- médio impacto e C- alto impacto). A análise foi feita através de um microscópio de luz e da coloração H.E., observando toda a região do corte na lâmina histológica, com diferentes pontuações obtidas através da observação da área da lesão e o fator de importância para cada alteração. Os resultados demonstraram não haver diferença significativa entre as médias dos 3 grupos (A, B e C) para todos os índices utilizados, além disso, nenhum indivíduo estava livre de lesões. Também se observou algumas alterações no formato de alguns núcleos que não foram descritas pela metodologia de Bernet *et al.* (1999). Por fim, foi possível concluir que a espécie *H. mustelinus* é uma espécie com biomarcadores de toxicidade na água e suas brânquias constituem um órgão eficiente para mensurar danos causados por agentes estressores. Mais trabalhos sobre os efeitos de poluentes devem ser feitos para elucidar a situação dos ambientes em questão, além de mais estudos também sobre as alterações teciduais observadas nas brânquias.

Palavras-chave: riachos; bagre-enguia; multi-estressor; ecotoxicologia; semi-quantitativa.

ABSTRACT

With modern agriculture, strategies like the application of pesticides to raise the final productivity has gained space in the agricultural scene. However, these substances are toxic and generally do not affect only the targeted organisms. These pollutants, therefore, can cause damage to aquatic organisms if the contact between these agents and the water happens. Having said that, the objective of this work was to analyze the gills of the weasel catfish, *Heptapterus mustelinus*, in a semi-quantitative way using the Histological Indexes (I_{org} and $I_{org\ rp}$), and to observe, compare and seek to relate with the micropollutants identified by other works in the same region of the Hydrographic Basin of Paraná 3. For this study, 49 gills of individuals collected in the months of February, April and July, classified in three groups based on the use of land next to the streams (A- low impact, B- medium impact and C- high impact), were used. The analysis was made on a light microscope and by using the H.E. staining method, trying to observe the area of lesion and the importance factor of each alteration. The results showed that there is no significant difference between the means of the three groups (A, B and C) for all the indexes used, and also, there was no individuals free from lesions. Plus, some changes that were observed, like the nuclear alterations were not described by the Bernet *et al.* (1999) methodology, used in this study. Finally, it was possible to conclude that the catfish species, *H. mustelinus*, is a good bioindicator of toxicity in water and the gills constitute an efficient organ to measure the damage caused by stressor agents. More study about the effects of pollutants is required to elucidate the situation of the environment in question, on top of more studies also about the tissue changes observed in gills.

Key words: streams; weasel catfish; multi-stressor; ecotoxicology; semi-quantitative.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	11
3.2 COLETAS E PROCESSAMENTO	12
3.3 HISTOLOGIA E ÍNDICES HISTOLÓGICOS	13
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4. RESULTADOS.....	15
4.1 ÍNDICE DO ÓRGÃO (IORG)	17
4.2 ÍNDICE DE PADRÃO DE REAÇÃO DO ÓRGÃO (IORG.RP).....	19
4.2.1 Índice de Padrão de Reação 1 (IGC).....	19
4.2.2 Índice de Padrão de Reação 2 (IGR).....	21
4.2.3 Índice de Padrão de Reação 3 (IGP).....	26
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfologia da brânquia de um típico teleósteo. Retirado de WEGNER, 2011.9
- Figura 2.** Localização da Bacia Hidrográfica do Paraná III, região Oeste do Paraná. Retirado de ROCHA, NÓBREGA e CUNHA, 2018. 10
- Figura 3.** Médias do Índice do órgão (Iorg) e desvio padrão (SD) das brânquias de *H. mustelinus*, em certas microbacias da BP3, separados pelos meses de coleta. 18
- Figura 4.** Médias de Índice do Órgão (Iorg) e desvio padrão (SD) da pontuação segundo Bernet et al. (1999) de mudanças histológicas em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3..... 19
- Figura 5.** Médias do padrão de reação 1 (IGC), ou Distúrbios Circulatórios, segundo Bernet et al. (1999), mais o desvio padrão (SD) observado em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3..20
- Figura 6.** Distúrbios circulatórios (congestão – cg.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.20
- Figura 7.** Distúrbios circulatórios (aneurisma – an.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.21
- Figura 8.** Valores médios do índice histológico de mudanças regressivas (IGR), também chamados de mudanças do padrão de reação 2 (RP2) segundo Bernet et al. (1999), mais o desvio padrão (SD) observados em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....22
- Figura 9.** Mudança estrutural/arquitetônica (elevação epitelial – e.e.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.23
- Figura 10.** Dilatação capilar (dl.) em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....23
- Figura 11.** Constricção capilar (ct.) em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....24
- Figura 12.** Mudança estrutural/arquitetônica (desarranjo lamelar – d.l.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....24
- Figura 13.** Necrose (n.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.25
- Figura 14.** Mais um caso de necrose (n.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 100X, H&E.25
- Figura 15.** Médias dos valores do índice de mudanças progressivas (IGP) observados, com as mudanças do padrão de reação 3 (RP3), mais o desvio padrão (SD) de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....26

Figura 16. Fusão lamelar completa (f.l.c.) em brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....	27
Figura 17. Outro caso de fusão lamelar completa (f.l.c.) em brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.	27
Figura 18. Hiperplasia de células epiteliais (hp.) em brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....	28
Figura 19. Hiperplasia de células de cloreto (hp. c.c.) em brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.	28
Figura 20. Outro caso de hiperplasia de células de cloreto (hp. c.c.) em brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3	29
Figura 21. Hiperplasia de células de muco (hp. c.m.) em brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3	29
Figura 22. Alteração progressiva do tipo hipertrofia (ht.) de células de cloreto e células de muco, observada em brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3	30
Figura 23. Alterações nucleares (a.n.) em células de brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3	30
Figura 24. Outro caso de alterações nucleares (a.n.) em células de brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3	31
Figura 25. Mais uma observação de alterações nucleares (a.n.) em células de brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....	31
Figura 26. Outra observação de alterações nucleares (a.n.) em células de brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.....	32
Figura 27. Alterações nucleares (a.n.) observadas em células de brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3	32
Figura 28. Alterações nucleares (a.n.), classificada como mudanças regressivas (RP2), em células de brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de pontos de coleta envolvidos na análise de brânquias de <i>H. mustelinus</i> , separados por classificação e mês de coleta.	12
Tabela 2. Nomenclatura dos pontos utilizados no presente trabalho e seus respectivos grupos de classificação e coordenadas.	12
Tabela 3. Frequência (%) de mudanças observadas nos indivíduos de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos na Bacia Hidrográfica do Paraná 3. Separados por grupos e por padrões de reação.	16
Tabela 4. Frequência (%) de cada lesão observada em brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3 separados por mês e padrões de reação.	17
Tabela 5. Valores de média da pontuação de índice do órgão (Iorg) e desvio padrão (SD) em brânquias de <i>H. mustelinus</i> coletados na BP3. Separados por classificação e mês de coleta.	18

1. INTRODUÇÃO

Nos tempos modernos é possível afirmar que a espécie humana alterou o ambiente em volta dela, seja positivamente (para sua própria sobrevivência) ou negativamente (para a maioria das outras espécies no ecossistema), a partir de avanços em diversas áreas do conhecimento e o desenvolvimento de novas tecnologias. A produção agrícola moderna comporta várias dessas grandes ferramentas tecnológicas e avanços científicos. Ela geralmente acontece em grandes áreas de monocultura, com adicionais de fertilizantes ao solo e substâncias químicas capazes de eliminar organismos indesejados (agrotóxicos) a fim de aumentar a produtividade no momento da colheita (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003; VEIGA, 2007; GONSALES *et al.*, 2021).

Apesar do combate às pragas ter tomado uma nova proporção a partir da Revolução Verde - em meados de 1950, com a utilização de compostos biocidas na agricultura (SOARES, 2010; RIBAS & MATSUMURA, 2013) - no Brasil, foi somente com a Lei 7.802/89, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 2002, que uma definição de agrotóxico foi criada, que descreve “compostos de substâncias químicas destinadas ao controle, destruição ou prevenção, direta ou indiretamente, de agentes patogênicos para plantas e animais úteis e às pessoas” (BRASIL, 1989 *apud* LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). Mesmo com a criação do termo no âmbito legislativo e sua regulamentação, a quantidade de uso de agrotóxicos cresceu e se tornou sete vezes maior que no período da década de 90 (58 mil toneladas em 1991 e 643 mil toneladas em 2015) e, relativa à aplicação por cada hectare de área cultivada, aumentou cerca de quatro vezes no mesmo período (IPEA, 2019). Este número continua a ascender, pois em 2021, somente no Paraná, foram comercializadas aproximadamente 116 mil toneladas de agrotóxicos (ADAPAR, 2022).

Essas substâncias estão dentre as poucas que se conhece a toxicidade e, mesmo assim, são aplicadas no meio ambiente com o intuito de matar organismos que causam prejuízo econômico (ROCHA, 2020). Ademais, devido à baixa seletividade (ROCHA, 2020), os agrotóxicos podem causar efeitos adversos a outros grupos de organismos, além de contaminar o ar, solo e a água (KIM *et al.*, 2016).

A pulverização (terrestre e aérea) é uma prática comum no estilo de produção atual que possui consequências negativas tanto para o meio ambiente como para a saúde humana, por conta de desvios da área-alvo causados pelo vento, pela chuva, exposição prolongada às substâncias, dentre outros fatores (GABOARDI *et al.* 2019). Com isso, acontece o contato dessas substâncias - ou parte da substância degradada - com riachos e rios e a contaminação da água, desencadeando, possivelmente, um desequilíbrio no ecossistema regional. A consequência mais

visível da contaminação é a mortalidade dos peixes, porém a presença de concentrações subletais é mais frequente e pode causar efeitos adversos/prejudiciais não aparentes (SANTANA, 2004).

A atrazina, agrotóxico que tem como alvo as ervas daninhas (herbicida), vem sendo muito utilizado no Brasil e ocupou o terceiro lugar em ingredientes ativos (i.a.) mais vendidos no período de 2009 a 2019 (MATIAS *et al.*, 2021). O uso elevado mais a aplicação através de técnicas falhas se somam para criar uma tendência de contaminação de águas superficiais, da mesma forma que esta substância tem capacidade alta de contaminar águas subterrâneas (SILVA, 2018). A meta-análise de Rohr e McCoy (2010) sobre os efeitos da atrazina em peixes e anfíbios de água-doce mostra que existe efeitos subletais em tais organismos, podendo afetar (adiantando ou retardando) a metamorfose de anfíbios (15 de 17 estudos, em 14/14 espécies), pode aumentar a atividade (em 12 de 13 estudos analisados), reduzir comportamentos anti-predatórios (6 de 7 trabalhos) e causar algum tipo de alteração na morfologia das gônadas (7 de 10 trabalhos). Apesar disso, as consequências desses efeitos não são muito claras (e.g. como moldam populações, frequências gênicas, comunidades, etc.) (ROHR & MCCOY, 2010).

Outro herbicida que não recebe tanta atenção, mas pode impactar a biodiversidade, é o Dinoterb – que inclusive foi bastante detectado na região da Bacia Hidrográfica do Paraná 3 (BECKER *et al.*, 2021). A Agência Europeia de Produtos Químicos (ECHA) deixou um alerta para este composto, principalmente por conta de sua toxicidade para aspectos reprodutivos, mas, também pode ser danoso à saúde e ao meio ambiente (ECHA, 2022). Entretanto não há estudos na bibliografia que abordam especificamente esta substância e possíveis danos relacionados. No início dos anos 2000, houve um pedido de banimento do dinoterb na Ásia e na Europa, através da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), alegando toxicidade para trabalhadores e alguns grupos de animais (pássaros, outros mamíferos e peixes) que entram em contato com tal substância. Ademais, é bem possível que haja uma sinergia entre diferentes agrotóxicos quando vários ingredientes estão presentes na água, como deve ser num ambiente natural (que Santos-Silva (2021) chama de “efeito coquetel”), podendo aumentar ou diminuir o efeito de certos agentes estressores.

Há na literatura vários estudos que buscam elucidar alterações sub-individuais (histológicas e mutagênicas) relacionadas à substâncias tóxicas em locais de água doce e com diferentes espécies de peixes, por exemplo, com *Astyanax altiparanae* e o cascudo *Hypostomus ancistroides* (SANTANA, 2004); o caso de duas espécies de lambaris do gênero *Astyanax* (PIANCINI, 2008); com o tucunaré (*Cichla* sp.) (LIMA *et al.*, 2018); mais um estudo com outra espécie de cascudo (*Ancistrus mullerae*) (NEVES *et al.*, 2018); outro com *Astyanax bifasciatus* (NIMET *et al.*, 2019); e com o bagre-de-pedra (*Heptapterus mustelinus*) (VREYS *et al.*, 2019).

Tais estudos são classificados como estudos de biomonitoramento (uma parte da área, claro). Essa área de pesquisa procura analisar as condições ambientais, potenciais perturbações e relacionar com certos grupos de organismos (e sua sobrevivência, distribuição e/ou efeitos metabólicos). O monitoramento se torna importante para identificar agentes tóxicos e acompanhar os efeitos destes no ambiente (neste caso, o aquático) (PEIXOTO, 2020). Também, pode prevenir certos danos para a saúde humana e ambiental, além de prejuízos econômicos causados pela má gestão e má conservação de recursos (DAMASIO, 2017; PEIXOTO 2020). Para a realização do biomonitoramento, utiliza-se uma espécie (ou várias espécies) que retrata, de forma real, a saúde do ambiente (AAZAMI *et al.*, 2015 *apud* NEVES *et al.*, 2018) através de mudanças em diversos níveis estruturais (bioquímico, fisiológico, histológico, genético, variação no comportamento) (LIMA *et al.*, 2018).

Os peixes, de forma geral, são considerados ótimos bioindicadores por alguns fatores como: i) podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes e possuem funções importantes (de carregadores de energia) na cadeia trófica (VAN DER OOST *et al.*, 2003); ii) são sensíveis a contaminantes aquáticos (VREYS *et al.*, 2019); iii) a exposição a contaminantes pode causar desde mudanças bioquímicas em células até mudanças populacionais (BERNET *et al.*, 1999); iv) estão em contato prolongado com os xenobióticos diluídos na água (principalmente as brânquias). Aqui, xenobióticos representam os compostos químicos que não pertencem a certos organismos ou não são esperados de estarem em tais seres, mas são identificados e/ou estão em concentrações muito maiores que o normal. Eles podem ser agrotóxicos e seus resíduos, resíduos de metais, plásticos, dentre outras substâncias tóxicas.

Nestes organismos, existem os biomarcadores, definidos por: os “vários parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo [...]” (AMORIM, 2003a, p.161). Nos últimos 30 anos, vários biomarcadores foram criados para serem aplicados em estudos de avaliação de risco ambiental ou biomonitoramento e foram divididos em três categorias - indicadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade - (YANCHEVA *et al.*, 2016). A categoria de indicador de efeito, que é escopo deste trabalho, engloba “parâmetros mensuráveis de mudanças bioquímicas ou fisiológicas em tecidos ou fluidos corporais de um organismo que podem ser reconhecidas como associadas a um problema de saúde/doença” (VAN DER OOST *et al.*, 2003, p.60). Os indicadores de exposição são aqueles que passam por uma quantificação de uma substância tóxica específica em alguma região interna do organismo (ou um grupo), também chamados de biomarcadores de dose interna (AMORIM, 2003b). Já os indicadores de susceptibilidade são caracterizados por serem uma capacidade inata ou adquirida de resposta de um organismo ao impacto/efeito da substância tóxica (PRISTA & UVA, 2006).

O uso de alterações histopatológicas como biomarcadores úteis, passa pelo fato de que a exposição à contaminantes pode causar lesões nos tecidos de órgãos (como brânquias, fígados, rins e pele) e justamente essas mudanças histológicas possuem a capacidade de indicar uma resposta rápida e intermediária (i.e. no nível histológico, acima do molecular e abaixo do populacional) quanto a exposição a concentrações sub-letais de xenobióticos (BERNET *et al.*, 1999). De acordo com Shah & Parveen (2022), a observação de mudanças histológicas tem sido a melhor ferramenta para estudos de análise de efeitos tóxicos, tanto em campo como em laboratório. Maharajan *et al.* (2016) também dão destaque para o fato de que os estudos toxicológicos, via análise de histopatologias em órgãos, são de importância primária e são efetivos indicadores de qualidade de água. Por se tratar de uma abordagem intermediária na escala dos níveis de mudanças (i.e. nível molecular, histológico e populacional), a análise destes biomarcadores pode ajudar a detectar os resultados/impactos da exposição a múltiplas substâncias tóxicas (considerando a potencial sinergia dos poluentes) antes de causar mudanças na estrutura de comunidades (VREYS *et al.*, 2019).

Dentre os órgãos e/ou estrutura dos peixes, a brânquia é um bom alvo de estudos, pois é um órgão que está em constante contato com o meio externo (RAUTENBERG *et al.*, 2015), conduz as trocas gasosas, ajuda na osmorregulação e já se conhece que certas alterações histopatológicas são respostas de defesa a contaminantes na água. Logo, é uma boa ferramenta para observar alguns impactos ambientais de certos contaminantes (NIMET *et al.*, 2019; MAHARAJAN *et al.*, 2016). Ademais, há uma grande importância como marcador primário (ou seja, primeiro alvo de mudanças/efeitos) pois possui uma grande área de superfície e células de muco (importantes criadoras de uma barreira contra patógenos e substâncias tóxicas, o muco) (BERNET *et al.*, 1999).

Relacionado à morfologia das brânquias de teleósteos, em geral o órgão é composto de 4 arcos branquiais em cada lado da cavidade oral e são protegidos por uma placa óssea chamada de opérculo (RIBEIRO *et al.*, 2022; WILSON, 2002). Cada arco sustenta 2 filamentos chamados hemibrânquias (juntas formam uma holobrânquia) que são compostas, por sua vez, de filamentos, i.e., estruturas em forma de "lâminas" - ou seja, finas e alongadas - que estão posicionadas na direção posterior-lateral do organismo (WEGNER, 2011). O número de filamentos, as formas, tamanhos e densidades de cada hemibrânquia pode variar de acordo com a espécie (RIBEIRO *et al.*, 2022). Tais filamentos são formados de muitas lamelas (também chamadas de lamelas secundárias), que apresentam um epitélio fino e representam onde estão os pequenos canais sanguíneos que abrem caminho para as hemácias fazerem a troca gasosa (RIBEIRO *et al.*, 2022). O sangue, que corre na direção contrária da corrente de água para aumentar a eficiência das trocas, é direcionado às lamelas pelas células pilares (WEGNER, 2011). A barreira da água-

sangue geralmente é composta de uma ou duas camadas de células epiteliais, células de cloreto (também chamadas de células ricas em mitocôndrias, envolvidas na osmorregulação e balanço ácido-básico), células pilares e células de muco (WEGNER, 2011). Tais estruturas representam o que foi observado e analisado no microscópio e são expostas pelas imagens neste trabalho. A área de superfície respiratória total é representada pela soma das áreas desse epitélio respiratório (lamelas secundárias) e pode variar de acordo com o hábito da espécie (RIBEIRO *et al.*, 2022).

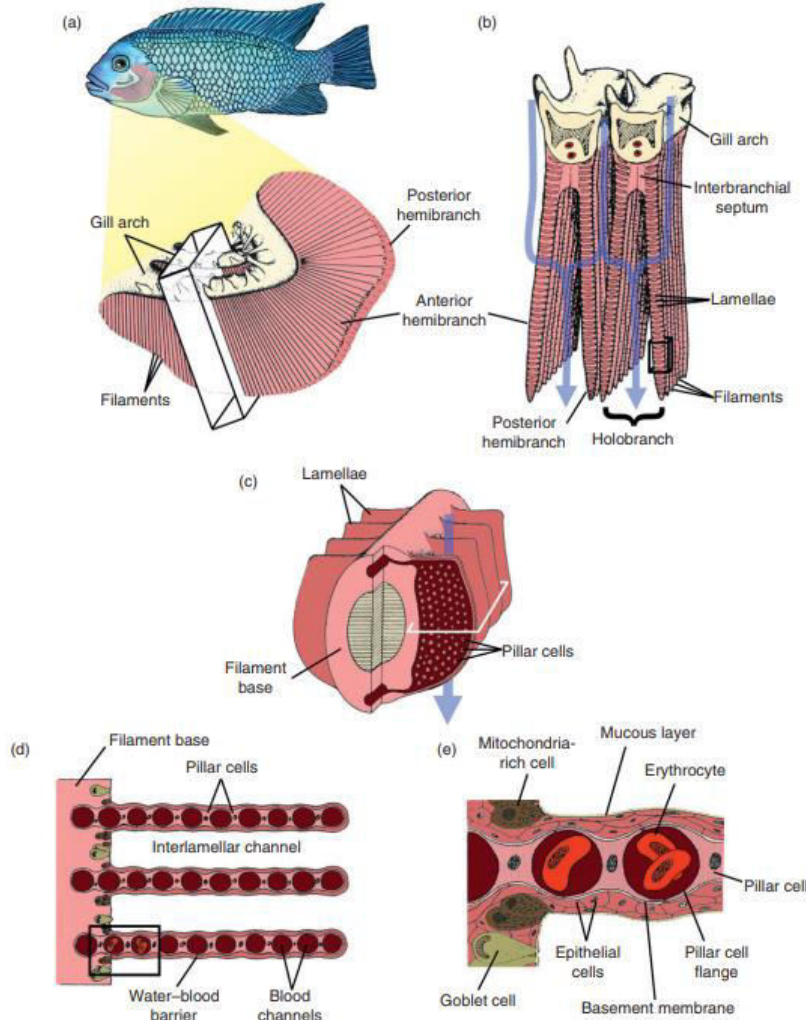


Figura 1. Morfologia da brânquia de um típico teleosteo: (a) dois arcos branquiais anteriores do lado esquerdo da cabeça; (b) secção ampliada e rotacionada de (a) mostrando o localização e morfologia das duas fileiras de filamentos branquiais estendendo de cada arco; (c) secção aumentada e rotacionada de (b) mostrando as lamelas respiratórias em ambos os lados de um filamento; (d) corte transversal através de três lamelas adjacentes de (c); (e) visão aumentada de (d) mostrando o detalhe do epitélio da lamela e do filamento. A direção do fluxo de água é indicada pelas setas azuis. Retirado de WEGNER, 2011.

A bacia hidrográfica do Paraná 3 (BP3) faz parte da Região Hidrográfica do Paraná e consequentemente da Bacia do Prata (BECKER *et al.*, 2021) e está localizada na mesorregião Oeste do Paraná, possuindo cerca de 8.000km². A BP3 compreende um conjunto de 12 sub-bacias, com drenagem de água dos principais rios sentido oeste e que deságuam no Reservatório do Lago de Itaipu (ROCHA, 2019). A região da Bacia tem um intervalo de temperatura média

anual de 19°C - 23°C, com o mês de janeiro como mais quente (23°C a 26°C) e o de junho como mês mais frio (14°C a 18°C) (GOMES *et al.*, 2020), e segundo a classificação de Köppen o clima é do tipo Cfa (clima subtropical úmido), mas há divergência entre autores, como clima temperado chuvoso (ÁGUAS PARANÁ, 2014) e clima subtropical e subtemperado (GOMES *et al.*, 2020). Em relação ao uso e cobertura da terra, há predominância de atividades agrícolas e a força das cooperativas e agroindústrias é, justamente, um reflexo dessa atividade econômica (GOMES *et al.*, 2020).

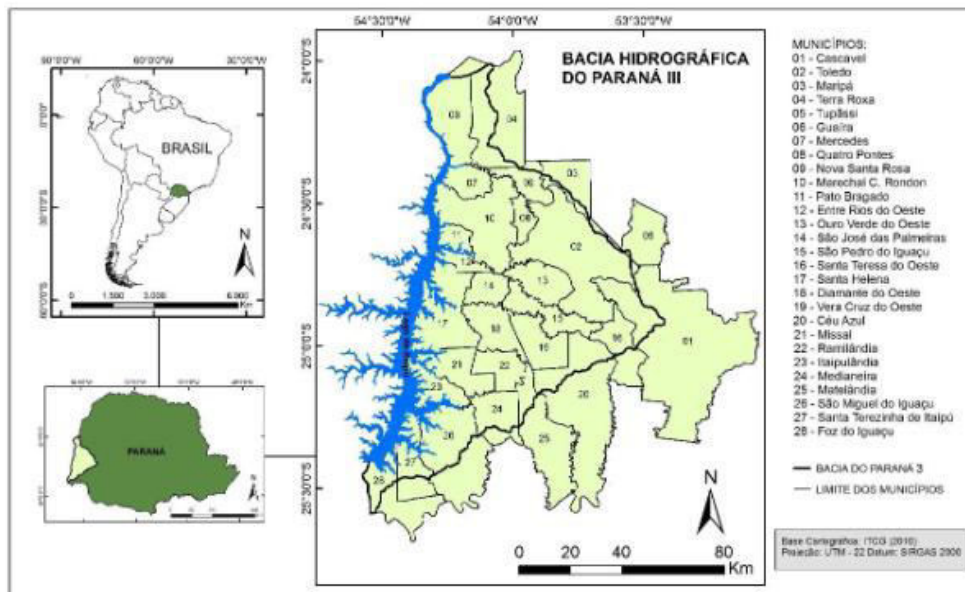


Figura 2. Localização da Bacia Hidrográfica do Paraná III, região Oeste do Paraná. Retirado de ROCHA, NÓBREGA e CUNHA, 2018.

A família Heptapteridae é o quinto grupo mais diverso dentro dos Siluriformes (FUSTER, 2017) e possui cerca de 211 espécies válidas distribuídas em 24 gêneros (FUSTER, 2017). Com uma história taxonômica complicada (com várias mudanças, reclassificações e sinonímias), a família pode ser diagnosticada com alguns caracteres: pele desprovida de escamas, três pares de barbilhões (no maxilar e mentonianos interno e externo), membranas branquiais livres e nadadeira adiposa bem desenvolvida (FUSTER, 2017).

A espécie *Heptapterus mustelinus* - conhecido popularmente como bagre-de-pedra, lambira, bagre-enguia ou “weasel catfish”, em inglês (GIANESINI, 2021) - é a espécie-tipo do gênero *Heptapterus* Bleeker (1858) e tinha nome anterior, de forma inapropriada, *Pimelodus mustelinus* Valenciennes (1835). Sua distribuição foi originalmente descrita no Rio da Prata na Argentina e há registros pelas bacias do Paraná e do Uruguai (FUSTER, 2017). Tem característica de ser bentônico, insetívoro, de águas rápidas e pouco profundas (VREYS, 2016). Depois da detecção de poluentes na região da BP3, essa espécie foi escolhida no projeto por

conta de sua distribuição na área de estudo, seu hábito de alimentação e pelo fator de bioacumulação dos peixes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar características do tecido branquial de peixes da espécie *Heptapterus mustelinus* distribuídos em diferentes riachos na Bacia Hidrográfica do Paraná 3 - Brasil, buscando, de maneira semi-quantitativa, mensurar alterações histopatológicas que dão indícios de exposição a possíveis poluentes no ambiente desses indivíduos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I) Determinar as mudanças histológicas observadas nas brânquias de *Heptapterus mustelinus*.

II) Classificá-las em relação à metodologia proposta por Bernet *et al.* (1999) e relacionar possíveis alterações entre os peixes das 3 diferentes categorias de pontos coletados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 50 indivíduos de *H. mustelinus*. As coletas foram realizadas em riachos de 2ª a 4ª ordem, em pontos distribuídos pela área da BP3. Para facilitar o agrupamento de pontos, foi criada uma classificação de impacto dividida em 3 categorias:

Grupo A - “baixo impacto” (PEIXOTO, 2020), ou “córregos de ambientes mais conservados, predominantemente não agrícolas” (BECKER *et al.*, 2021);

Grupo B - “médio impacto” (PEIXOTO, 2020), ou “córregos de ambientes impactados pela agricultura, mas sem a presença de micropoluentes detectados por Della-Flora *et al.*, 2019” (BECKER *et al.*, 2021);

Grupo C - “alto impacto” (PEIXOTO, 2020), ou “rios/córregos de ambientes impactados pela agricultura, com micropoluentes detectados e quantificação previamente realizada por Della-Flora *et al.*, 2019” (BECKER *et al.*, 2021);

Ao total, foram utilizados 14 pontos, com 5 para os grupos A e B e 4 para o grupo C (Tabela 1). As coordenadas de cada ponto estão expostas na Tabela 2. É importante destacar que houveram dois pontos em que a coleta foi repetida em meses diferentes.

Tabela 1. Número de pontos de coleta envolvidos na análise de brânquias de *H. mustelinus*, separados por classificação e mês de coleta. Ao total são 14 e alguns foram repetidos em mais de 1 mês. Grupo A é o grupo de menor impacto, o grupo B é o grupo de médio i impacto e o grupo C é o grupo de maior impacto.

Grupos/ Meses	Fevereiro	Abril	Julho
A	3 pontos	1 ponto	1 ponto
B	2 pontos	2 pontos	1 ponto
C	1 ponto	1 ponto	2 pontos

Tabela 2. Nomenclatura dos pontos utilizados no presente trabalho e seus respectivos grupos de classificação e coordenadas.

Pontos	Grupo de classificação	Latitude	Longitude
BR04	A	24° 47'22,002"S	54° 2'12,678"W
BR06	A	24° 55'24,800"S	54° 5'9,838"W
BR10	A	25° 8'33,292"S	54° 3'42,727"W
BR11	A	25° 3'17,030"S	54° 3'57,640"W
BR01	B	24° 35'57,981"S	54° 8'23,341"W
BR05	B	24° 52'28,510"S	54° 3'15,584"W
BR15	B	25° 15'18,047"S	54° 11'1,482"W
BR17	B	25° 26'0,521"S	54° 22'32,862"W
BR02	C	24° 34'59,285"S	54° 1'33,426"W
BR03	C	24° 28'0,270"S	54° 12'27,570"W
BR08	C	25° 8'39,300"S	54° 15'23,555"W
BR16	C	25° 14'51,424"S	54° 8'52,219"W

3.2 COLETAS E PROCESSAMENTO

O material utilizado no presente projeto de pesquisa foi proveniente das coletas realizadas em 2019, feitas pela equipe de pesquisa do projeto de Micropoluentes da Itaipu Binacional, que ocorreram nos meses de fevereiro, abril e julho. Os peixes foram capturados via pesca elétrica mais o auxílio do puçá de pesca, foram colocados em sacos plásticos com água do próprio ponto

com um enriquecimento de oxigênio e foram mantidos vivos até a chegada ao laboratório para triagem.

No processamento, foram selecionados 5 indivíduos de cada ponto (geralmente os maiores), anotou-se o peso (com uma balança de precisão) e os comprimentos (total e padrão) através de um paquímetro digital e, em seguida, eram sacrificados por secção medular, por fim ocorria a retirada das brânquias (e demais órgãos de interesse do grupo de pesquisa). O órgão de cada indivíduo, assim que retirado, era mantido submerso no fixador paraformaldeído 4%, em criotubos individuais devidamente separados, depois, armazenados por, em média, 30 dias até o próximo passo.

Os peixes envolvidos neste trabalho estão depositados na Coleção de Ictiologia da UNILA, no Campus Jardim Universitário, laboratório G002.

3.3 HISTOLOGIA E ÍNDICES HISTOLÓGICOS

A preparação das amostras envolveu primeiro a fixação - já realizada nas amostras no momento da retirada de órgãos - em paraformaldeído 4% e armazenamento na geladeira. Posteriormente, houve a lavagem com o tampão fosfato de sódio e foram armazenadas novamente na geladeira cerca de 3-5 dias. O passo seguinte foi a desidratação, que ocorreu em banhos de álcool (30 min) na sequência de 70%, 80%, 90%, 95% e duas vezes no álcool 100%. Depois ocorreu a embebição em historesina Leica e, posteriormente, a emblocagem, seguindo os passos fornecidos pelo Kit de Historesina da própria marca. Em seguida, as amostras eram cortadas com o auxílio de um micrótomo (Leica Histocore AUTOCUT) em pequenas fatias com espessura de 3 µm. Logo em seguida, eram posicionadas em banho maria a 40°C para esticarem e manter a integridade, e posteriormente ocorreu a montagem dos cortes em lâminas de vidro. Depois, foi feita a coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina 3%, que possibilita a observação de componentes celulares, como o citoplasma e o núcleo, por conta da natureza básica da hematoxilina - que consequentemente se atrai pela região ácida do núcleo e deixa uma coloração roxa/violeta - e do caráter ácido da eosina - que cora regiões básicas, no caso o citoplasma, em uma cor rosa/avermelhada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017). O último estágio consistiu na montagem dos cortes já posicionados na lâmina, na sobreposição de uma lamínula e, por fim, a colagem com bálsamo de Canadá e um período de 3-7 dias para a lâmina secar na estufa a 40-45°C.

Todas as lâminas foram feitas em duplicata e na hora da análise escolheu-se a lâmina que estava com menos artefatos, devidamente corada e com cortes mais íntegros, a partir de uma rápida observação prévia. A análise de cada lâmina histológica foi feita com a ajuda de um

microscópio de luz da marca Zeiss modelo PrimoTech, com a câmera AXION Cam - Zeiss. Selecionou-se 1 corte presente na lâmina (de um total de 5-6). Com isso, foi observado toda a área de tal corte com as lamelas secundárias características das brônquias.

Para medir as alterações de forma semiquantitativa foi utilizado a metodologia proposta por Bernet *et al.* (1999), desenvolvida para possibilitar a comparação entre diferentes estudos, com a criação de uma quantificação padronizada para cada órgão, baseada em 5 padrões de reação (rp).

Conforme Bernet *et al.*, 1999, o padrão de reação 1 (rp1) envolve distúrbios circulatórios, composto de alterações relacionadas ao fluxo de sangue ou fluidos do tecido, como hemorragia, congestão de sangue, aneurisma e edema intercelular. No Padrão de reação 2 (rp2) estão inseridas as mudanças regressivas, definidas por serem mudanças que levam a redução funcional do órgão, mais especificamente as alterações arquitetônicas e estruturais, alterações no plasma, alterações no núcleo, depósitos, atrofia e necrose. O padrão de reação 3 (rp3) agrupa as mudanças progressivas, ou melhor, as alterações que levam a um aumento na atividade das células/do tecido. Fazem parte deste grupo: hiperplasia do tecido (aumento do tecido causado por um aumento no número de células, sem alterar o volume) e hipertrofia das células (aumento do volume celular, sem mudar o número de células). No padrão de reação 4 (rp4) estão as alterações inflamatórias: exsudato (fluido altamente proteico e restos celulares expelido de vasos sanguíneos/linfóides); ativação do sistema reticuloendotelial (SRE) e infiltração de leucócitos através do sangue até o tecido. Por último, o padrão de reação 5 (rp5) abriga as neoplasias benignas (células diferenciadas de tumor que se assemelham às células originais do tecido) e malignas (células pouco diferenciadas, de multiplicação rápida, que invadem e destroem tecidos, podendo ou não ser observado metástase) (Bernet *et al.*, 1999).

A avaliação histológica ocorreu conforme Bernet *et al.* (1999), com uma modificação criada por Rautenberg *et al.* (2015) e também utilizada por Peixoto (2020). Para realização do cálculo de cada lesão, foram utilizados 2 fatores: o fator de importância (w) multiplicando o valor de score (a).

O primeiro, o fator de importância (w), consiste na “importância patológica” da lesão observada, ou seja, quanto isso afeta o funcionamento do órgão e conseqüentemente o indivíduo. Os autores (Bernet *et al.*, 1999 e Rautenberg *et al.*, 2015) disponibilizam uma tabela com os valores para cada alteração, de 1 a 3, onde o valor 1 consiste de alterações com importância patológica mínima, com potencial de reversão assim que a exposição se encerra, por exemplo a hipertrofia de células epiteliais nas brônquias. O valor 2 abriga alterações de importância moderada, onde a maioria é reversível quando a exposição acaba, e.g. hiperplasia de células de

cloreto nas bases das lamelas secundárias. E o valor 3 é composto de alterações de importância patológica marcada, geralmente irreversíveis e que ocasionam a perda de função (total ou parcialmente) do órgão, por exemplo a necrose do epitélio branquial.

O valor de score ou valor de ocorrência (a) é o valor dado à determinada lesão que leva em conta a extensão e a importância (severidade) da alteração. Consiste dos valores: 0= inalterado, 2= leve ocorrência (*mild*), 4= ocorrência moderada, 6= ocorrência severa e 8= ocorrência muito severa (RAUTENBERG *et al.*, 2015). Bernet *et al.*, 1999, originalmente propuseram um intervalo de 0 a 6, porém Rautenberg *et al.* (2015) expandem de 0 a 8 para criar uma classificação mais detalhada.

Dada a pontuação de cada lesão observada, ao somar todos os valores de cada padrão de reação, é obtido o Índice de padrão de reação do órgão ($I_{org\ rp}$) e, ao somar os valores para cada padrão (somatória do $I_{org\ rp}$), é obtido o Índice do órgão (I_{org}) para determinado indivíduo. São justamente estes valores que criam a capacidade de comparação entre indivíduos e até entre trabalhos.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos Índices foram apresentados através da média de cada ponto mais o desvio padrão (SD). No caso deste trabalho, o teste utilizado foi a ANOVA, uma vez que a amostra atingiu alguns pressupostos, como a distribuição normal, calculado pelo teste de Shapiro-Wilk, um número amostral grande ($n=49$) e nenhum ponto com apenas 1 valor (no caso, pontos com 1 indivíduo). A Análise de Variância foi utilizada para todas as comparações, entre as médias dos índices I_{org} e cada $I_{org\ rp}$. Todos os testes foram realizados no programa PAST 4 (HAMMER *et al.*, 2001) com nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Foram analisadas 50 amostras de brânquias de *H. mustelinus*, num total de 14 pontos de coleta (5 para os grupos A e B, 4 pontos para o C) e em 3 diferentes meses (Fevereiro, Abril e Julho) (Tabela 1), havendo repetição de alguns pontos. Foram, ao total, 16 indivíduos do grupo A, 21 indivíduos do grupo B, e 13 indivíduos do grupo C.

Todos os indivíduos apresentaram ao menos algum tipo de mudança, o que era esperado, pois tratam-se de peixes coletados em seus habitats, onde estão expostos a várias pressões do próprio ecossistema, naturalmente, fora o possível contato com poluentes. O menor escore foi de 18 pontos no Índice de Bernet *et al.* (1999) e a maior pontuação foi de 64, que, no caso, evidencia a heterogeneidade de valores observados. Considerando que o valor 0 representa uma brânquia inalterada e saudável, os valores podem ser considerados altos. Conforme indica a Tabela 4,

foram observadas mudanças regressivas (IGR) e progressivas (IGP) em todos os animais envolvidos na análise, e distúrbios circulatórios (IGC) em 56% dos peixes (28 de 49). Entretanto, é necessário destacar que o Índice de Bernet *et al.* (1999) precisa de uma área de lesão de 5% ou mais para ser contabilizado no escore, portanto, houve casos de observação dessas mudanças, mas não de maneira significativa para a pontuação.

Dentro do padrão de reação 1 (RP1), os distúrbios circulatórios, foram registradas congestões sanguíneas e aneurismas no tecido. Quanto à classificação do RP2, de mudanças regressivas (IGR), observou-se alterações de arquitetura/estruturais (i.e., elevações epiteliais). Ainda nas IGR, mais especificamente no tecido epitelial, foram observados casos de alterações nucleares, atrofia e necrose. As mudanças regressivas encontradas no tecido de suporte foram alterações nucleares e necrose. Já as mudanças progressivas, classificadas no padrão de reação 3 (RP3), foram bem frequentes e apareceram nas formas de hiperplasia (e.g. fusão lamelar e proliferação de células de cloreto e muco) e hipertrofia (aumento no volume) de células epiteliais e/ou do tecido de suporte das brânquias dos bagres-enguia (todas as mudanças citadas estão nas figuras 6, 7, 9-14 e 16-28).

Tabela 3. Frequência (%) de mudanças observadas nos indivíduos de *H. mustelinus* coletados em riachos na Bacia Hidrográfica do Paraná 3. Separados por grupos (A: baixo impacto; B: médio impacto; e C: alto impacto) e por padrões de reação (RP1: distúrbios circulatórios; RP2: mudanças regressivas; e RP3: mudanças progressivas); n: número de amostras.

Grupos	Distúrbios circulatórios (IGC)	Mudanças regressivas (IGR)	Mudanças progressivas (IGP)
A (n= 16)	43,75% (n= 7)	100%	100%
B (n= 21)	55% (n= 11)	100%	100%
C (n= 13)	76,92% (n= 10)	100%	100%
Total:	56% (n= 28)	100%	100%

Tabela 4. Frequência (%) de cada lesão observada em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, estes separados por mês: Fevereiro (FEB.), Abril (APR.) e Julho (JUL.); e grupo de classificação: A= baixo impacto, B= médio impacto e C= alto impacto; n: número de amostras.

Padrões de reação	RP1 (Distúrbios circulatórios)		RP2 (Mudanças Regressivas)		RP3 (Mudanças Progressivas)	
	Hemo. / Congest. / Aneurisma	Alterações Estruturais/ arquitetônicas	Alterações nucleares	Necrose	Hipertrofia	Hiperplasia
A – FEB. (n= 11)	36,36% (n= 4)	100%	81,81% (n= 9)	9,09% (n= 1)	45% (n= 5)	100%
A – APR. (n= 3)	100%	100%	66,66% (n= 2)	0	33,33% (n= 1)	100%
A – JUL. (n= 2)	0	100%	49% (n= 1)	0	0	100%
B – FEB. (n= 8)	50% (n= 4)	100%	75% (n= 6)	0	50% (n= 4)	100%
B – APR. (n= 7)	71,42% (n= 5)	100%	85,71% (n= 6)	42,85% (n= 3)	71% (n= 5)	100%
B – JUL. (n= 6)	33,3% (n= 2)	100%	100%	0	83,3% (n= 5)	100%
C – FEB. (n= 3)	66,66% (n= 2)	100%	66,66% (n= 2)	33,33% (n= 1)	66,66% (n= 2)	100%
C – APR. (n= 3)	33,33% (n= 1)	100%	66,66% (n= 2)	33,33% (n= 1)	66,66% (n= 2)	100%
C – JUL. (n= 7)	57,14% (n= 4)	100%	85,71% (n= 6)	14,28% (n= 1)	85,71% (n= 6)	100%

4.1 ÍNDICE DO ÓRGÃO (IORG)

Não houveram diferenças significativas entre as médias dos pontos (separados por grupo e mês) ($p=0,1601$ $F= 1,496$) quando considerado o valor do Índice do órgão (Iorg), conforme mostram as Figuras 3 e 4. Portanto, a partir do resultado da ANOVA, foi possível aceitar a hipótese nula de que não há diferenças entre as médias dos pontos. Ademais, não foi possível observar uma distinção entre as médias das pontuações para cada classificação (baixo, médio e alto impacto), tampouco uma tendência, mesmo que estatisticamente não significativa, pois os grupos que tiveram médias mais próximas foram os extremos (baixo impacto, ou grupo A, e alto impacto, ou grupo C) (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de média da pontuação de índice do órgão (Iorg) e desvio padrão (SD) em brânquias de *H. mustelinus* coletados na BP3. Além do número amostral (n) para cada grupo de pontos (A= baixo impacto; B= médio impacto e C= alto impacto) separados por classificação e mês de coleta.

Grupos/Meses	Fevereiro	Abril	Julho
A	36,72 ($\pm 9,34$) (n= 11)	42,66 ($\pm 10,06$) (n= 3)	38 ($\pm 5,65$) (n= 2)
B	28,75 ($\pm 7,24$) (n= 8)	40 ($\pm 7,91$) (n= 7)	33,66 ($\pm 6,62$) (n= 6)
C	43,33 ($\pm 18,14$) (n= 3)	38,66 ($\pm 6,11$) (n= 3)	39,71 ($\pm 7,34$) (n= 7)

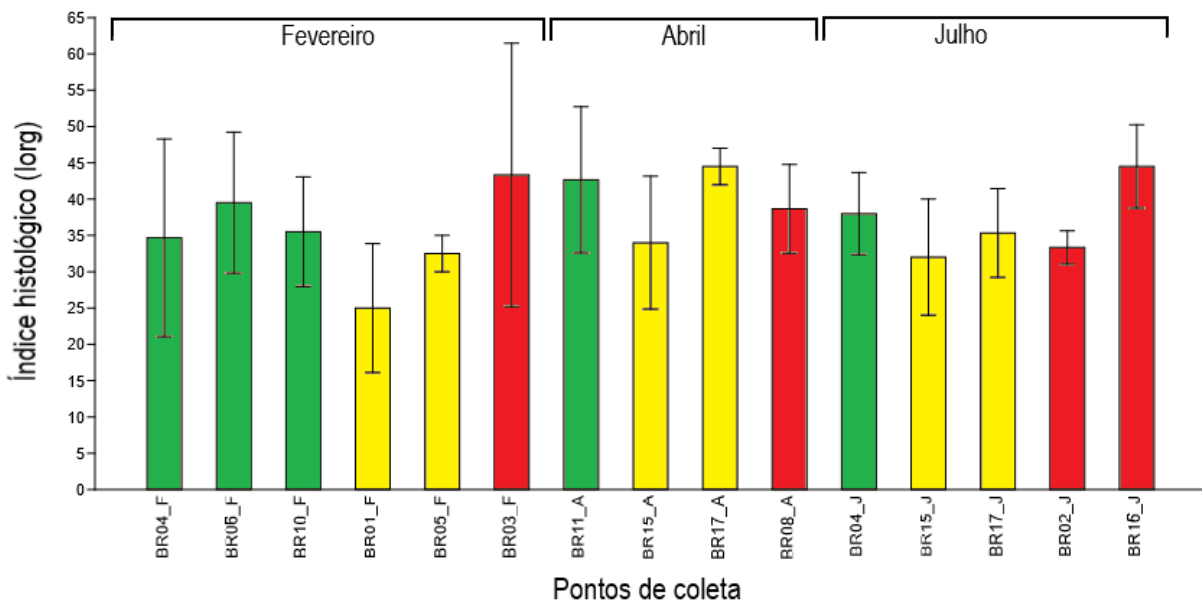


Figura 3. Médias do Índice do órgão (Iorg) e desvio padrão (SD) das brânquias de *H. mustelinus*, em certas

microbacias da BP3, separados pelos meses de coleta. As barras em verde representam pontos da classificação de baixo impacto (grupo A), as barras amarelas indicam pontos de médio impacto (grupo B) e as barras vermelhas representam pontos de alto impacto (grupo C).

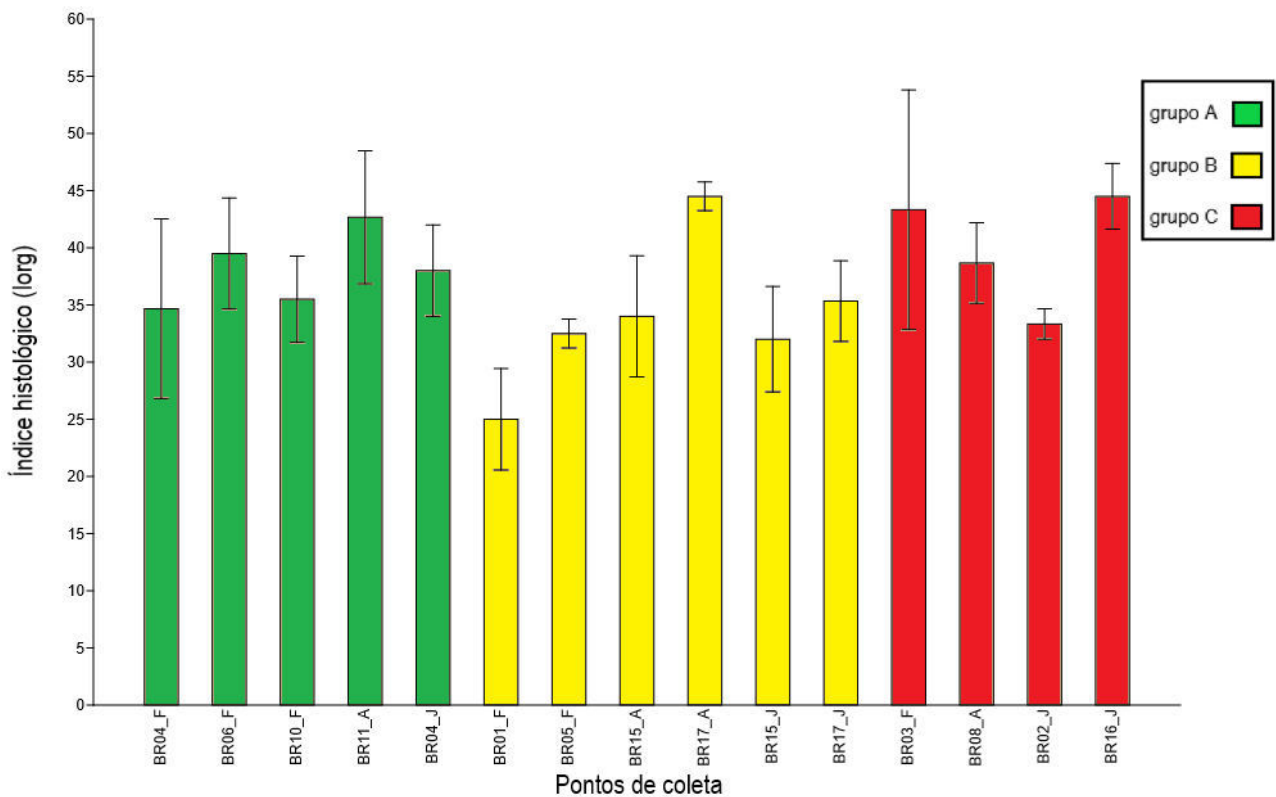


Figura 4. Médias de Índice do Órgão (Iorg) e desvio padrão (SD) da pontuação segundo Bernet et al. (1999) de mudanças histológicas em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, posicionados por grupos de classificação. As barras em verde representam pontos da classificação de baixo impacto (grupo A), as barras amarelas indicam pontos de médio impacto (grupo B) e as barras vermelhas representam pontos de alto impacto (grupo C).

4.2 ÍNDICE DE PADRÃO DE REAÇÃO DO ÓRGÃO (IORG.RP)

Além da mensuração do dano total nas brânquias através do “Iorg”, também foi possível calcular e analisar as pontuações separadas por padrão de reação, ou seja, os escores do RP1 (distúrbios circulatórios), RP2 (mudanças regressivas) e RP3 (mudanças progressivas). Não foi observado nenhum caso de inflamações (RP4), tampouco neoplasias/ tumores (RP5).

4.2.1 Índice de Padrão de Reação 1 (IGC)

Em relação aos valores encontrados para os distúrbios circulatórios, depois da aplicação de uma ANOVA para os 3 grupos de classificação, foi observado que não há diferenças significativas entre as médias dos grupos, com $p = 0,7769$ e $F = 0,2538$. A mudança com maior frequência de pontuação foi a congestão (hiperemia) (observada na Figura 6), contribuindo para o escore de 18% (9 de 50) dos indivíduos analisados. Foi possível observar poucos casos de aneurismas, que podem ser observados na Figura 7.

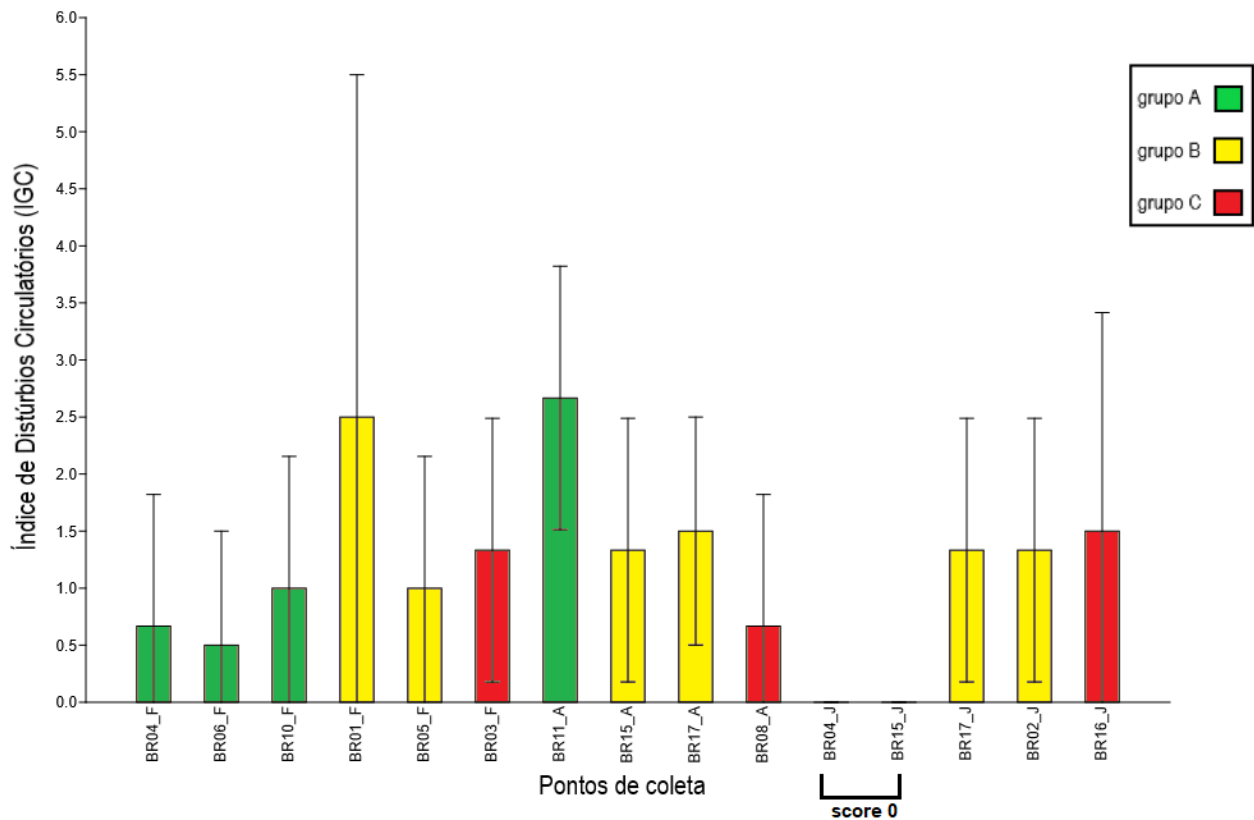


Figura 5. Médias do padrão de reação 1 (IGC), ou Distúrbios Circulatórios, segundo Bernet et al. (1999), mais o desvio padrão (SD) observado em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3. As barras em verde representam pontos da classificação de baixo impacto (grupo A), as barras amarelas indicam pontos de médio impacto (grupo B) e as barras vermelhas representam pontos de alto impacto (grupo C).

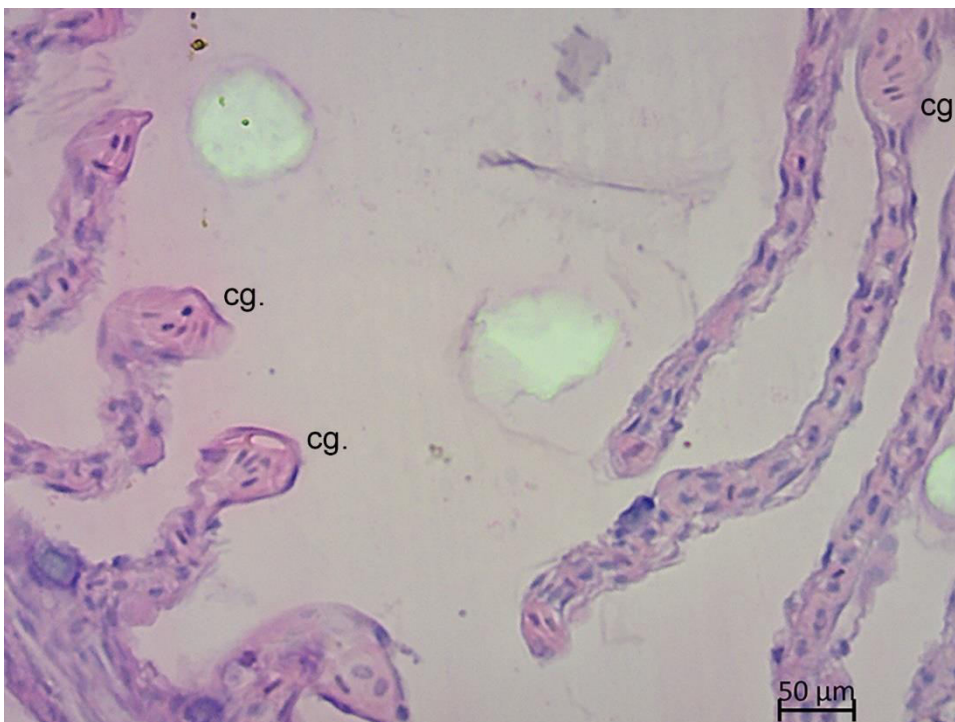


Figura 6. Distúrbios circulatórios (congestão – cg.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

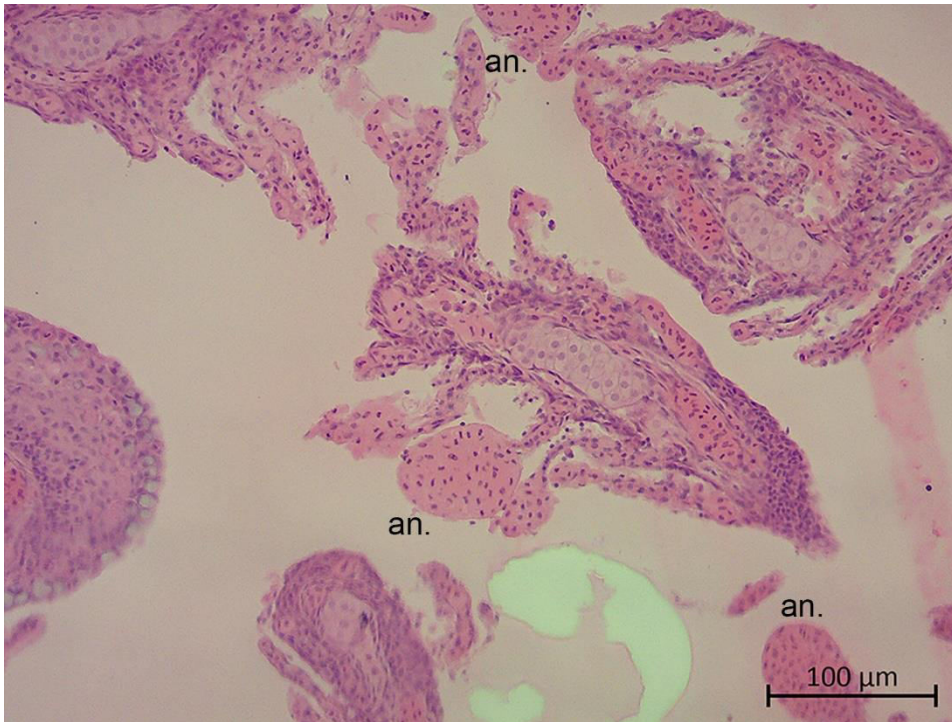


Figura 7. Distúrbios circulatórios (aneurisma – an.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 100X, H&E.

4.2.2 Índice de Padrão de Reação 2 (IGR)

No caso das mudanças classificadas no padrão de reação 2 (RP2), tampouco foi possível observar diferenças significativas depois de uma ANOVA utilizando os todos os pontos separados ($p= 0,3342$ e $F= 1,177$). Juntamente com o Índice de distúrbios circulatórios (IGC), ambos índices tiveram pelo menos 1 indivíduo com 0 de pontuação, i.e., peixes com brânquias normais, sem mudanças desses 2 padrões (em área significativa). A mudança com maior frequência de observação (100%) neste padrão foi a categoria de mudanças estruturais/arquitetônicas do epitélio e tecido suporte, que agrega elevação do epitélio (figura 9), desarranjo lamelar (figura 12); constrição (fig. 11) e dilatação (fig. 10) do capilar sanguíneo na lamela secundária. Outra mudança com alta frequência de observação foi a de alterações nucleares (figuras 23-28), que foi observada em 40 das 50 lâminas. Também foram observados casos de necrose em 14,28% (7/50) dos indivíduos (figuras 13 e 14).

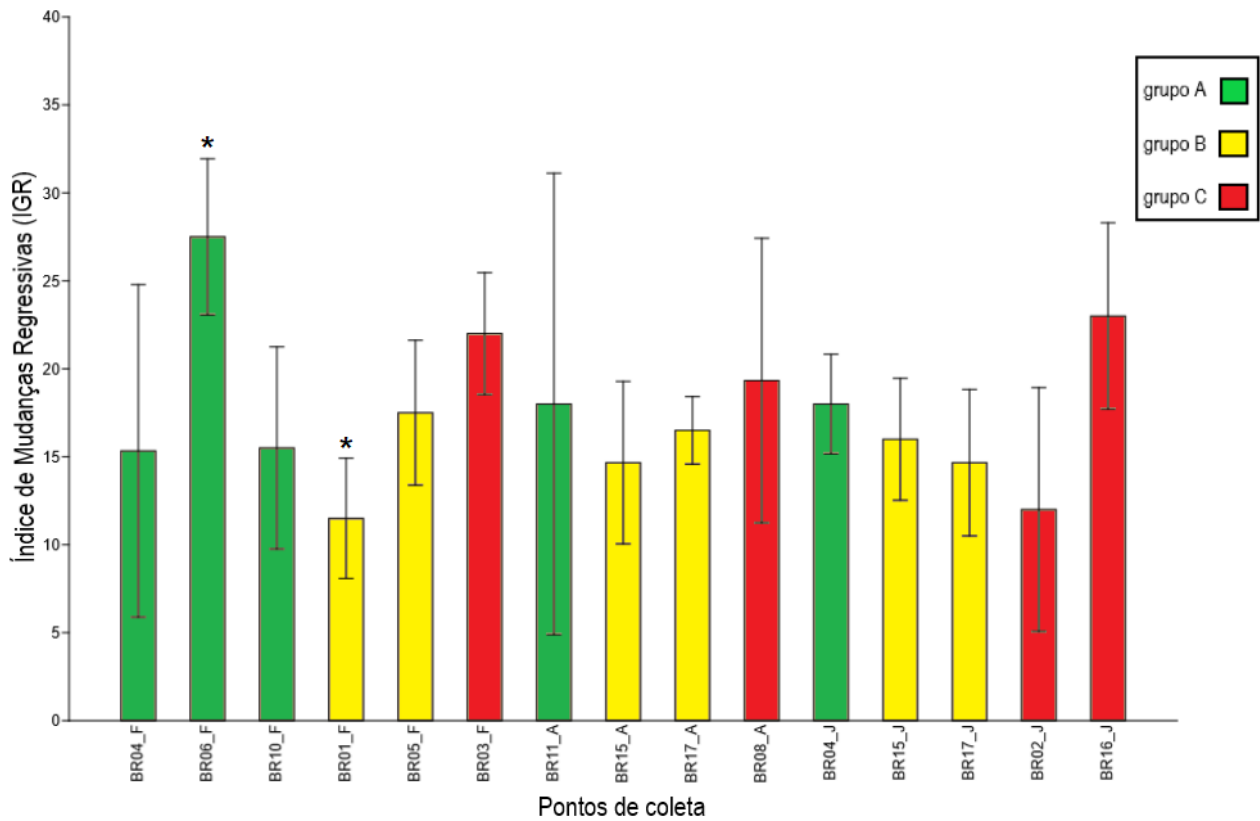


Figura 8. Valores médios do índice histológico de mudanças regressivas (IGR), também chamados de mudanças do padrão de reação 2 (RP2) segundo Bernet et al. (1999), mais o desvio padrão (SD) observados em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3. Grupo A (barras verdes) representa os pontos de baixo impacto, o grupo B representa os pontos de médio impacto (barras amarelas) e o grupo C indica os pontos de alto impacto (barras vermelhas). O asterisco representa os pontos com diferença significativa ($p < 0,05$).

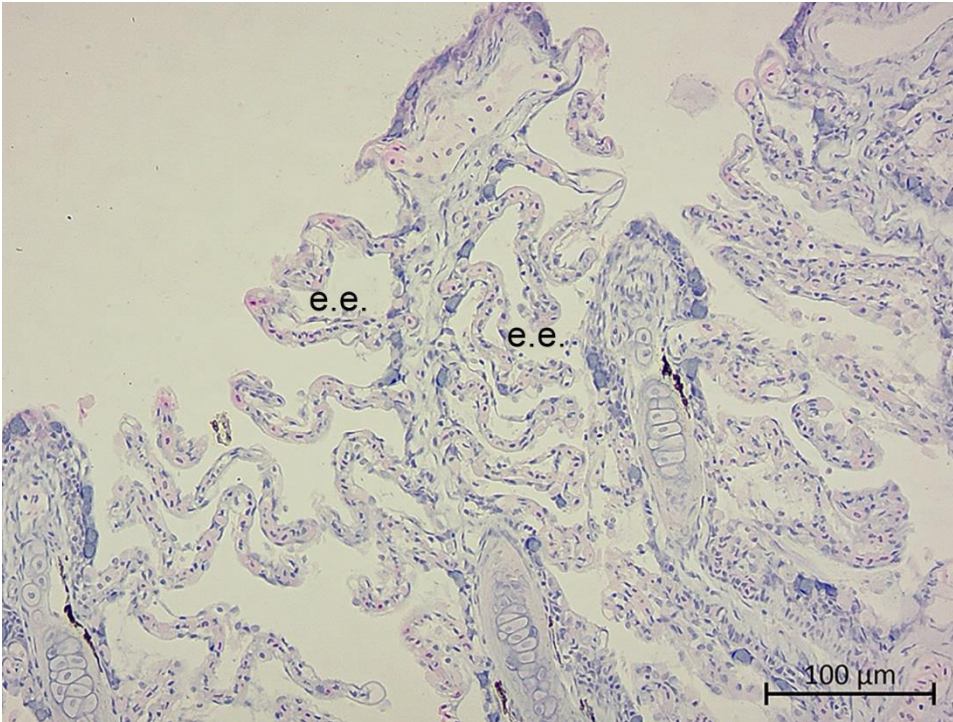


Figura 9. Mudança estrutural/arquitetônica (elevação epitelial – e.e.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 100X, H&E.



Figura 10. Dilatação capilar (dl.) em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

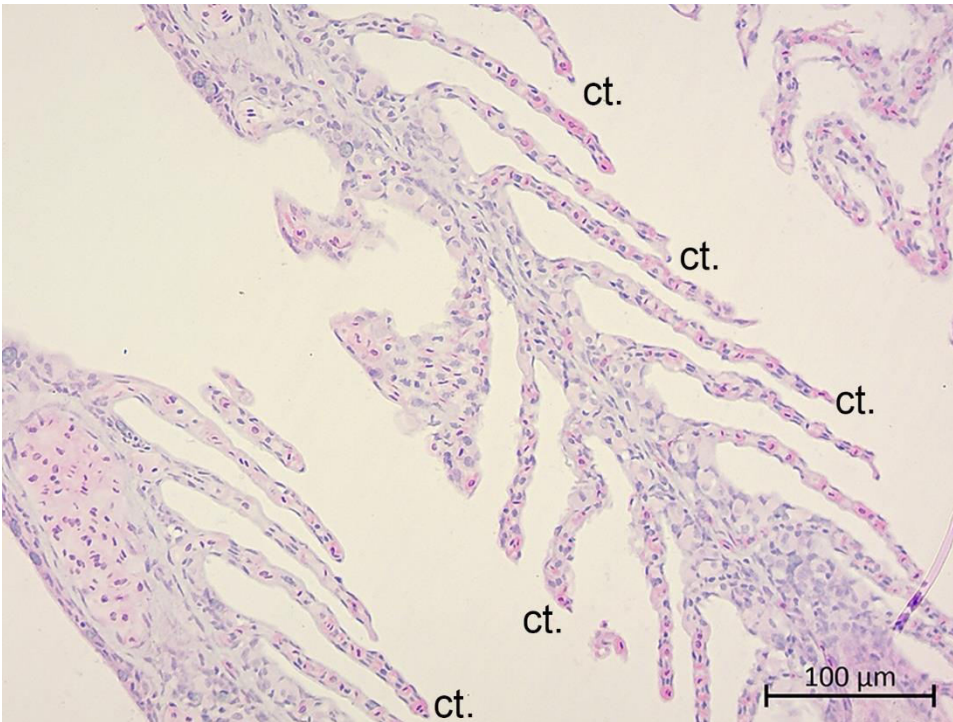


Figura 11. Constrição capilar (ct.) em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

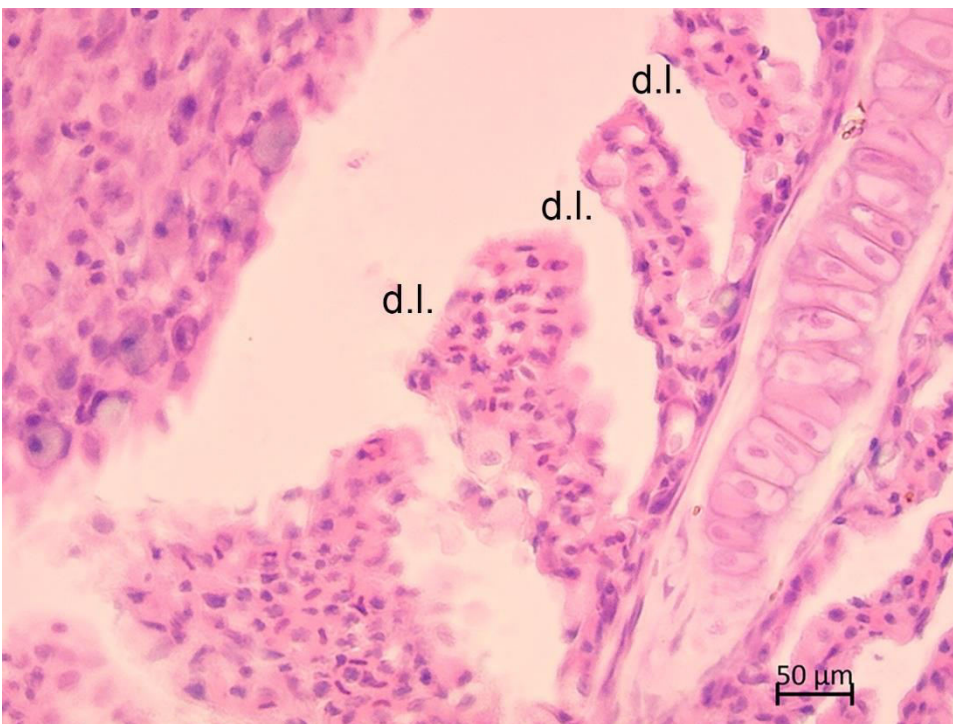


Figura 12. Mudança estrutural/arquitetônica (desarranjo lamelar – d.l.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

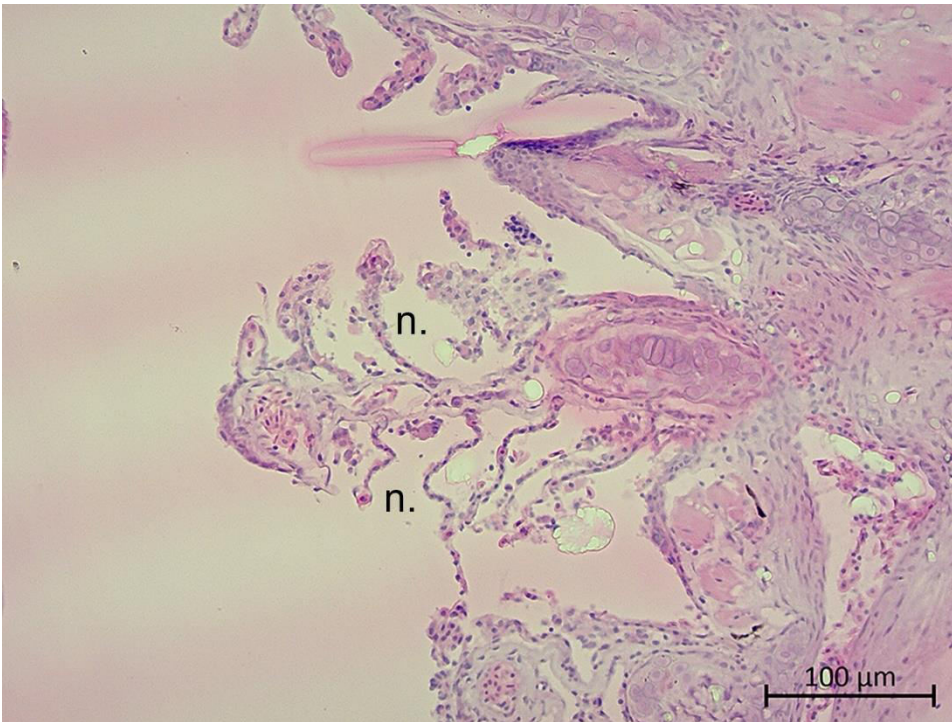


Figura 13. Necrose (n.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 100X, H&E.

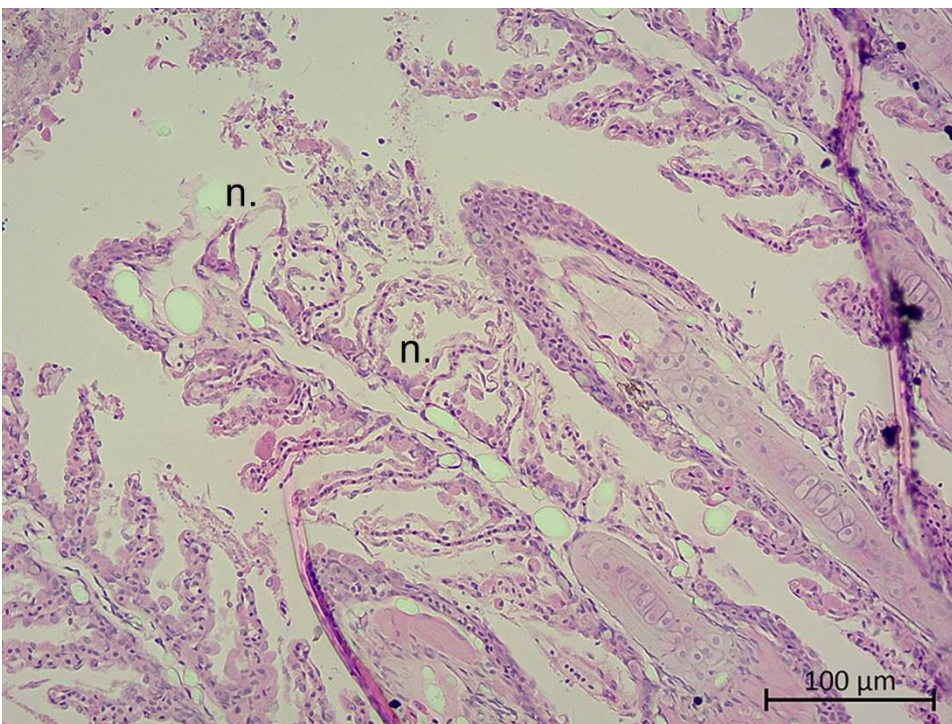


Figura 14. Mais um caso de necrose (n.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 100X, H&E.

4.2.3 Índice de Padrão de Reação 3 (IGP)

Quanto às mudanças progressivas, ou RP3, segundo Bernet *et al.* (1999), não foi possível observar diferenças significativas entre as médias após a execução da ANOVA, que forneceu os valores de $p= 0,06558$ e $F= 1,876$. Como foi identificado o valor muito próximo a $p<0,05$, o teste de pareamento de Tukey foi aplicado, a fim de comparar cada 2 pontos de forma emparelhada, até dentro da mesma classificação. Houve diferenças entre 2 pontos apenas, são eles: BR06_F (grupo A) e BR01_F (grupo B) com $p= 0,03149$. A mudança com maior frequência de observação foi a hiperplasia de células, com 100% de presença, em vários níveis de pontuação (ou seja, com escore de 2 a 8, segundo Bernet *et al.* (1999), dependendo da área da lesão) (figuras 16-21). Além disso, também foi possível observar casos de hipertrofia de diferentes tipos de células (Figura 22).

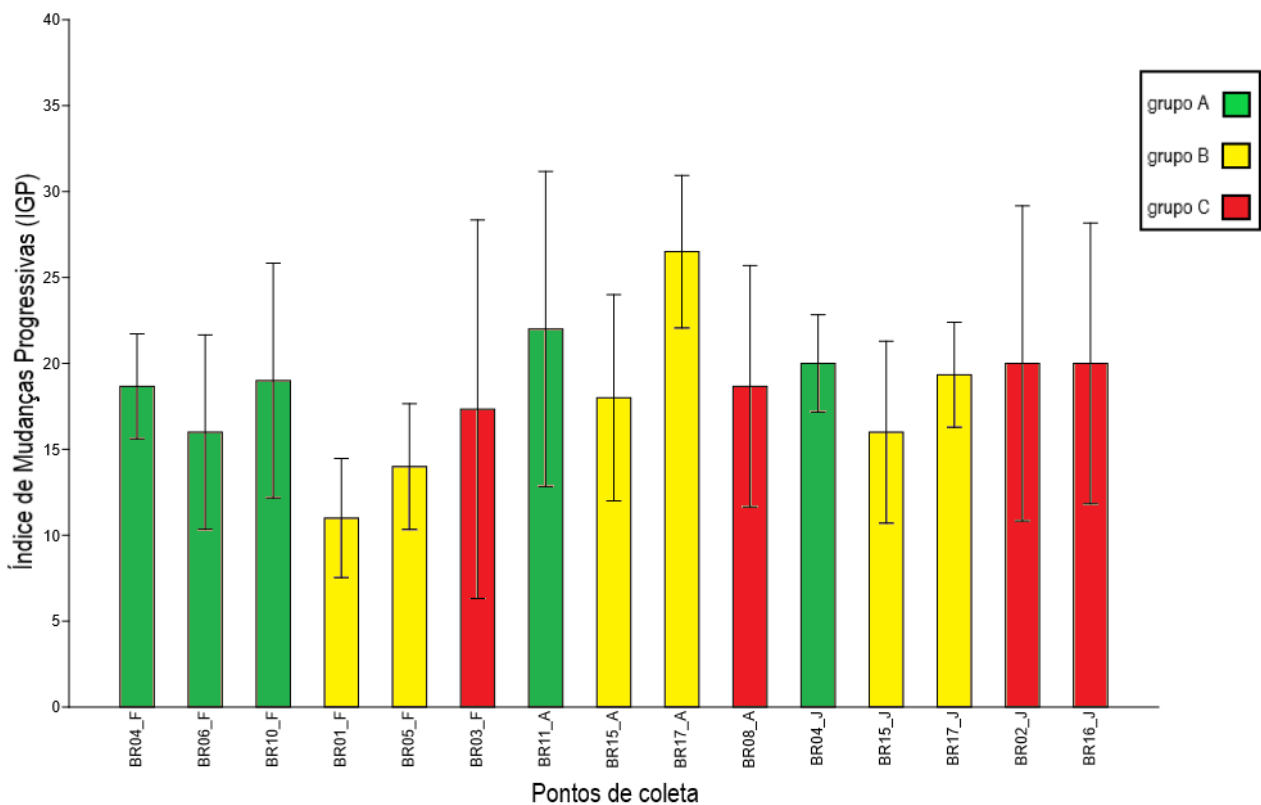


Figura 15. Médias dos valores do índice de mudanças progressivas (IGP) observados, com as mudanças do padrão de reação 3 (RP3), mais o desvio padrão (SD) de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3. Grupo A (barras verdes) representa os pontos de baixo impacto, o grupo B representa os pontos de médio impacto (barras amarelas) e o grupo C indica os pontos de alto impacto (barras vermelhas).

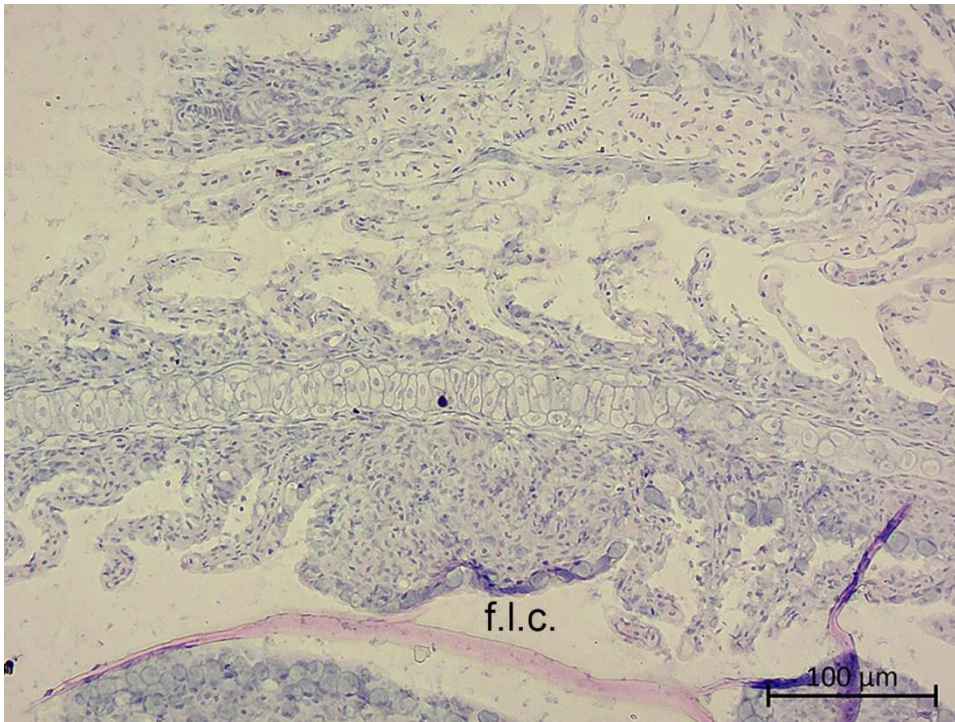


Figura 16. Fusão lamelar completa (f.l.c.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 100X, H&E.

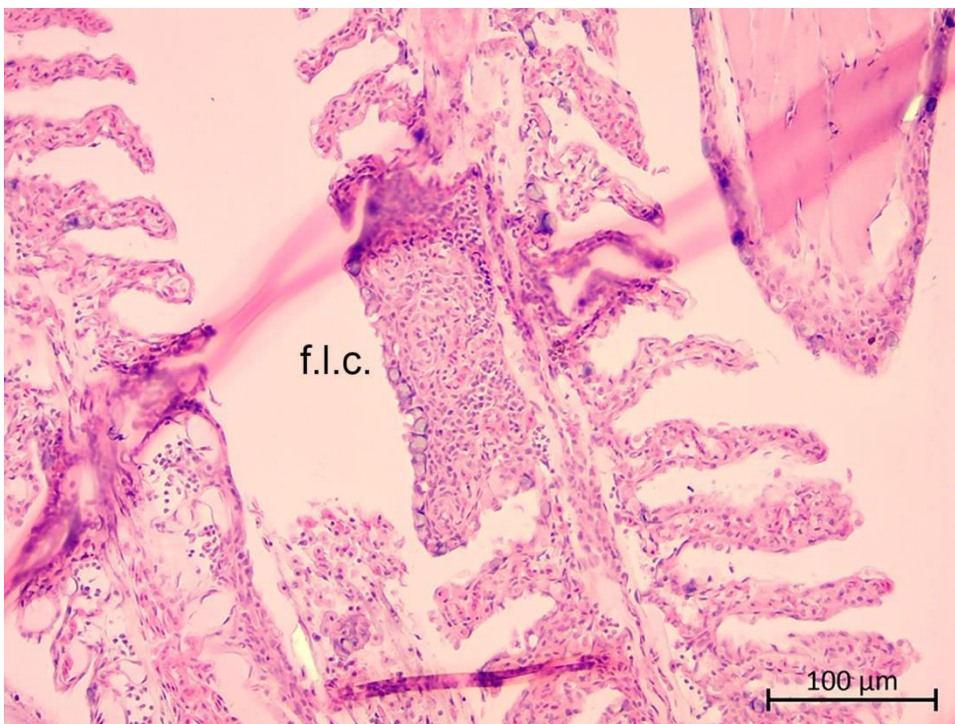


Figura 17. Outro caso de fusão lamelar completa (f.l.c.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 100X, H&E.

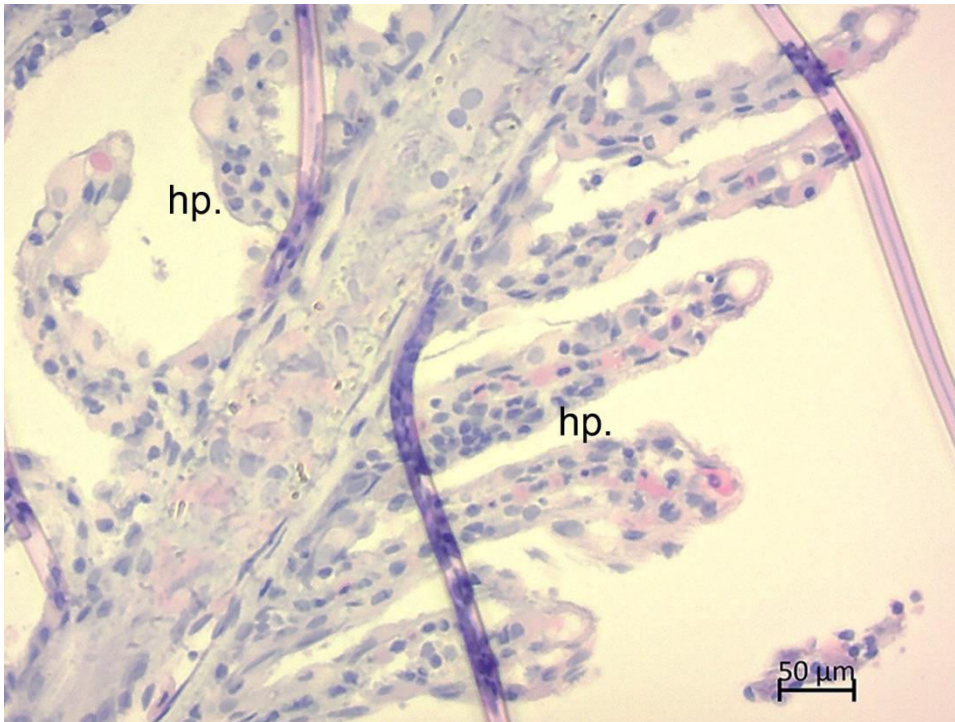


Figura 18. Hiperplasia de células epiteliais (hp.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

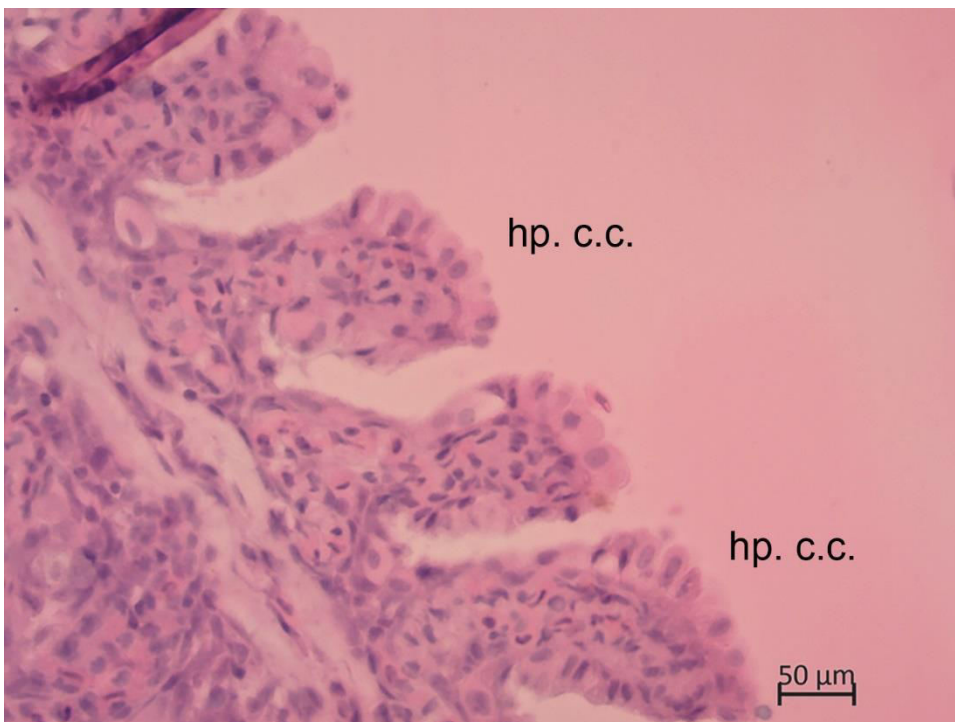


Figura 19. Hiperplasia de células de cloreto (hp. c.c.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

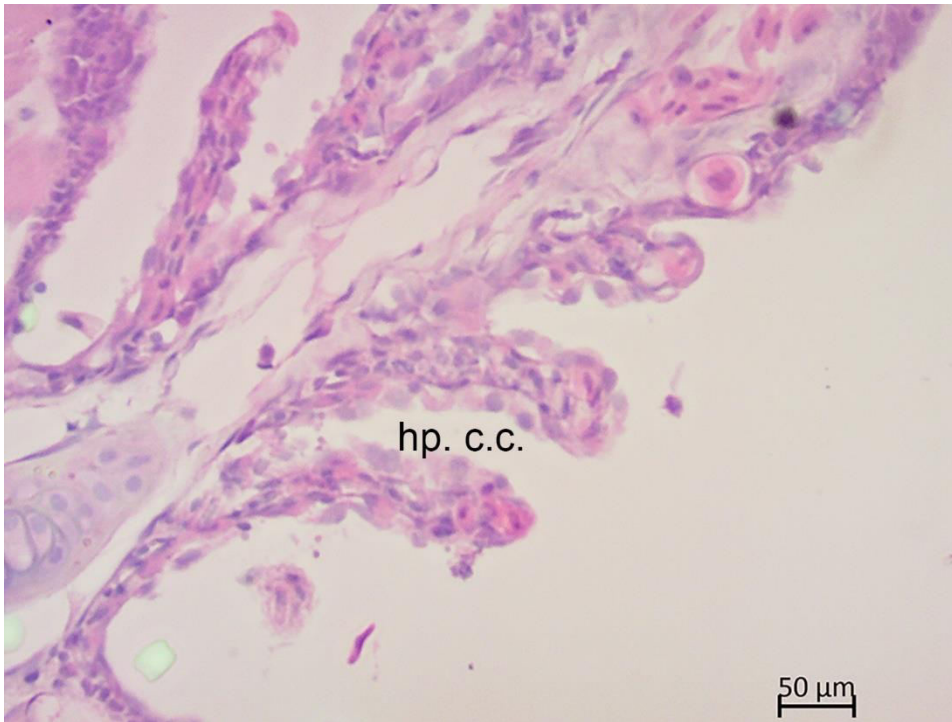


Figura 20. Outro caso de hiperplasia de células de cloreto (hp. c.c.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.



Figura 21. Hiperplasia de células de muco (hp. c.m.) em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 100X, H&E.

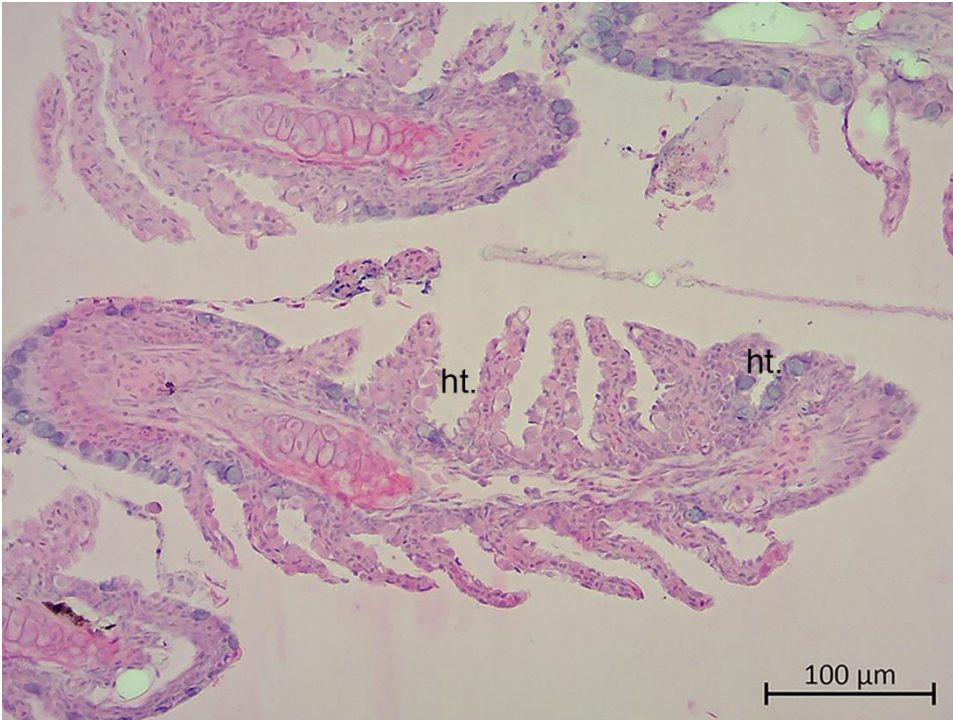


Figura 22. Alteração progressiva do tipo hipertrofia (ht.) de células de cloreto e células de muco, observada em brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 100X, H&E.



Figura 23. Alterações nucleares (a.n.) em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

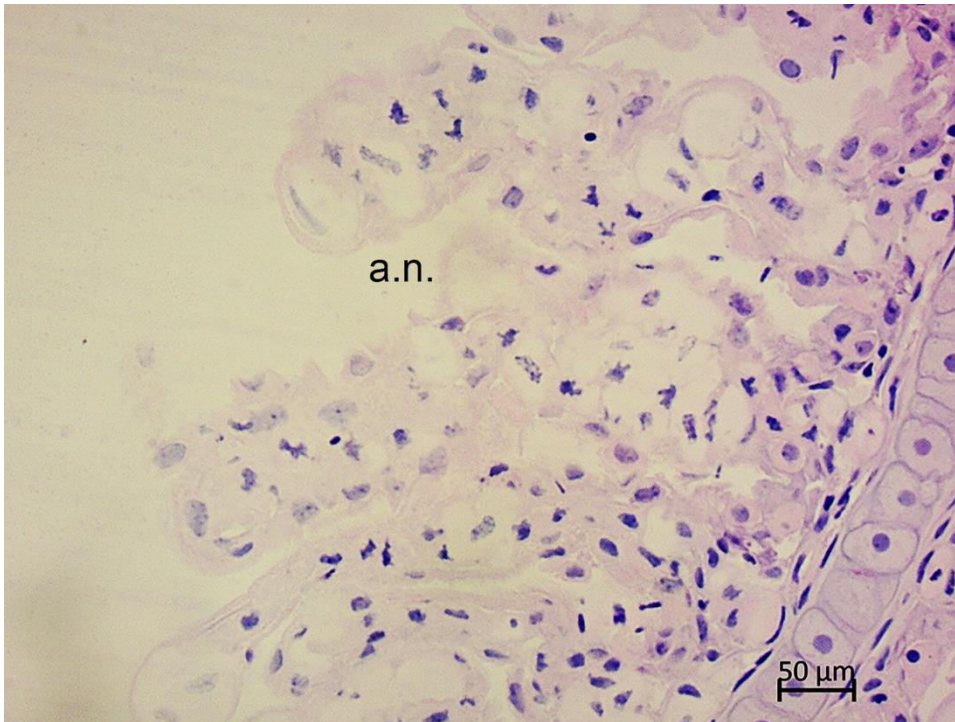


Figura 24. Outro caso de alterações nucleares (a.n.) em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.



Figura 25. Mais uma observação de alterações nucleares (a.n.) em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

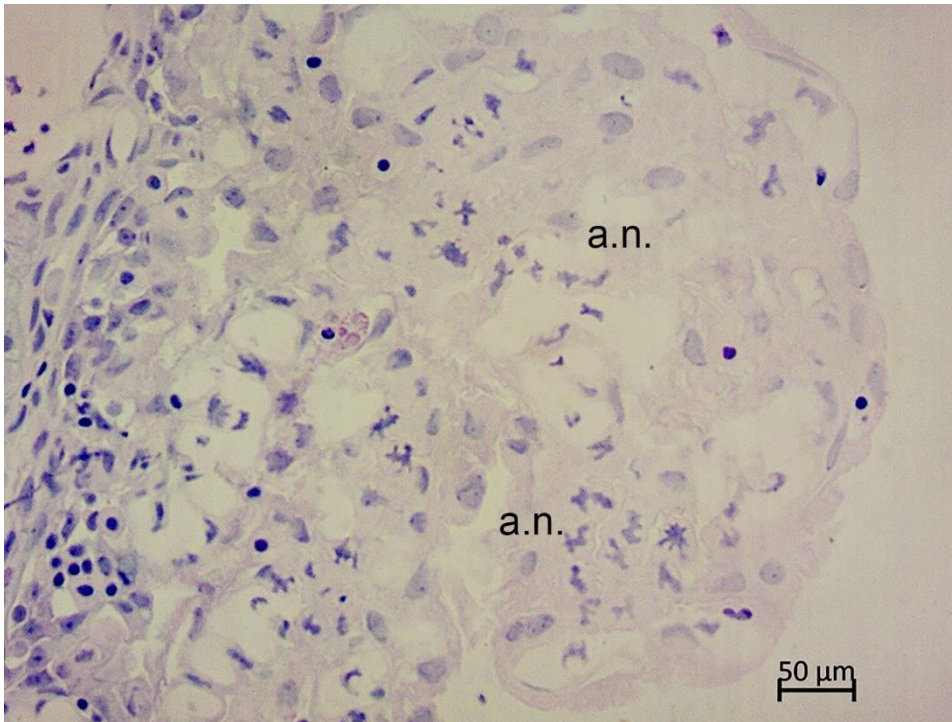


Figura 26. Outra observação de alterações nucleares (a.n.) em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

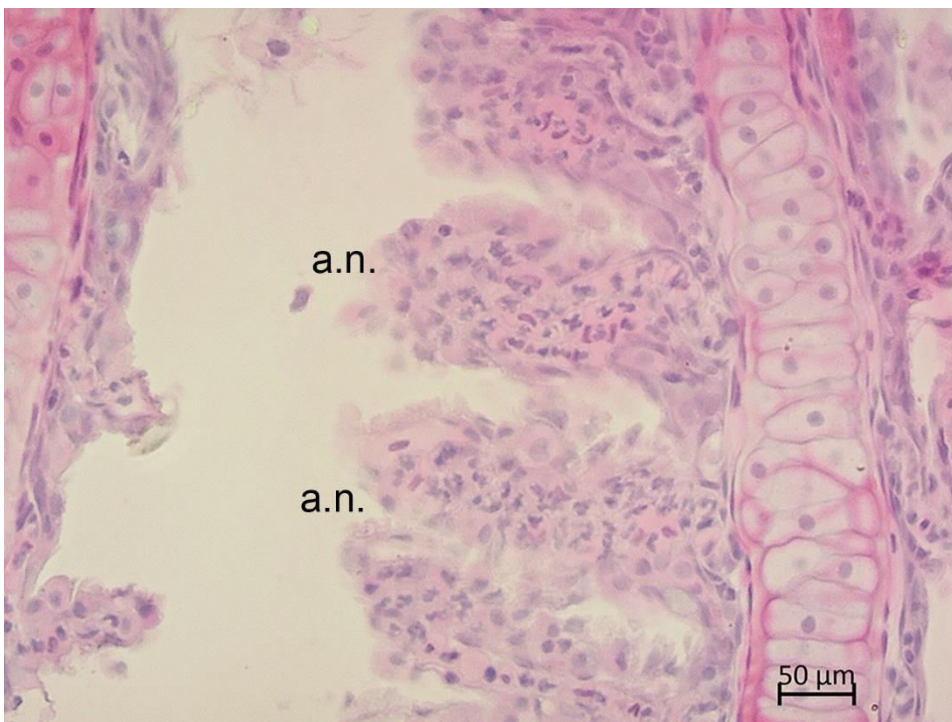


Figura 27. Alterações nucleares (a.n.) observadas em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

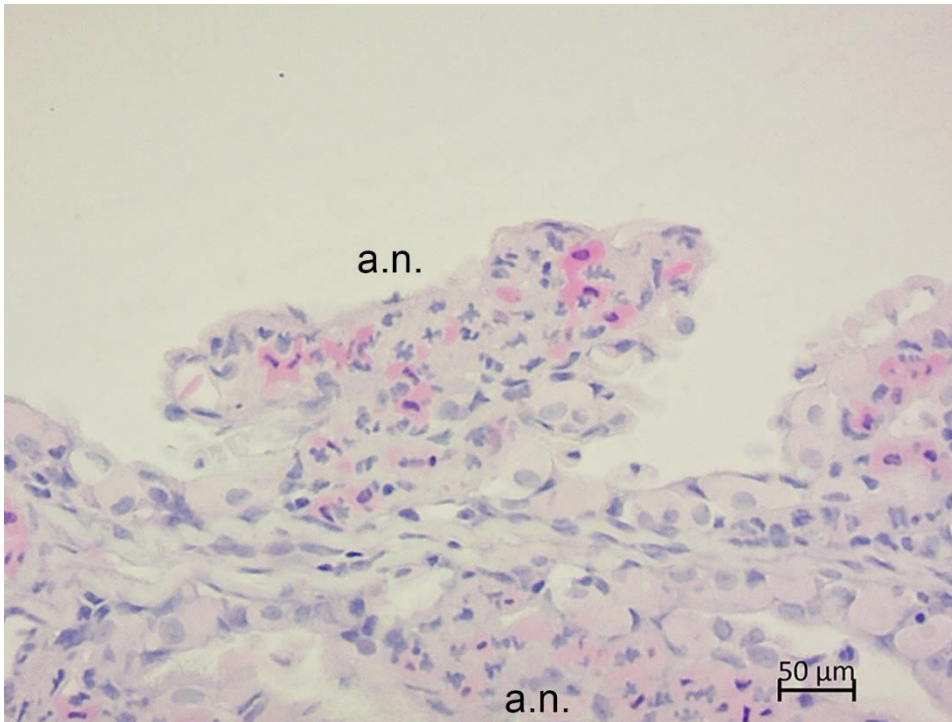


Figura 28. Alterações nucleares (a.n.), classificada como mudanças regressivas (RP2), em células de brânquias de *H. mustelinus* coletados em riachos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, aumento de 400X, H&E.

5. DISCUSSÃO

Muitos outros estudos também utilizaram a histopatologia de brânquias como indicador de saúde de peixes frente a exposição a contaminantes/poluentes e, assim como este trabalho, ajudam a confirmar a representação de uma ferramenta razoável para a área de estudos ecotoxicológicos (ITO, 2013; LIMA *et al.*, 2018; MAHARAJAN *et al.*, 2016; MARINOVIĆ *et al.*, 2021; NEVES *et al.*, 2018; NIMET *et al.*, 2019; RAUTENBERG *et al.*, 2016). A morfologia da brânquia dos bagres-enguia, se assemelha à morfologia típica de teleósteos de água doce, com as mesmas unidades estruturais: arco branquial, filamentos e lamelas (WEGNER, 2011). A presença de contaminantes na água induzem mudanças no funcionamento e/ou na estrutura das brânquias e por isso podem ser considerados biomarcadores úteis (PEREIRA *et al.*, 2013). O uso do índice desenvolvido por Bernet *et al.* (1999) possibilita uma análise semiquantitativa, que aparenta ser uma vantagem sobre trabalhos descritivos pois consegue quantificar a intensidade das alterações e facilita a comparação entre localidades, períodos (MARINOVIĆ *et al.*, 2021) e até mesmo com outros trabalhos. O índice histológico do órgão (Iorg) deste trabalho apresentou valores elevados (representativos de alto dano no órgão) e uma alta variação entre indivíduos do mesmo grupo, até mesmo algumas vezes dentro do mesmo ponto (Figura 4). Isso seria uma evidência de que todos os locais estão afetados, independentes da classificação adotada, além do problema de alto desvio de valores quando envolve um trabalho em campo. As lesões, causadoras de mudanças morfológicas, observadas foram: elevação epitelial, alterações

nucleares do epitélio e do tecido suporte, desarranjo lamelar, constrição/dilatação de capilares sanguíneos, hipertrofia, hiperplasia de células (epitélio e tecido suporte) e alguns casos de necrose.

Quanto aos padrões de reação, separadamente, o RP1 apresentou valores baixos comparados aos outros padrões. Vreys *et al.* (2019) analisou brânquias de *H. mustelinus* da Argentina e também obteve mudanças de distúrbios circulatórios em uma frequência muito baixa (3%) comparado aos outros padrões (RP2, RP3 e RP5). A congestão (hiperemia) foi a mudança mais frequentemente observada e, segundo Bernet *et al.* (1999), tal mudança tem fator de importância 1, que significa que ela pode ser facilmente reversível quando a exposição ao agente estressor se encerra. Houveram situações de escore 0, nos pontos BR4 e BR15, ambos de julho, evidenciado pela Figura 5. Neste caso, os meses de julho podem ter apresentado valores menores por conta do vazão sanitário da época, ou seja, uma grande diminuição na aplicação de agrotóxicos e conseqüentemente uma menor exposição/contato no período.

Já as mudanças regressivas (RP2) apareceram mais vezes, com uma frequência de 100% para alterações estruturais/arquitetônicas do órgão (Tabela 4), que agrupa elevação epitelial para o tecido epitelial e mudanças como desarranjo lamelar, constrição e dilatação do capilar para o tecido suporte. Bernet *et al.* (1999) consideram as alterações citadas em fator de importância 1, que demonstra um bom sinal para a saúde dos demais peixes da área de estudo se houver esforço para cessar tais exposições, pois trata-se de mudanças imediatamente reversíveis. As alterações nucleares são lesões de maior importância patológica e foram vistas com bastante frequência nos pontos (de 49 a 100%). Segundo Bernet *et al.* (1999), possuem o fator de importância 2 e podem ser mudanças no formato do núcleo, como foram os casos observados neste trabalho. Dey *et al.* (2015) expuseram a observação de anormalidades na forma do núcleo em várias células de brânquias de *Heteropneustes fossilis* expostos a efluentes de uma fábrica de celulose, porém em microscopia eletrônica de transmissão (MET), que foi o que mais se aproximou ao observado neste projeto. Também houve casos de necrose (14% dos indivíduos), que é classificada a morfologia que a célula ou o tecido apresenta após perda de função definitiva (BERNET *et al.*, 1999). Essas duas últimas mudanças (alterações nucleares e necrose) possuem um espaço maior dedicado mais à frente nesta discussão.

O RP3 não apresentou diferenças significativas nas médias do índice histológico do padrão (IGP), porém ao analisar os pontos de forma pareada, foi possível identificar diferenças significativas entre um único pareamento entre um ponto do grupo A e outro do grupo B (BR06 e BR10, respectivamente), ambos de fevereiro (Figura 8). Neste caso, é uma evidência de heterogeneidade dentro dos grupos de classificação (A, B e C) e parece indicar que, apesar do ambiente do ponto de coleta parecer um local mais preservado ou com menor impacto antrópico, esta região pode apresentar agentes estressores em concentrações subletais que só podem ser

visualizados em uma escala intermediária de dano (em nível histológico, em um órgão) ou níveis inferiores (moleculares).

Não houve diferenças significativas para o índice histológico entre os 3 grupos de classificação, tampouco entre os meses de coleta (figura 3 e 4). Outros trabalhos de biomonitoramento também não conseguiram atingir o nível de diferenças significativas entre pontos de “baixo impacto” e áreas de “alto impacto”, provavelmente porque se desconhece a interação entre poluentes (chamado de efeito coquetel por Santos-Silva *et al.*, 2021) que existe em um contexto ambiental e também pois a definição *a priori* de um “local de baixo impacto” pode estar distorcido, uma vez que é impossível saber quais substâncias existem ali, somente depois de procedimentos da Química Analítica. Becker *et al.* (2021) evidenciaram que os grupos de classificação (utilizou-se a maioria desses mesmos pontos), após a identificação de compostos e suspeitos compostos na água, não estariam tão diferentes quanto o esperado. Isto é, alguns pontos evidenciaram maior similaridade de compostos identificados com pontos de outro grupo, do que pontos entre o mesmo grupo de classificação - no caso os pontos BR11 (grupo A) e BR14 (grupo C); e BR04 (grupo A) e BR13 (grupo B) (BECKER *et al.*, 2021). Dito isso, nenhuma mudança observada foi exclusiva de um grupo e também não houve o caso de um indivíduo com escore total de 0. Houve um grupo de classificação com a maior média para cada mês de coleta, sendo que o grupo C foi o mais alto para fevereiro, o grupo B (médio impacto) foi o mais alto para abril e o grupo A (baixo impacto) foi o de julho (Tabela 5). Este é mais um indício de que pode ter ocorrido a exposição ao agente estressor em todos os grupos e impossibilitou a distinção significativa, que foi observada no resultado estatístico.

Os meses de coleta aparentaram ter influência apenas na quantidade de compostos identificados e não nas lesões, sendo que houve uma tendência de maior número de compostos no mês de fevereiro, principalmente no grupo C (vermelho) que apresentou uma média de 13 agrotóxicos identificados no mês em questão e média de 4 no mês de abril (BECKER *et al.*, 2021). Apesar disso, os valores médios do Índice do órgão (Iorg) não expuseram o mesmo padrão, já que são bem similares mesmo nos diferentes meses de coleta (figura 4 e tabela 5). Logo, um dos argumentos possíveis é de que não exatamente a quantidade de compostos é o causador de elevadas alterações nas brânquias de *H. mustelinus* nas microbacias da BP3, mas sim alguns fatores como: 1) quais compostos/metabólitos; 2) em quais concentrações e 3) qual época estão presentes ou se compõe uma exposição constante/crônica. Tais fatores geram uma relação mais estreita de toxicidade e padrões de resposta para o grupo a ser biomonitorado. Além disso, a maioria das lesões de fator de importância 2 (quase a metade das mudanças observadas no presente trabalho) são passíveis de reversão pouco tempo depois que a exposição aos agentes estressantes é neutralizada (BERNET *et al.*, 1999).

Segundo Becker *et al.* (2021), houve a identificação de 3 compostos que prevaleceram, com frequência acima de 83% em todos os pontos analisados em seu trabalho (4 de cada grupo,

A, B e C), são eles: atrazina, dieetilatrazina (DEA) e 2-hidroxi-atrazina (este último em menor frequência, mas com média acima de 70%). Já desde os anos 2000, sabe-se que a atrazina (herbicida) e seus metabólitos fazem parte dos pesticidas mais comumente encontrados em águas subterrâneas e superficiais nos Estados Unidos da América (BARR *et al.*, 2007), e, inclusive, aparenta também ser o caso da área de estudo desta pesquisa. Ahmad *et al.*, (2021), em condições controladas de laboratório, concluiu que as lesões mais observadas foram hiperplasia do epitélio e elevação epitelial quando *Carpas-do-limo* estavam expostas a concentrações subletais de atrazina. Ambas mudanças também foram bastante observadas no presente trabalho, sendo que a hiperplasia (tanto do epitélio como tecido de suporte) foi a mudança que mais elevou as pontuações do IGP e, conseqüentemente, do Iorg. O mesmo foi visto por Ito (2013) ao analisar brânquias de *Astyanax aff. altiparanae*. Essa mudança progressiva, mais a mudança regressiva da elevação epitelial, constituem respostas primárias para potenciais agentes estressores, “[...] levando a uma diminuição da área de contato do órgão com o meio e conseqüente menor absorção do pesticida” (THOPHON *et al.*, 2003 *apud* GREGÓRIO, 2017, pg. 27). Ademais, a hiperplasia aumenta a distância do capilar sanguíneo com a superfície, em teoria podendo diminuir a absorção do composto tóxico, e em contrapartida afeta negativamente as trocas gasosas, que é a função primária do órgão (LIEBEL *et al.*, 2013). Entretanto, é difícil apontar uma relação de mudança específica e certa entre órgão e agente agressor pois, na maioria das vezes, as brânquias reagem de forma não-específica e diferentes fatores podem causar as mesmas alterações histológicas (MARINOVIĆ *et al.*, 2021).

Pereira *et al.* (2013), ao analisarem peixes em Portugal, encontraram mudanças parecidas com o caso deste trabalho - com algum nível de dano em todos os indivíduos, alta frequência de hiperplasia, elevação epitelial e dilatação do capilar sanguíneo marginal - e expuseram que tais respostas podem ser interpretadas como não-específicas e indicadoras de algum nível de estresse. Mais especificamente em *H. mustelinus*, Vreys *et al.* (2019) encontrou que a lesão “elevação das células pavimentosas” (junto com hipertrofia de células) foi a mais comum observada e foi encontrada mesmo no sítio com alto índice de qualidade ripária (RQI), bom índice de uso da terra (LUI) e ótimo índice de qualidade da água (WQI).

Da mesma forma que este trabalho, tais mudanças comentadas são também respostas primárias, indicativas de exposição a pesticidas (BALLESTEROS *et al.*, 2007, VREYS *et al.*, 2019) e foram observadas também em indivíduos do grupo de “menor impacto”. Além de ser a mudança mais comum relatada em peixes de água-doce, a elevação epitelial é uma das primeiras respostas, no nível organizacional dos tecidos, a pesticidas, águas de esgoto e metais pesados (RAUTENBERG *et al.*, 2015). Bernet *et al.* (1999) classifica tal mudança em “alterações estruturais/arquitetônicas” e expõe que é de importância patológica mínima e reversível quando a exposição ao agente estressor se encerra.

Apesar da baixa frequência, foram observados alguns casos de necrose que atingiu 14% dos indivíduos (7/50) e foi contabilizada nos 3 grupos de classificação (Tabela 4 e figuras 13 e 14). Quanto ao grupo A, foi vista apenas em um ponto de fevereiro e em 1 indivíduo, enquanto que no grupo B, apareceu em 3 peixes do mês de abril. No caso do grupo de alto impacto (grupo C), também foram 3 indivíduos, porém separados um em cada mês (1 em fev.; 1 em abril e 1 em julho). Santos-Silva *et al.* (2021) também observou que houve necrose em brânquias de zebrafish (*Danio rerio*) depois de expô-los a dois organofosforados (Temephos e Roundup) por 15 dias, além da alta frequência de observação de hiperplasia e elevação epitelial no órgão, como foi visto aqui, em concordância com este trabalho, porém é importante ressaltar que foi um trabalho feito em condições laboratoriais, em grandes concentrações. Marinović *et al.* (2021), por outro lado, encontrou diferenças significativas justamente para essas três mudanças comentadas, em relação à variação sazonal na qualidade da água do rio Tamis (Sérvia), ao analisar mudanças histológicas em bremas (*Abramis brama*) e destacou a importância dos biomarcadores histopatológicos em estudos de biomonitoramento, além de reforçar que é difícil relacionar tais lesões a uma exata substância, por conta do padrão de resposta do órgão. Uma mudança com o fator de importância máximo, que expõe uma irreversibilidade de funcionamento, é uma evidência de exposição crônica a poluentes, aqui representada pela observação da necrose, e, diferente da pesquisa em laboratório, a concentração no ambiente é menor, mas o tempo de exposição é maior.

O caso das “alterações nucleares”, observadas aqui sob a ótica de mudanças no formato do núcleo, se diferencia dos demais trabalhos citados, uma vez que não houve nenhuma menção a este tema. Foi possível observar vários núcleos com anormalidades (Figuras 23-28), similar ao que foi visto por Dey *et al.* (2015) com auxílio do MET em brânquias *Heteropneustes fossilis* (uma espécie de bagre) porém com uma deformação maior, capaz de ser vista em microscopia de luz. Cavas *et al.* (2005) encontrou que a frequência de micronúcleos (induzidos e espontâneos) em células epiteliais das brânquias foi significativamente maior que em eritrócitos, ao analisar 3 espécies de peixes e a exposição a certos compostos dos metais cobre, cádmio e cromo. Esse apontamento pode ser um indício da susceptibilidade das células das brânquias, que ficam em contato direto com o agente estressor e possuem um índice mitótico alto (CAVAS *et al.* 2005). Peixoto (2020) também encontrou alterações nucleares (com uma frequência de 100%) nos fígados de muitos dos mesmos indivíduos utilizados na análise, entretanto parece ser uma lesão mais conhecida no órgão, diferentemente das brânquias. Para análises mais precisas, o ideal seria fazer o teste de micronúcleos em células das brânquias de *H. mustelinus* e observar se os resultados se assemelham para a criação de um diagnóstico mais confiável.

Dito isso, a observação de alterações nucleares na histopatologia foi considerado por Bernet *et al.* (1999) e descrito como “mudanças no formato do núcleo e estrutura da cromatina”, porém os autores consideraram apenas cariopcnose e cariorrexe nos exemplos, que não se parece visualmente com o que foi observado no presente trabalho.

Por fim, cabe destacar que a observação de tais lesões, mesmo que seja nos três grupos de classificação (que em certo nível pareciam ser distintos), é algo informativo para a identificação de alguma fonte (ou várias) de estresse para a espécie analisada na região da Bacia Hidrográfica do Paraná 3. Tais mudanças indicam que todos os pontos de coleta estão impactados e já sofreram mudanças, o próximo passo é descobrir mais a fundo o porquê das lesões nas brânquias dos bagres-enguia.

6. CONCLUSÕES

Por meio deste trabalho foi possível concluir que existe um certo grau de toxicidade, por poluentes, em contato com as brânquias de *H. mustelinus*. Nenhum indivíduo apresentou uma brânquia livre de lesões. Os padrões de reação 2 e 3 (mudanças regressivas e progressivas, respectivamente) foram mais frequentemente observados e somaram quase todo o valor do Índice do Órgão, na grande maioria dos casos. Mais especificamente para mudanças regressivas, a categoria de lesão mais observada foram as “alterações estruturais/arquitetônicas” - que contam com elevação epitelial, dilatação e constrição do capilar sanguíneo - em 100% dos indivíduos. Para o padrão de reação 3 (mudanças progressivas), a mudança observada em 100% dos indivíduos e, a mais frequente, foi a hiperplasia (em certos casos no epitélio, em outros no tecido suporte ou nos dois).

O biomarcador de histopatologia em órgãos foi uma ferramenta útil para analisar o grau de saúde dos peixes, apresentando valores relativamente altos. A metodologia semiquantitativa de Bernet *et al* (1999) conseguiu fornecer dados mais completos de cada indivíduo. Não foi possível identificar diferenças significativas entre os pontos de classificação (de A: baixo impacto; B: médio impacto e C: alto impacto) mas as pontuações indicam uma situação de exposição a agentes estressores em todos os grupos de riachos analisados.

Não foi possível identificar claramente o que está causando esse efeito pois as lesões observadas aparentam ser não específicas, porém fica evidente que a região toda está bastante afetada, justamente porque os pontos apresentaram valores próximos entre si. Pode ser que a relação com a exposição à atrazina e seus metabólitos, por ser o poluente mais frequentemente observado na região do estudo, porém mais trabalhos precisam ser feitos para verificar a relação.

7. REFERÊNCIAS

AAZAMI J., ESMAILI-SARI A., ABDOLI A., SOHRABI H., VAN DER BRINK P. J. **Monitoring and assessment of water health quality in the Tajan River, Iran using physicochemical, fish and macroinvertebrate indices.** Journal of Environmental Health Science & Engineering.13(1): 2–12. 2015.

ADAPAR, 2022. disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2022-05/dados_siaqro_21_1.xls acessado em: 04/06/2022.

AHMAD, W. , SULTAN, A. , JAN, S. , ALI, A. , RAHMAN, I. , USMAN, H. , SHER, A. , KHAN, N. S., KHAN, Z., KHAN, A. **Environmental Risk of Atrazine (Herbicide) to Brain, Gills and Liver Tissues of Fish *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844)**. Journal of Geoscience and Environment Protection, v.9, p. 1-16. 2021.

AMORIM, L. C. A. **Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais**. Revista Brasileira de Epidemiologia [online]. v. 6, p. 158-170. 2003a.

AMORIM, L. C. A. **The use of biomarkers in the assessment of occupational exposure to chemical substances**. Revista Brasileira de Medicina do Trabalho. v.1(2), p.124-132. 2003b.

BARR D. B., PANUWET P., NGUYEN J. V., UDUNKA S., NEEDHAM L. L. **Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring**. Environ Health Perspect. Oct;v.115(10), p.1474-8. 2007.

BECKER, R. W., ARAÚJO, D. S., SIRTORI, C., TOYAMA, N. P., TAVARES, D. A., CORDEIRO, G. A., do AMARAL, B. **Pesticides in surface water from Brazil and Paraguay cross-border region: Screening using LC-QTOF MS and correlation with land use and occupation through multivariate analysis**. Microchemical Journal, v.168. 2021.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. – **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution**. Journal of Fish Diseases, v.22, p. 22-34, 1999.

BRASIL. **Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União. 11 jul 1989.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B.R - **Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream**. Neotropical Ichthyology, v. 5(3), p. 327-336, 2007.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil**. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. v. 279, p. 13-51. 2003.

DAMASIO, D. **Bioindicadores na avaliação ambiental em um rio de abastecimento público**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 46p. 2017.

DELLA FLORA, A.; BECKER, R.W.; BENASSI, F.S.; TOCI, A.T.; CORDEIRO, G.A.; IBÁÑEZ, M.; PORTOLÉS, T.; HERNÁNDEZ, F.; BOROSKI, M.; SITORI, C. – **Comprehensive investigation of pesticides in Brazilian surface water by high resolution mass spectrometry screening and gas chromatography-mass spectrometry quantitative analysis**. Science of the Total Environment. v. 699, p. 248-257, 2019.

DEY, S., RAJGURU, U., PATHAK, D. C., GOSWAMI, U. C. **Analysis of Gill Structure from a Fresh Water Fish (*Heteropneustes fossilis*) Exposed to Bleached Sulfite Pulp Mill Effluents**. Microscopy and Microanalysis, v. 21(02), p. 385–391. 2015.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY (ECHA), 2022. Disponível em: <https://echa.europa.eu/pt/substance-information/-/substanceinfo/100.014.376>. Acessado em: 18/01/2023.

FUSTER, D. R. F. **Revisão taxonômica de *Heptapterus mustelinus* (Valenciennes, 1835) (Siluriformes: Heptapteridae)**. 2017. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre. 82p. 2017.

GABOARDI, S., CANDIOTTO, L., Ramos, L. **Perfil de uso de agrotóxicos no sudoeste do Paraná (2011 – 2016)/Profile of pesticides use in the southwest of Paraná (2011-2016)**. REVISTA NERA. p. 13-40. 2019.

GIANESINI, M. E. **Bagre de Pedra (*Heptapterus mustelinus*)**. Disponível em: <http://www.aquarismopaulista.com/heptapterus-mustelinus/>. Publicado: mar.2021. Acesso em: 23/07/2022.

GONSALES, P. L. B.; BROCARDI, C. R.; COSTA, G. de O. N.; RAMIRO, S. M.; DELARIVA, R. L. **Intoxicações exógenas por agrotóxicos no oeste do Paraná, Brasil/ EXOGENOUS INTOXICATIONS BY PESTICIDES IN THE WEST OF PARANÁ, BRAZIL**. International Journal of Environmental Resilience Research and Science - IJERRS, [S. l.], v. 3, n. 1, 2021.

GREGÓRIO, R. de O. **Lesões histopatológicas dos tecidos sanguíneo, hepático branquial de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivados em áreas suscetíveis à contaminação por pesticidas**. 2017. 34 págs. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável do Setor Palotina, Departamento de Zootecnia - Universidade Federal do Paraná (UFPR), Palotina. 2017.

HAMMER, O., HARPER, D., RYAN, P. **PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. Palaeontologia Electronica. v. 4. p. 1-9. 2001.

IPEA, 2019: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2496.pdf

ITO, K. M. **Histopatologia de brânquia e fator de condição de *Astyanax aff. paranae* (pisces) como indicadores de contaminação aquática no centronoroeste do Paraná**. 2013. 42p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2013.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13. ed. Guanabara Koogan S.A., p. 8-9. 2017.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S.A. **Exposure to pesticides and the associated human health effects**. Science of the Total Environment, v.575, p. 525-535, 2016.

LOPES C. V. A., ALBUQUERQUE G. S. C. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática**. Saúde Debate; v. 42, p. 518-534. 2018.

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

LIMA, L. B. D. de, MORAIS, P. B. de, ANDRADE, R. L. T. de, MATTOS, L. V., MORON, S. E. **Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture**. Environmental Pollution, v. 237, p. 611–624. 2018.

MAHARAJAN, A., KITTO, M. R., PARURUCKUMANI, P. S., & GANAPIRIYA, V. **Histopathology biomarker responses in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) exposed to copper**. The Journal of Basic & Applied Zoology, v. 77, p. 21–30. 2016.

- MARINOVIĆ, Z., MILJANOVIĆ, B., URBÁNYI, B., LUJIĆ, J. **Gill Histopathology as a Biomarker for Discriminating Seasonal Variations in Water Quality**. Applied Sciences, v. 11, n. 20, p. 9494, 13 out. 2021.
- MATIAS, T. P., BRAGA, J. K., DAMASCENO, L. H. S., BRUCHA, G. **Aspectos envolvidos na biodegradação da atrazina sob diferentes condições de oxirredução**. Research, Society and Development, v. 10(8), 2021.
- NEVES M. P., de ARRUDA AMORIM J. P., DELARIVA R. L. **Influence of land use on the health of a detritivorous fish (*Ancistrus mullerae*) endemic to the Iguassu ecoregion: relationship between agricultural land use and severe histopathological alterations**. Environmental Science Pollution Research. v. 25(12), p. 11670-11682. 2018.
- NIMET J., NEVES M.P., VIANA N.P., AMORIM, J.P.A., DELARIVA R.L. **Histopathological alterations in gills of a fish (*Astyanax bifasciatus*) in Neotropical streams: negative effects of riparian forest reduction and presence of pesticides**. Environmental Monitoring and Assessment v. 192 (1), p. 1–13. 2019.
- PEIXOTO, L.S.V. **EFEITOS DE MICROPOLUENTES EM FÍGADO DE PEIXES COLETADOS EM RIACHOS DE BACIAS QUE DRENAM PARA O RESERVATÓRIO DA ITAIPU BINACIONAL (BRASIL E PARAGUAI)**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu. 104p. 2020.
- PEREIRA, S., PINTO, A. L., CORTES, R., FONTAÍNHA-FERNANDES, A., COIMBRA, A. M., MONTEIRO, S. M. **Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 90, p. 157–166. 2013.
- PIANCINI, L. D. **Biomonitoramento do rio Iguaçu em dois pontos utilizando como bioindicador peixes do gênero *Astyanax* (Characiforme, Characidae)**. Monografia de conclusão de curso. Departamento de Genética. Universidade Federal do Paraná. 2008.
- PRISTA, J., UVA, A. de S. **A utilização de indicadores biológicos em saúde ocupacional**. Escola Nacional de Saúde Pública. Universidade NOVA de Lisboa. 2006.
- RAUTENBERG, G.E.; AMÉ, M.V.; MONFERRAN, M.V.; BONANSEA, R.I.; HUED, A.C. - **A multi-level approach using *Gambusia affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle-lower basin of Suquíá River**. Ecological Indicators v. 48, p. 706–720, 2015.
- RIBAS, P. P., MATSUMURA, A. T. S. **A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente**. Revista Liberato, v. 10(14), p. 149–158. 2013.
- ROCHA, M. C. **O papel das florestas preservadas contra os efeitos dos agrotóxicos e da radiação solar ultravioleta em girinos e o potencial de pequenas propriedades rurais na redução de impactos**. 2020. 110f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Animal) - Programa de Pós graduação em Biodiversidade Animal na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2020.
- ROHR, J. R., MCCOY, K. A. **A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians**. Environ Health Perspect. v. 118(1), p. 20-32. 2010.

ROCHA, A. S. da; NÓBREGA, M. T. de; CUNHA, J. E. da. As unidades de paisagem, as vertentes características e os sistemas pedológicos na bacia hidrográfica do Paraná 3. **Ateliê Geográfico**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 51–70, 2018.

SANTANA, L. M. B. M. **Biomarcadores histopatológicos para o monitoramento ambiental da bacia do ribeirão Jacutinga (Londrina, PR)**. 2004. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

SANTOS-SILVA, T., RIBEIRO, R. I. M. de A., ALVES, S. N., THOMÉ, R. G., dos SANTOS, H. B. **Assessment of the Toxicological Effects of Pesticides and Detergent Mixtures on Zebrafish Gills: a Histological Study**. Brazilian Archives of Biology and Technology [online]. 2021, v. 64. 2021.

SOARES, W. L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. (Tese de doutorado). Programa de Pós graduação em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rio de Janeiro: 163 p. 2010.

SILVA, A. de S. **Avaliação do efeito toxicológico de Atrazina na retina de alevinos de Collossoma macropomum (CIVIER 1818)**. 2018. 71f. Dissertação (Mestrado em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos, Universidade Federal do Oeste do Pará. 2018. Santarém, 2018.

SHAH, Z.U., PARVEEN, S. **Oxidative, biochemical and histopathological alterations in fishes from pesticide contaminated river Ganga, India**. Scientific Reports, v. 12, 2022.

THOPHON, S.; KRUAETRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. **Histopathological alterations of white seabass, Lates calcarifer, in acute and subchronic cadmium exposure**. Environmental Pollution, v. 121, n. 3, p. 307-320, 2003.

VEIGA, M. M. **Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental**. Ciência & Saúde Coletiva [online]. v. 12, n. 1 [Acessado 15 Junho 2022], p. 145-152. 2007.

VREYS, N. **Evaluación de la calidad de agua de un sistema lótico y área terrestre de influencia, en relación a respuestas biológicas en la especie íctica *Heptapterus mustelinus***. Dissertação de mestrado pela Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales da Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 2015.

VREYS, N.; AMÉ, M. V.; FILIPPI, I.; CAZENAVE, J.; VALDEZ, M. E.; BISTONI, M. A. - **Effect of landscape changes on water quality and health status of heptapterus mustelinus (Siluriformes, Heptapteridae)**, Arch Environ Contam Toxicol., v. 76(3), p. 453-468, 2019.

WEGNER, N. C. **Gill respiratory morphometrics**. Em: **Encyclopedia of fish physiology: From genome to environment**. San Diego: Elsevier Inc., p. 803–811. 2011.

YANCHEVA, V.; VELCHEVA, I.; STOYANOVA, S.; GEORGIEVA, E.- **Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review**. Applied Ecology and Environmental Research v. 14(1): p. 47-75, 2016.