



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL**

**EFEITOS DE MICROPOLUENTES EM FÍGADO DE PEIXES COLETADOS EM
RIACHOS DE BACIAS QUE DRENAM PARA O RESERVATÓRIO DA ITAIPU
BINACIONAL (BRASIL E PARAGUAI)**

LILIAM DA SILVA VEIGA PEIXOTO

Foz do Iguaçu
2020



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL**

**OS EFEITOS DE MICROPOLUENTES EM FÍGADO DE PEIXES
COLETADOS EM RIACHOS DE BACIAS QUE DRENAM PARA O
RESERVATÓRIO DA ITAIPU BINACIONAL (BRASIL E PARAGUAI)**

LILIAM DA SILVA VEIGA PEIXOTO

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação Biodiversidade Neotropical, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito de avaliação para à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes

LILIAM DA SILVA VEIGA PEIXOTO

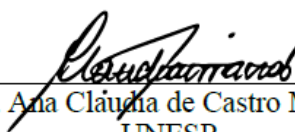
**OS EFEITOS DE MICROPOLUENTES EM FÍGADO DE PEIXES
COLETADOS EM RIACHOS DE BACIAS QUE DRENAM PARA O
RESERVATÓRIO DA ITAIPU BINACIONAL (BRASIL E PARAGUAI)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Pablo Henrique Nunes
Orientador
UNILA



Dra. Ana Cláudia de Castro Marcato
UNESP



Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira
UNILA

Foz do Iguaçu, 27 de agosto de 2020.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

P379e

Peixoto, Liliam da Silva Veiga.

Efeitos de micropoluentes em fígado de peixes coletados em riachos de bacias que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional (Brasil e Paraguai) / Liliam da Silva Veiga Peixoto. - Foz do Iguaçu, 2020.

94 f.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical.

Orientador: Pablo Henrique Nunes.

1. Toxicologia ambiental - Reservatório da Itaipu Binacional. 2. Toxicologia - fígado - peixes. 3. Histopatologia - peixes. I. Nunes, Pablo Henrique, Orient. II. Título.

CDU: 615:597.2/.5

AGRADECIMENTOS

Primeiramente louvo a Deus por sempre estar disposto a realizar propósitos em minha vida. Este Mestrado é um dos projetos que apresentei ao Senhor há alguns anos e ele me concedeu a oportunidade de realizá-lo.

Agradeço a minha família, que foi meu grande apoio nessa jornada, ao amor e paciência do meu esposo Everton e dos meus filhos Heloísa e Luiz Otávio, por se dedicarem junto comigo nesse desafio. As orações de minhas irmãs Zeni, Clau e Leila.

Homenageio meu pai, Luiz Veiga, que aos 80 anos de idade retomou seu sonho de adolescente e voltou a estudar para terminar seu ensino fundamental. Isso é a maior prova de que sempre é tempo de realizar seus sonhos. Obrigada Pai por ser esse exemplo!

Ao meu orientador Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes, por aceitar ser meu orientador, quando eu não tinha nem uma linha de pesquisa a seguir, mas ali em uma conversa de cinco minutos, eu apresentei o desejo de realizar um projeto de vida e ele logo me ofereceu o caminho e ideias incríveis. Obrigada Prof. Pablo pelos seus ensinamentos, paciência e parceria e por dividir até seus amigos queridos de Rio Claro.

Agradeço as minhas amigas e irmãs na fé, Dani e Sandroca por intercederem pela minha vida e me apoiarem em todas os desafios, sejam eles pessoais ou profissionais.

Minhas amigas e parceiras na vida, Solange, Mixirikits, Carlinha e Amandinha, obrigada por me apoiarem e dividirem seus conhecimentos tão preciosos comigo. Devo muito a vocês.

Ao Prof. Dr. Cleto Kaveski Peres, o grande mentor da parte ecológica do Projeto Micropoluentes II, pelo amor e dedicação a Biologia, pelo brilho nos olhos com que você nos apresentou este projeto e por estar sempre disposto a nos ajudar em tudo.

A Itaipu Binacional pelo financiamento deste projeto, em especial ao apoio de Simone Frederegi Benassi, Jussara Elias de Souza e Maria Eva.

A Profa. Dra. Thatiana Corrêa de Melo pelos ensinamentos, amizade, competência profissional e pelo prazer de dividir comigo a verdadeira essência do papel do biólogo

através dos olhos do seu avô, que com toda pureza nos ensina que nossa missão como biólogos “é a de cuidar da saúde do planeta todinho”.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Garcia, pelo apoio e por estar a frente das coletas dos peixes que foram tão preciosos para nossos estudos. Obrigada a todos que estiveram em campo realizando esse árduo trabalho: Prof. Pablo, Carol, Mateus, Pilar, Jerson, Diego, Pedro e Richard.

Ao grupo de pesquisa do Projeto Micropoluentes, que trabalhou com toda dedicação no laboratório: Profa. Thatiana, Gilson, Mateus, Carol, Antonella, Allan, Denis, Dulce, Giovane, Pedro, Marina, Vilmara e Mariel.

Ao grupo de pesquisa da química pelo trabalho na detecção dos micropoluentes: Profa. Dra. Gilcelia Cordeiro, Profa. Dra. Carla Sirtori, Raquel Wiele Becker e Bianca do Amaral.

A equipe que me recebeu de braços abertos na UNESP em Rio Claro: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo, Silvana, Iza, Gerson e Cris. Em especial a Silvana e Amélia pelo apoio e “abrigo” na cidade.

As minhas colegas de Mestrado: Giseli, Gessyca, Denise e Pilar, obrigada pela amizade e apoio.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical da UNILA, pela oportunidade de crescimento acadêmico, em especial ao Celso que sempre resolveu nossos problemas na secretaria do programa com toda alegria e paciência.

Obrigada a UNILA pela concessão da licença para o Mestrado e a equipe do DELABEN, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Meu agradecimento mais profundo é dedicado à minha mãe, Judit da Silva Veiga, que não está mais ao meu lado para dividir esse momento, mas sua essência está dentro do meu coração, nos seus ensinamentos, valores e nas doces lembranças do seu carinho.

Obrigada mãe por seu meu primeiro exemplo de mulher independente e por sempre lutar para que pudéssemos ter acesso a educação. Você tinha razão, o conhecimento é um grande tesouro.

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). 2020. 104 páginas. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

A contaminação em ecossistemas aquáticos pode ser monitorada por estudos na área de ecotoxicologia e, nesses ambientes, os peixes atuam como bioconcentradores de substâncias presentes em concentrações muito reduzidas na água, como os micropoluentes. Análises histopatológicas em órgãos como fígado, que apresentam importante papel na detoxificação, informam marcadores importantes para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. As áreas de entorno do Reservatório da Itaipu Binacional, apresentam atividade agrícola com amplo uso de agrotóxicos em seu sistema de produção, que acabam tornando suas bacias susceptíveis a contaminação por micropoluentes. No presente estudo, foram utilizados peixes da espécie *H. mustelinus* para auxiliar no monitoramento de riachos de bacias que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional (Brasil e Paraguai) frente a presença desses micropoluentes. Foram coletados o total de 110 peixes, 56 amostras no Brasil e 54 no Paraguai, originados de riachos da Bacia, sendo 13 microbacias da margem brasileira e 11 microbacias da margem paraguaia. Para seleção dos riachos foram utilizados dois critérios: qualidade da água (presença de micropoluentes) e uso do solo para atividade agrícola, estabelecendo-se 03 grupos categóricos de impacto para os riachos: A (baixo impacto); B (médio impacto); C (alto impacto). Análises semi-quantitativas foram realizadas no fígado dos peixes e 05 padrões de reações de alterações histológicas foram considerados (1. Distúrbios Circulatórios; 2. Mudanças Regressivas; 3. Alterações Regressivas; 4. Inflamações; 5. Tumores). A partir das análises, foram calculados índices histológicos que permitem verificar o grau de comprometimento do órgão frente à ação ambiental. O Índice de Padrão de Reação (I_{rp}) que mede a extensão de cada padrão de alteração e o Índice de Órgão (I_{org}) que mede o grau de dano total no fígado para os indivíduos de *H. mustelinus*, permitiram inferir quantitativamente os achados histopatológicos. Após análises foi observada a ocorrência de algum tipo de alteração histológica em todas as amostras analisadas, classificadas na sua maioria em três dos cinco padrões de reação. Os Índices Histológicos demonstraram que o grau de dano observado no fígado dos espécimes coletados nas microbacias de menor impacto da margem brasileira estão mais comprometidos do que as amostras dos peixes coletadas nas mesmas microbacias da margem paraguaia, coincidindo com os resultados das análises qualitativas de água dos riachos e dos testes mutagênicos, indicando que estas microbacias brasileiras podem estar sofrendo influência de mais fatores xenobióticos no ambiente do que as microbacias do mesmo grupo no Paraguai.

Palavras-chave: Bioindicadores. Ecotoxicologia. *Heptapterus mustelinus*. Histopatologia. Microbacias.

PEIXOTO, L.S.V. –EFFECT OF MICROPOLLUTANTS ON FISH LIVER COLLECTED IN BASIN STREAMS THAT DRAIN TO THE BINACIONAL ITAIPU RESERVOIR (BRAZIL AND PARAGUAY). 2020. 104 pages. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

Contamination in aquatic ecosystems can be monitored by studies in the area of ecotoxicology and, in these environments, fish act as bioconcentrators of substances present in very low concentrations in the water, such as micropollutants. Histopathological analyzes on organs such as the liver, which play an important role in detoxification, inform important markers for biomonitoring aquatic ecosystems. The area surrounding the Itaipu Binacional Reservoir have agricultural activity with wide use of pesticides in their production system, which make their basins susceptible to contamination by micropollutants. In the presente study, fish of the species *H. mustelinus* were used to assist in the monitoring of basin streams that drain to the Binacional Reservoir (Brazil and Paraguay) in the presence of micropollutants. A total of 110 fishes were collected, 56 samples in Brazil and 54 in Paraguay, collected in streams of Basin, with 13 microbasin on the Brazilian margin and 11 microbasin on the Paraguayan margin. For the selection of streams, two criteria were used: water quality (presence of micropollutants) and land use for agricultural activity, establishing 03 categorical groups of streams: A (low impact); B (medium impact); C (high impact). Semi-quantitative analyzes were performed on the liver of the fish and 05 reaction patterns of histological changes were considered (1. Circulatory Disturbances; 2. Regressive Changes; 3. Progressive Changes; 4. Inflammation; 5. Tumors). From the analyzes, histological indexes were calculated that allow to verify the degree of the organs commitment due to environmental action. The Reaction Pattern Index (Iorg rp) which measures the extent of each alteration pattern and the Organ Index (Iorg) which measures the degree of total liver damage for individuals of *H. mustelinus*, allowed to quantitatively infer histopathological findings. After analysis, it was observed the occurrence of some type of histological alteration in all analyzed samples, classified mostly in three of the five reaction patterns. The Histological Indexes demonstrated that the degree of damage observed in the liver of specimens collected in the lower impact microbasin of the Brazilian margin are more compromised than the fish samples collected in the same microbasin on the Paraguayan margin, matching with the results of qualitative analyzes of water of the streams and mutagenic tests, indicating that these Brazilian microbasins may be influenced by more xenobiotic factors in the environment than the microbasins of the same group of in Paraguay.

Keywords: Bioindicators. Ecotoxicology. *Heptapterus mustelinus*. Histopathology. Microbasins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Heptapterus mustelinus</i>	29
Figura 2 - Mapa do Brasil com localização da área de estudo.	31
Figura 3 – Pontos de coleta (microbacias) que drenam para o reservatório da Itaipu (Brasil e Paraguai)	33
Figura 4 - Dissecção de <i>H. mustelinus</i> , processamento das amostras e confecção de lâminas histológicas.....	36
Figura 5 - Morfologia do fígado de <i>H. mustelinus</i>	45
Figura 6 - Alterações histológicas de fígado em <i>H. mustelinus</i> (núcleo e degeneração celular).....	48
Figura 7 - Alterações histológicas de fígado em <i>H. mustelinus</i> (vacuolização, necrose e hemorragia).	49
Figura 8 – Frequência (%) das Alterações Histológicas identificadas em amostras de fígado de <i>H. mustelinus</i> , coletados em margens brasileira (A) e paraguaia (B)	51
Figura 9 -Perfil dos índices histológicos das alterações: Hemorragia, Deg. Vacuolar e Alteração na Arquitetura do Tecido em <i>H. mustelinus</i> . (BR e PY).	53
Figura 10 – Perfil dos índices histológicos das alterações: Hipertrofia Celular, Alt. Núcleo e Necrose (BR e PY).....	54
Figura 11 – Comparação (Br e Py) do índice histológico das alterações: Hemorragia, Deg. Vacuolar e Alt. na Arquitetura em <i>H. mustelinus</i>	56
Figura 12 – Comparação dos índices histológicos das alterações alterações: Hip. Celular, Alt. no Núcleo e Necrose	58
Figura 13 – Comparação das alterações histológicas em <i>H. mustelinus</i> nas Microbacias não agrícolas e de baixo impacto de micropoluentes.....	61
Figura 14 – Comparação das alterações histológicas em <i>H. mustelinus</i> nas microbacias agrícolas e de médio impacto de micropoluentes.....	62
Figura 15 - – Perfil histológico histológicas em <i>H. mustelinus</i> nas microbacias agrícolas e alto impacto de micropoluentes.	63
Figura 16 - Índice histológico: Padrão de Reação em <i>H. mustelinus</i>	65
Figura 17 - Padrões de Reação para os diferentes grupos, análise: MBR x MPY	67
Figura 18 - Perfil histológico para os índices de padrão de reação RP1, RP2 e RP3 para as microbacias de baixo impacto de micropoluentes (Brasil e Paraguai).	69
Figura 19 – Perfil histológico para índice padrão de reação RP1, RP2 e RP3 para microbacias de médio e alto impacto de micropoluentes (Brasil e Paraguai)	70
Figura 20 – Índice histológico de dano no fígado (Iorg) de <i>H. mustelinus</i>	71

Figura 21 – Índice histológico de dano no fígado frente as variáveis testadas 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos Amostrais do Estudo.....	33
Tabela 2 - Fatores de importância da lesão histológica (BERNET, et. al., 1999).....	40
Tabela 3 - Valor de importância (w) por tipo de reação (BERNET et al., 1999).....	40
Tabela 4 - - Valor de Ocorrência (a), BERNET, et. al., 1999; RAUTENBERG et al., 2015). ..	41
Tabela 5 – Número de riachos amostrados e total de peixes analisados no lado brasileiro.	43
Tabela 6 – Número de riachos amostrados e total de peixes analisados no lado paraguaio.....	43
Tabela 7 - – Frequência (%) das alterações histológicas identificadas em amostras de fígado de H. mustelinus coletados em margens brasileiras e paraguaia da BP3.	47
Tabela 8 – Índices histológicos (médias e desvio padrão) das alterações de amostras de fígado em H. mustelinus coletados no Brasil e Paraguai.	59
Tabela 9 - Índice Histológico (médias e desvio padrão): Padrão de reação das amostras hepáticas de H. mustelinus coletados no Brasil e Paraguai.....	68
Tabela 10 - Índice Iorg correspondente ao grau de dano no fígado de H. mustelinus nos diferentes grupos do Brasil e Paraguai.....	71
Tabela 11 -Microbacias brasileiras que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional.....	91
Tabela 12 - Microbacias paraguaias que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional	93

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

BP3 - Bacia Hidrográfica do Paraná 3

ENA - anormalidades do núcleo em eritrócitos

HE - Hematoxilina e Eosina

H. mustelinus - *Heptapterus mustelinus*

Iorg - Índice de órgão

Irp - Índice de padrão de reação

MN - micronúcleo

MBR - Microbacia Brasileira

MBRa - Microbacia Brasileira com baixa impacto

MBRb - Microbacia Brasileira com médio impacto

MBRc - Microbacia Brasileira com alto impacto

MPY - Microbacia Paraguaia

MPYa - Microbacia Paraguaia com baixo impacto

MPYb - Microbacia Paraguaia com médio impacto

MPYc - Microbacia Paraguaia com alto impacto

PPGBN - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical

RP - Padrão de reação

UNILA - Universidade Federal da Integração Latino Americana

SUMÁRIO

1.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
1.1 BIODIVERSIDADE AQUÁTICA.....	14
1.2 AGROTÓXICOS E MICROPOLUENTES	15
1.3 ECOTOXICOLOGIA E BIOINDICADORES	18
1.4 HISTOLOGIA DE FÍGADO EM PEIXES	22
1.5 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM PEIXES	23
1.5.1 TIPOS DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO FÍGADO.....	24
1.5.1.1 Distúrbios Circulatórios	24
1.5.1.2 Alterações Regressivas	25
1.5.1.3 Mudanças Progressivas	26
1.5.1.4 Inflamações.....	27
1.5.1.5 Tumores	27
2. OBJETIVO GERAL	28
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. METODOLOGIA.....	28
3.1 MODELO DE ESTUDO: <i>Heptapterus mustelinus</i> - (bagre Anguila) (Siluriforme, <i>Heptapteridae</i>)	28
3.2 ÁREA DE ESTUDO.....	30
3.3 DELINEAMENTO AMOSTRAL	31
3.4 AMOSTRAS: Coleta e Processamento.....	34
3.5 HISTOLOGIA.....	37
3.5.2 Análises Histológicas	38
3.5.3 Índices Histológicos	38
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4. RESULTADOS	43
4.1 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	44
4.2 ÍNDICES HISTOLÓGICOS	64
5. DISCUSSÃO	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
7. REFERÊNCIAS	80
ANEXO 1 – Microbacias Estudadas na Área de Entorno do Reservatório da Itaipu (Brasil e Paraguai).....	91

1.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 BIODIVERSIDADE AQUÁTICA

Em termos de biodiversidade em águas continentais (água doce), o Brasil é considerado um país extremamente rico e diverso, possuindo um elevado número de espécies em vários grupos de organismos aquáticos, como, por exemplo, nos grupos Algae, Porifera, Annelida, Rotifera, Decapoda, Pisces, Anphibia, entre outros (AGOSTINHO *et al.*, 2005).

Quando considerada a diversidade de peixes, em específico, o continente sul-americano é considerado o mais diverso do mundo, possuindo em torno de um terço das espécies de água doce existentes e descritas até o momento (REIS *et al.*, 2016). Segundo esses autores, existem aproximadamente 5160 espécies de peixes de água doce descritas para o continente, distribuídas em 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens. Ainda assim, estimativas sugerem que existam entre oito e nove mil espécies no total, quando levadas em consideração as espécies que ainda não foram descritas (REIS *et al.*, 2016). Considerando a área de entorno do reservatório da Itaipu, no lado brasileiro já foram identificadas aproximadamente 182 espécies, enquanto do lado paraguaio aproximadamente 70 espécies (GRAÇA; PAVANELI, 2007; ITAIPU, 2017). Toda essa biodiversidade, no entanto, vem sofrendo diversos impactos ambientais, não somente no Brasil como também ao redor do mundo, em virtude da poluição do ambiente aquático (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006). Uma das recorrentes ameaças cada vez mais estudada e cuja discussão tem sido foco de diferentes trabalhos é a poluição do ambiente aquático (AGOSTINHO *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2016).

A ação antropogênica sobre os ecossistemas aquáticos é motivo de preocupação real e atual para a promoção da qualidade de vida do planeta. A agricultura com o emprego intensivo de produtos químicos, a precariedade de conservação do solo, a remoção de matas ciliares, a ocupação de sub-bacias afluentes por grandes centros urbanos e industriais têm impactado de diferentes maneiras os ecossistemas (AGOSTINHO; HAHN; VAZZOLER, 1997).

A poluição das águas é caracterizada por todas as alterações indesejáveis que ocorrem em suas características físicas, químicas ou biológicas, que possam acarretar

danos à vida aquática ou às atividades dos seres humanos (BRAGA *et al.*, 2005). Segundo apontam Souza, Gastaldini e Araújo (2015), conhecer a qualidade da água, reflete as condições da bacia hidrográfica e isso amplifica também o entendimento ecológico do ecossistema bem como as modificações provenientes das atividades antrópicas.

Entre os contaminantes aquáticos decorrentes das atividades antropogênicas, os agrotóxicos são os mais perigosos, em virtude de terem sido concebidos para eliminar alguma forma de vida e, por consequência, atingir de alguma forma também espécies não-alvo (ALBINATI *et al.*, 2009).

1.2 AGROTÓXICOS E MICROPOLUENTES

Segundo a Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO), os agrotóxicos são,

produtos químicos ou quaisquer substâncias ou mistura de substâncias destinadas a prevenção, destruição, ou ao controle de qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas ou de animais, que causem prejuízo ou interferem de qualquer outra forma na produção, elaboração, armazenagem transporte ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeira e produtos de madeira (OGA *et al.*, 2008).

Dentro desse grupo, baseado em seu uso encontram-se fungicidas, inseticidas e herbicidas, os quais são considerados extremamente agressivos ao meio ambiente e à saúde humana (GRISOLIA, 2005), devido as suas características como alta persistência no ambiente, mobilidade e citotoxicidade (SISINO; FILHO, 2013), sendo, desse modo, objeto de muitos estudos em função da sua ampla utilização e por representarem grande risco ao ambiente (ALBINATI *et al.*, 2009).

Estes agentes químicos podem chegar ao ambiente por acidente ou negligência, e ainda de forma controlada visando um efeito positivo, como o econômico, no caso de uso de agrotóxicos na atividade agrícola (AZEVEDO; CHASIM, 2004).

Um dos objetivos da aplicação de agrotóxicos é o controle de “pragas”. Uma vez utilizado, parte dos produtos aplicados atinge os organismos-alvo (considerados pragas), mas outra parcela atinge o ambiente (solo, água subterrânea) e a atmosfera (FAN *et al.*, 2018). A utilização intensiva desses produtos mesmo em total observância às normas,

leva à contaminação dos alimentos, das águas, do ar, prejudicando a saúde da população do entorno e dos animais, ou seja, trazendo consequências negativas para toda a biota, tanto na zona rural quanto urbana (PIGNATI; PEREIRA; CÂNDIDO, 2014).

Os efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde podem ser classificados em agudos ou crônicos. Os de efeito agudo refletem respostas rápidas em até 24 horas, enquanto que os de efeito crônico são resultantes de exposição contínua em doses baixas e seus efeitos demoram a ser percebidos, levando, meses e até anos (PERES *et al.*, 2019). Os efeitos desses xenobiontes no ambiente costumam ser crônicos e segundo, Sisinho, Filho (2013), as consequências mais graves aparecem quando a contaminação se estende no tempo e no espaço.

No Brasil, as problemáticas relacionadas aos agrotóxicos estão em discussão pelo Projeto de Lei 6.299 de 2002, que visa extinguir as restrições previstas, anteriormente, pela legislação 7802, de 1989, tornando a regulamentação mais frágil e inconsistente (HADDAD *et al.*, 2019). Cabe mencionar que a legislação brasileira ainda é considerada permissível e ineficiente, bastando observar, por exemplo, o custo pago para registro de agrotóxicos: no Brasil a taxa de controle sanitário é de cerca de 830 dólares acrescido o valor de 16.000 dólares referente ao controle ambiental e mesmo assim bem inferior ao valor cobrado nos Estados Unidos onde são pagos cerca de 436.000 dólares por registro (MORAES, 2019).

Segundo relatórios de comercialização de agrotóxicos emitido pelo IBAMA, entre 2000 e 2012, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, sendo que o mercado brasileiro teve um crescimento de 190%; e dentre os estados brasileiros com maior consumo de agrotóxicos, destaca-se o estado do Paraná representando 14,3% desse quantitativo (IBAMA, 2020). Em 2009 o Brasil tornou-se o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (FAN *et al.*, 2018).

Em 2010 a América Latina representava 22% do mercado mundial de agrotóxicos, sendo o Brasil responsável por 19% deste total, considerado assim o maior mercado de agrotóxicos do mundo, seguido pelos EUA. O estado do Paraná é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do Brasil, apresentando valores médios de 9,6 Kg/hectare/ano (CARNEIRO *et al.*, 2015). Segundo dados sobre agrotóxicos disponibilizados pelo Ibama, os 10 ingredientes ativos mais comercializados em 2018 no Brasil foram: Glifosato e seus sais; 2,4-D; Mancozebe; Atrazina; Acefato; Dicloreto de paraquate, Enxofre, Imidacloprido, Óleo Mineral; Oxicloreto de Cobre (IBAMA, 2019).

Conforme relatório SIAGRO (2018), o consumo de agrotóxicos no estado do Paraná por tipo de cultura em 2017 foi:

soja 52,27%, milho 18,35%, trigo 32 8,03%, feijão 2,83%, pastagens 2,23%, batata 1,64%, citros 1,43%, cana-de-açúcar 1,15%, fumo 0,54%, mandioca 0,36% e de um total de 100.122,7 toneladas. O consumo de acordo com a finalidade de uso também em 2017 foi o seguinte: herbicidas 60,58%, fungicidas 12,12%, inseticidas 10,96%, acaricida/inseticida 5,65% e adjuvante 4,21%. (SIAGRO, 2018).

Nos últimos anos, estudos brasileiros têm documentado a contaminação de mananciais hídricos por vários tipos de agrotóxicos. Segundo SISINO; FILHO, 2013, a contaminação das águas pode ocasionar consequências como a eliminação de espécies ou mesmo acumulação de contaminantes ao longo da cadeia alimentar.

O uso de agrotóxicos e outros compostos originados de atividades antropogênicas produz poluentes no ambiente. Os micropoluentes, contaminantes de preocupação emergente incluem substâncias de origem natural ou sintética. Podem ser definidos como compostos químicos que ocorrem no ambiente acima do nível natural, em decorrência da atividade humana, porém ocorrem em concentrações reduzidas (microgramas/litro), podem ser originados de produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais, resultado de processamentos de alimentos e pesticidas (JAPENGA, *et al.*, 2002; STAM, *et al.*, 2016). Esses contaminantes, mesmo que em concentrações muito baixas (μg) em águas superficiais e subterrâneas, podem causar mudanças ecológicas no ecossistema e a contaminação do sistema de abastecimento de água da região (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; BUSQUETS *et al.*, 2016).

De acordo com Fonseca (2019), os micropoluentes não possuem padrão regulatório e conseqüentemente não são incluídos em programas de monitoramento, mesmo apresentando potencial causador de efeitos deletérios ao ecossistema e/ou sobre a saúde humana.

Ribeiro (2018), alerta para a existência de microcontaminantes em diferentes matrizes ambientais, como águas superficiais, subterrâneas e comercializadas, esgotos bruto e tratado, lodo, solos e sedimentos. Justamente por ocorrer em baixas concentrações seus possíveis efeitos na biota podem ser de difícil interpretação. No entanto, a melhoria de técnicas analíticas mais sensíveis tem permitido a detecção desses compostos contribuindo assim, para um melhor entendimento de seus efeitos nas diferentes matrizes ambientais. (FONSECA, 2019).

Nos países industrializados, atualmente, os problemas ambientais estão mais relacionados com concentrações sub-letais dos produtos químicos do que com sua toxicidade aguda, uma vez que os efeitos a longo prazo são mais difíceis de serem detectados e cujas consequências para os ecossistemas estão longe de serem entendidas (GERNHOFER *et al.*, 2001).

Grande parte de substâncias químicas dispersas no ambiente passam por processos onde são gerados sub-produtos, tais quais metabólitos micropoluentes apresentam toxicidade mais elevada do que a substância que o originou (SISINO; FILHO, 2013).

Em 2017, foram realizados estudos sobre o tema: “Monitoramento de micropoluentes (agrotóxicos) em águas superficiais na BP 3 – Projeto I. Esse projeto teve como objetivo, realizar o monitoramento da qualidade de águas superficiais em relação aos micropoluentes gerados por agrotóxicos como glifosato e atrazina, e seus principais produtos de transformação. Os projetos desenvolvidos por Della Flora (2018) e Mendonça (2018) monitoraram tais pesticidas em 21 pontos da bacia. Os resultados indicaram que em aproximadamente 30% das amostras analisadas foram detectados os analitos de interesse. Outras análises preliminares revelaram também, a presença de outros agrotóxicos, tais como ethion, carbendazim, 2,4 D, entre outros (DELLA FLORA, 2018; MENDONÇA, 2018). Os resultados obtidos no Projeto I sobre a ocorrência de micropoluentes (pesticidas) nas áreas de entorno do reservatório da Itaipu foram os norteadores para que em 2018 fosse proposto a realização de uma segunda etapa de biomonitoramento de micropoluentes na região, através do Projeto II intitulado: “Estudo da dinâmica de micropoluentes em diferentes matrizes ambientais na região transfronteiriça Brasil e Paraguai”¹, no qual esse trabalho está inserido. Entendendo a necessidade de se compreender melhor os efeitos destes compostos no ambiente aquático, buscou-se identificar e aplicar metodologias para acompanhar essa dinâmica, como proposto em estudos de Ecotoxicologia.

1.3 ECOTOXICOLOGIA E BIOINDICADORES

A interferência do homem quer seja de forma concentrada, como na geração de despejos domésticos e industriais, quer de uma forma dispersa, como na aplicação de

¹ Demais informações do Projeto II e seus sub-projetos são informados no Cap. 3 (3.3 Delineamento Amostral).

defensivos agrícolas no solo, contribui na introdução de compostos na água, afetando sua qualidade e conseqüentemente todos os organismos deste sensível ecossistema (SILVA, *et al.*, 2019). Mensurar esses impactos sobre o ambiente não é uma tarefa fácil e requer o emprego de diferentes metodologias para realização de análises ambientais mais amplas, como características do ambiente, água, floresta, número de espécies, diversidade, etc., associado a ferramentas mais específicas como o emprego de bioindicadores e biomarcadores, buscando assim obter respostas sobre esses impactos.

O monitoramento do ambiente aquático é relevante para tentar identificar agentes que causam esses impactos, acompanhando seus efeitos no ambiente ao longo do tempo. A utilização conjunta de diferentes ferramentas de biomonitoramento produz respostas que se complementam e que podem servir de bases para um planejamento mais criterioso das atividades humanas a fim de mitigar os impactos ambientais (LIMA; GRAZZIOTTI; SILVA, 2018). Desse modo, o uso integrado de informações ecológicas e geográficas proporciona melhor compreensão dos efeitos ecológicos do uso e ocupação da terra e urbanização na qualidade da água e, conseqüentemente, nas comunidades de bioindicadores (CALLISTO; MORENO; MACEDO, 2019).

Os trabalhos de biomonitoramento são essenciais na prevenção contra danos à saúde humana e ambiental, bem como prejuízos econômicos em razão da má gestão e conservação dos recursos hídricos (DAMASIO, 2017).

Considerando a necessidade de se monitorar os ecossistemas sobre os impactos da contaminação por micropoluentes, torna-se essencial a observação contínua e periódica dos ambientes. Cabe, portanto, segundo Andréa (2008), biomonitorar o sistema ecológico, ou seja, realizar a coleta, análise e avaliação sistemática de amostras do ambiente, visando determinar a ocorrência, a concentração de contaminantes e mensurar seus efeitos nos organismos do local. O objetivo desses estudos é fortemente preditivo, com o intuito de produzir um alerta sobre os impactos que as atividades humanas causam no ambiente (ROCHA, 2009).

A ecotoxicologia é uma das áreas cujos métodos têm sido cada vez mais utilizados nos últimos anos para o monitoramento ambiental (MAGALHÃES; FILHO, 2008). O termo ecotoxicologia pode ser definido como o estudo do destino e dos efeitos de substâncias químicas sobre os componentes de um ecossistema, baseado na utilização de métodos de laboratório e de campo (SISINO; FILHO, 2013).

A avaliação ecotoxicológica de poluentes químicos no ambiente aquático, contribui para a avaliação de seus riscos no ambiente e muitas vezes se emprega um

organismo-teste representativo do ambiente para essa avaliação (RIBEIRO, 2018). Em virtude da água estar em constante mudança e movimento, as respostas encontradas na biota local podem fornecer informações complementares e integradoras no monitoramento do ambiente aquático (SISINO; FILHO, 2013).

A qualidade do ecossistema não pode ser medida diretamente, apenas indicadores de saúde podem ser medidos e usados para avaliar o *status* de saúde do ambiente, assim a ecotoxicologia emprega para a avaliação dos ambientes a serem monitorados, o uso de bioindicadores e biomarcadores. Entende-se como bioindicadores os organismos que fornecem informações sobre as condições ambientais, seja pela sua presença/ausência ou pelo seu comportamento (ANDREÁ, 2008; MARCHAND, *et al.*, 2009; LINS *et al.*, 2010). Já o termo biomarcador pode ser entendido como a resposta biológica mensurável da interação entre o organismo biológico e o contaminante e que pode se dar em nível, funcional, fisiológico, histológico ou molecular (VAN DER OOST *et al.*, 2003. OGA *et al.*, 2008, RODRIGUES, 2016).

A escolha dos organismos bioindicadores, segundo Oga *et al.*, (2008), baseia-se em inúmeros parâmetros, como sua representatividade no ecossistema a ser avaliado, abundância, sensibilidade aos fatores analisados, facilidade de cultivo e conhecimento da espécie.

Os primeiros relatos de utilização de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos datam da década de 1920, tendo os peixes como os primeiros organismos a serem utilizados nesses estudos (ZAGATOO; BERTOLETTI, 2008). Esse grupo de animais são bioindicadores confiáveis devido ao fato de ocuparem diversos níveis tróficos, acumularem contaminantes e refletirem impactos a longo prazo, tendo em conta o tamanho de seu ciclo de vida (GERNHOFER *et al.*, 2001; VREYS *et al.*, 2019). O uso de peixes em programas de biomonitoramento representa uma estratégia de baixo custo, pois eles são especialmente sensíveis a vários poluentes, mostram a exposição de diferentes níveis na teia trófica, respondendo aos agentes mutagênicos até em baixas concentrações (DAMASIO, 2017).

Os organismos aquáticos vivem em um ambiente pobre em oxigênio, dessa forma sua troca com a água e com compostos químicos presentes nela, acaba sendo mais efetivo do que para os organismos terrestres (AZEVEDO; CHASIM, 2004). Para as análises em ambientes aquáticos, são utilizados principalmente peixes, pois atuam como

bioconcentradores de substâncias presentes em concentrações muito reduzidas na água (ANDREÁ, 2008; JORGENSEN, 2011).

Algumas espécies, em específico, dentro do grupo de peixes têm sido citadas como “bioindicadores” para detecção de contaminação de agrotóxicos como *Danio rerio*, *Rhamdia quelen*, *Astyanax sp.*, entre outras. Estas espécies apesar de não morrerem pelas alterações do ambiente, respondem por meio de reações comportamentais ou metabólicas mensuráveis, refletindo assim alguma mudança no ambiente onde vivem (ANDREÁ, 2008; PEREIRA, 2014).

Nos peixes, o fígado é um dos órgãos que tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies, por agentes químicos orgânicos e inorgânicos, devido a sua função no metabolismo de poluentes e sua sensibilidade a eles (HINTON *et al.*, 1992, DE MELO *et al.*, 2004, VREYS *et al.*, 2019), o que justifica sua escolha para esse estudo. De modo geral, esse órgão atua na desintoxicação do organismo, na metabolização de macromoléculas importantes como proteínas, lipídios e carboidratos, no processamento e armazenamento dos nutrientes, na hematopoese e produção de anticorpos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Dentre outras funções realizadas pelo fígado, semelhantes àsquelas dos mamíferos, incluem-se: assimilação de nutrientes, produção de bile, desintoxicação, além de também desempenhar um papel fundamental na síntese de plasma, proteínas, como albumina e fibrinogênio (GENTEN *et al.*, 2009). Em virtude desse órgão participar de todas essas funções importantes, os efeitos hepatotóxicos dos diversos agentes químicos podem ser utilizados como importantes biomarcadores de contaminação aquática (HINTON *et al.*, 1992).

O fígado também se destaca por seu potencial de biotransformação, bioativação e excreção de xenobiontes, podendo refletir a exposição aos contaminantes de modo eficiente (BERNET *et al.*, 1999). Segundo Zeni (2016), essa capacidade de biotransformação dos poluentes ocorre por meio de processos enzimáticos, o que os torna hidrossolúveis, possibilitando sua excreção pela pele ou muco, no intestino pelas fezes, e no rim pela urina, por difusão nas brânquias. Devido à capacidade desintoxicante do fígado, muitos poluentes tendem a se acumular neste órgão, que é exposto a uma concentração mais alta com agentes tóxicos do que outros órgãos (BARJA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Portanto, muitos são os motivos que justificam o uso do fígado como um órgão indicador do *status* de saúde do peixe e conseqüentemente do grupo, o que conseqüentemente pode auxiliar na avaliação sobre a resposta da qualidade do ambiente aquático. Para Maceda-Veiga *et al.* (2013), o fígado é um órgão chave no metabolismo e armazenamento de metais, e sendo o órgão mais importante, uma vez que realiza inúmeras funções fisiológicas, mesmo não tendo contato direto com os poluentes dissolvidos na água (VALON *et al.*, 2013).

Considerando o fígado como um biomarcador muito útil em estudos dos efeitos agudos e crônicos de xenobióticos em peixes e também na caracterização de doenças neles manifestadas, o uso da histopatologia por microscopia de luz, que por sua vez, pode ser associada à aplicação de índices quantitativos, pode tornar os resultados obtidos nesses estudos mais objetivos e comparáveis (ZENI, 2016).

1.4 HISTOLOGIA DE FÍGADO EM PEIXES

A Histotologia é uma ferramenta que pode revelar os danos que um xenobiótico pode causar no organismo, tanto no nível celular quanto tecidual, e que frequentemente tem como resultado um provável distúrbio no metabolismo celular (MELA *et al.*, 2013). Assim, a mensuração das conseqüências dos efeitos adversos frente à contaminação do ambiente pode ser realizada histopatologicamente, investigando a ocorrência de possíveis lesões, alterações ou até a formações neoplásicas em tecidos dos peixes (VAN DER OOST, *et al.* 2003). Segundo, Marchand, *et al.*, (2009) a histologia possibilita conhecer possíveis efeitos tóxicos no ambiente antes que afetem níveis mais altos de organização.

A histopatologia por microscopia de luz é realizada por meio de análises ópticas de amostras de tecidos que foram previamente seccionados, corados e montados sobre uma lâmina, de modo a manter a integridade celular mesmo após a morte do organismo (TOLOSA *et al.*, 2003).

Em peixes, a histopatologia é utilizada principalmente em órgãos que atuam no metabolismo de compostos tóxicos, como o fígado, onde essas substâncias podem bioacumular causando alterações estruturais no tecido como resposta à contaminação. (GERNHÖFER *et al.*, 2001; FANTA *et al.*, 2003).

A histologia do fígado dos peixes varia entre espécies, mas existem características gerais que são encontrados na maioria delas (GENTEN *et al.*, 2009). O fígado dos Teleósteos, peixes com esqueleto ósseo (ex: *H. mustelinus*), por sua vez, possui um considerável volume em relação ao corpo, se apresentando marrom-avermelhado nas espécies carnívoras e marrom-claro nas herbívoras e em algumas espécies pode se arranjar como hepatopâncreas. (TAKASHIMA, 1995).

O típico padrão do tecido hepático, já descrito para a maioria dos peixes teleósteos, refere-se a um tecido bem homogêneo com sinusóides e hepatócitos poliédricos, arranjados em cordões, apresentando núcleo esférico (CAMARGO, 2007; LINS *et al.*, 2010; MELA *et al.*, 2013). Esses hepatócitos são circundados por sinusóides revestidos com células endoteliais formando uma camada muito fina, sendo os núcleos dessas células alongados e projetados para o lúmen sinusoidal. (GENTEN *et al.*, 2009).

1.5 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM PEIXES

As alterações histopatológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (Hinton & Laurén, 1990; Hinton *et al.*, 1992). Essas lesões nas células podem alterar o funcionamento do órgão e conseqüentemente afetar os processos de homeostase dos peixes (TAKASHIMA, 1995; BERNET, *et al.*, 1999; GENTEN, *et al.*, 2009).

As nomenclaturas das alterações morfológicas (alterações estruturais nas células ou tecidos) ainda não são bem definidas entre os patologistas, sendo encontradas lesões descritas como: células adaptadas ou células lesionadas, sendo as últimas subdivididas em lesões reversíveis ou lesões irreversíveis (ROBBINS; COTRAN, 2010).

Outras nomenclaturas existentes na literatura e utilizadas em estudos de histologia de peixes dividem as alterações nas seguintes categorias: distúrbios circulatórios, mudanças regressivas, mudanças progressivas, inflamações e tumores, como a proposta por Bernet *et al.*, (1999). Essa classificação que reúne as alterações, de acordo com a metodologia proposta por esse autor, é a utilizada no presente estudo, a qual relaciona as alterações com as respectivas unidades funcionais do órgão.

Dentre as alterações descritas em hepatócitos de peixes, causadas pelos efeitos de micropoluentes nas células, estão incluídas: perda da integridade citoplasmática, perda do limite celular, deformação nuclear, citoplasma vacuolizado, desorganização do tecido e degeneração hidrópica, necrose, núcleos picnóticos, acúmulo lipídico, decréscimo de glicogênio e inflamação (SILVA, 2004; MUNFORD, 2007; RICHARDSON *et al.*, 2010; ANTUNES, 2013; CECCON, 2016).

1.5.1 TIPOS DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO FÍGADO

1.5.1.1 Distúrbios Circulatorios

São distúrbios relacionados ao fluxo sanguíneo, que podem ser:

Vasodilatação

Ocorre quando o lúmen dos vasos hepáticos aumenta, o que pode indicar um aumento no fluxo sanguíneo no fígado, uma vez que esse órgão está associado aos processos de desintoxicação (ALMEIDA *et al.*, 2005; MACEDA-VEIGA, *et al.*, 2013).

Hemorragia

Ocorre quando as hemácias aparecem fora dos vasos, ou seja, extravasamento de sangue, ocasionada por danos à parede do vaso ou ao processo de diapedese (THOMSON, 1983).

Congestão Vascular

A congestão ocorre quando o fluxo de sangue se acumula em uma região, podendo ser desencadeada pela falha no fluxo ou obstrução física (THOMSON, 1983). Ela pode ter origem por processos venosos ou arteriais (BERNET *et al.*, 1999). A congestão nos sinusóides do tecido hepático pode ocorrer, sendo que em vários casos as células das áreas adjacentes também sofrem atrofia (TAKASHIMA, 1995).

Edema Intercelular

Caracterizado por fluido do tecido que aparece estagnado e que extravasou dos capilares para o tecido (BERNET *et al.*, 1999; ROCHA, 2009).

Hiperemia

A hiperemia (entrega excessiva de sangue a um local) implica em um ativo ingurgitamento do leito vascular. A hiperemia é geralmente acompanhada de evidência

de inflamação e está associada à dilatação vascular devido à liberação de mediadores inflamatórios (MUMFORD *et al.*, 2007).

1.5.1.2 Alterações Regressivas

São as alterações relacionadas à redução da funcionalidade do órgão, tais como:

Vacuolização de Gordura

A vacuolização de hepatócitos tem sido relatada como resultado de desordem metabólica, uma adaptação à lesão celular, exposição aos xenobióticos ou uma redução na ingestão de alimentos devido ao estresse (HINTON; LAURÉN, 1990; CAMARGO, MARTINEZ, 2007; MACEDA-VEIGA *et al.*, 2013). Pode ser identificada como um acúmulo de lipídio (gotículas de gordura) no citoplasma dos hepatócitos (OSTRENSKY, 2004). Neste caso, os hepatócitos apresentam um grande vacúolo de gordura no citoplasma, descolando o núcleo para a periferia da célula, ou pode se revelar em pequenas gotículas na periferia da célula. Geralmente, aparece com núcleo atrofiado (TAKASHIMA, 1995; ROBINS *et al.*, 2008; BRASILEIRO, 2012).

Degeneração Hidrópica

É o acúmulo de água no citoplasma, pode ser desencadeada pela perda da capacidade da membrana plasmática e controlar a passagens de íons. Pode aparecer no citoplasma ou núcleo da célula (OSTRENSKY, 2004). De um modo geral, as células aparecem tumefeitas, com seu volume aumentado, o citoplasma tende a se tornar mais acidófilo, podem ser visualizados vacúolos pequenos e claros (THOMSOM, 1983; ROBINS *et al.*, 2008;).

Necrose

Necrose é o estado no qual as células e/ou tecidos reduzem sua atividade e eventualmente morrem. Neste estado, o núcleo sofre alterações como cariólise, picnose e cariorrexe (MUMFORD *et al.*, 2007; ROBINS *et al.*, 2008). A necrose hepática é também caracterizada pelo processo de morte celular ou tecidual, causada por lesões nucleares e citoplasmáticas irreversíveis, seguidas pela perda do limite celular e pela reabsorção por células fagocíticas (THOMSOM, 1983). A presença de necrose pode causar prejuízos funcionais e estruturais ao fígado (STENTIFORD *et al.*, 2003). Além disso, um grande número de áreas de necrose pode causar falha no órgão, causando prejuízos na saúde, sobrevivência e conseqüentemente e afetar altos níveis da organização biológica nas populações e comunidades (RABITTO *et al.*, 2005).

Centros de Melanomacrófagos

Centros melanomacrofágicos (CMMs) são agregados de macrófagos que podem acumular grânulos de melanina, hemossiderina e lipofuscina em seu citoplasma (AGIUS; ROBERTS, 2003). O acúmulo de melanomacrófagos em fígado de peixes está relacionado aos processos de detoxificação ou reciclagem de compostos (CAMARGO; MARTINEZ, 2007). Sua ocorrência também pode estar ao estado nutricional e estado de hipóxia (ROCHA, 2009).

1.5.1.3 Mudanças Progressivas

São alterações que levam a um aumento da atividade celular, e podem ser:

Hipertrofia

A hipertrofia de hepatócitos é caracterizada pelo aumento do volume dessas células. Nessa condição, não existem células novas, apenas células maiores (em volume), devido ao aumento da quantidade de proteínas estruturais e de organelas, esse processo ocorre quando as células são incapazes de se dividir (THOMSOM, 1978; ROBINS *et al.*, 2008;). A hipertrofia é uma forma de adaptação das células frente a uma maior demanda de trabalho, como demandas de oxigênio e nutrientes (BRASILEIRO, 2012).

Hiperplasia

A hiperplasia, por sua vez, pode ser entendida como um alargamento do tecido ou do órgão com grande número de células, sem que ocorra aumento de seu volume (BERNET *et al.*, 1999). Pode ocorrer por aumento da proliferação ou retardo na apoptose. O processo de hiperplasia ocorre somente em células com capacidade replicativa. Embora hiperplasia e hipertrofia sejam processos diferentes, frequentemente ocorrem juntas e podem ser induzidas pelos mesmos estímulos externos (ROBINS, *et al.*, 2008; BRASILEIRO, 2012).

Atrofia

Definida como uma redução do número e volume das células e redução de substâncias intracelulares (ROCHA, 2009). Segundo Takashima (1995), é possível observar que o contorno da célula se torna indistinguível, o armazenamento de material desaparece e o núcleo e nucléolo se tornam pequenos e picnóticos.

1.5.1.4 Inflamações

Geralmente relacionadas a outros padrões de alterações, envolve infiltração de células de defesa. Podem ser:

Infiltração Leucocitária

O processo de inflamação é caracterizado pela exsudação, a liberação de líquido, e células dos vasos para o tecido lesionado. Histologicamente, esses exsudatos consistem em manchas eosinofílicas no espaço intercelular (MUMFORD *et al.*, 2007). É caracterizada pela presença de um ou mais tipos de leucócitos entre as células de um ou mais tecidos do órgão (DE MELO *et al.*, 2004). A infiltração de linfócitos e histiócitos também indicam um foco de infecção no tecido hepático (VAN RIJN; REINA, 2010; MACEDA-VEIGA *et al.*, 2013).

1.5.1.5 Tumores

Caracterizado como o crescimento descontrolado de células e tecido.

A neoplasia é um distúrbio do crescimento celular excessivo, progressivo e irreversível, caracterizado pela ausência de capacidade de resposta aos mecanismos normais de controle celular (ROCHA, 2009). Geralmente resulta na formação de uma massa de tecido ou tumor. Os tumores são incitados por uma série de mecanismos, desde falhas no processo de replicação e divisão celular, quanto a mutações oriundas de exposição a toxinas (MUMFORD *et al.*, 2007).

Enquanto que o Tumor Benigno é caracterizado por células diferenciadas substituindo as células normais do tecido, apesar de serem semelhantes, no tumor maligno, ocorre uma rápida proliferação de células com a destruição do tecido (ROBBINS *et al.*, 2008).

As alterações histológicas como as que foram relatadas são utilizadas como biomarcadores de efeito, que se caracterizam por alterações em um tecido e que podem estar relacionadas a um possível comprometimento ou doença (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Assim a utilização de análises quanto a ocorrência de tais alterações em um órgão como o fígado, essencial ao metabolismo dos peixes, pode produzir respostas sobre a qualidade do ambiente aquático.

Nesse sentido e diante das características atuais da Bacia do Paraná 3, frente à exposição aos micropoluentes oriundos principalmente da atividade agrícola e como forma de monitorar os possíveis efeitos adversos dessa exposição, o presente estudo busca apontar a análise histológica do fígado de *H. mustelinus* como um biomarcador, que somado a outras ferramentas possam contribuir como sinais de alerta preditivos quanto ao impacto neste ecossistema aquático.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar características histológicas do fígado de peixes da espécie *Heptapterus mustelinus* de diferentes riachos de bacias que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional (Brasil e Paraguai), visando identificar biomarcadores indicativos dos efeitos tóxicos possivelmente associados a presença de micropoluentes no ambiente aquático.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar as alterações histológicas do tecido hepático dos peixes da espécie *H. mustelinus*, quanto às características descritas por Bernet *et al.* (1999).
- b) Verificar a existência de possíveis diferenças na incidência de alterações histológicas entre os peixes coletados nos diferentes riachos e países.
- c) Relacionar os resultados histológicos obtidos com a ocorrência de micropoluentes

3. METODOLOGIA

3.1 MODELO DE ESTUDO: *Heptapterus mustelinus* - (bagre Anguila)
(Siluriforme, *Heptapteridae*)

Para a seleção da espécie bioindicadora foram utilizados como critérios a ampla ocorrência e abundância na área amostrada. Para isso, foram realizadas duas coletas piloto na área de estudo, sendo então definida *H. mustelinus* como a espécie-alvo.

A família *Heptapteridae* representa a quinta de maior riqueza dentro da ordem Siluriformes. *Heptapterus mustelinus* (bagre Anguila) (Siluriforme, *Heptapteridae*) é uma espécie de bagre de ampla distribuição na América do Sul, em especial nos riachos de entorno do Reservatório da Itaipu (Brasil e Paraguai), sendo um peixe insetívoro, bentônico, de águas de correnteza e pouco profundas, geralmente associado ao substrato e próximo à vegetação ribeirinha, conforme figura 1 A,B (LEAL *et al.*, 2009; FERNANDEZ; BECHARA, 2010).

Dados ecológicos da espécie, incluem: água doce demersal, pH 4.0 – 6.5 e clima subtropical 18°C –24° C. Sua distribuição abrange as bacias dos rios La Plata e Uruguai e drenagens costeiras do sul do Brasil (TORRES; REYS, 2019).

Figura 1 - *Heptapterus mustelinus*.



Figura 1 - **A:** *H. mustelinus* (Fonte Uruguay, by Loureiro. M. (Hemus_ul.jpg) – fishbase; **B:** *H. mustelinus* coletado na BP3.

3.2 ÁREA DE ESTUDO

Os riachos pertencentes a bacias que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional estão identificados na figura 2. A área brasileira corresponde a margem esquerda do reservatório e a área paraguaia corresponde a margem direita.

A área de pesquisa na margem esquerda referente ao Brasil, pertence a Bacia Hidrográfica do Paraná 3 (BP3) localizada na mesorregião do Oeste do Paraná, abrangendo uma área de aproximadamente 8.000 km² e 28 municípios. É uma região intensamente explorada por agricultura intensiva mecanizada, mas com diferentes níveis de ocupação em função de condições de relevo e características locais (COMITÊ BP3, 2014).

Conforme Relatório de Avaliação Ambiental, elaborado pelo Governo do Paraná (2015), na BP3 a qualidade do solo, as condições do relevo e um estruturado sistema de cooperativas estão na base de um sólido desempenho agropecuário regional. Um indicador desfavorável para a bacia é a quantidade de agrotóxico utilizado, que está acima de 11,5 kg/ha/ano e, portanto, acima da média do Paraná.

A área de estudo do lado brasileiro está subdividida em 13 microbacias: Taturi, Chororó, Guaçu, São Francisco Verdadeiro, São Francisco Falso Braço Norte, São Francisco Falso Braço Sul, São Vicente, Ocoí, Pinto, Passo-Cuê, Gabiroba, Dois Irmãos e Matias Almada. Em virtude do relevo, seus tributários na margem esquerda drenam um terreno mais íngreme de paisagens agrícolas (AGOSTINHO *et al.*, 1999).

A área de estudo no Paraguai, margem direita, pertence a Bacia do Prata e está localizada a leste do Departamento de Canindey e a nordeste do Departamento de Alto Paraná com uma área total de 10.407 km² e engloba 11 municípios. A região possui intensa atividade agrícola principalmente para culturas de soja, milho e trigo (ITAIPU, 2019).

Os afluentes da Bacia do Paraná da margem direita drenam planícies (AGOSTINHO *et al.*, 1999), sendo constituída de 52 rios principais e como afluentes em território paraguaio devido ao seu potencial hidrelétrico são os rios Piraty, Garoy, Itambey e Limoy (GOROSTIAGA *et al.*, 1995). A bacia está dividida em 11 microbacias: Rio Piraty, Arroio Gazory, Rio Carapá, Arroio Pozuelo, Rio Itambey, Rio Limoy, Rio Itararé Guazu, Rio Pirapyta (BALLER, 2014).

Figura 2 - Mapa do Brasil com localização da área de estudo.

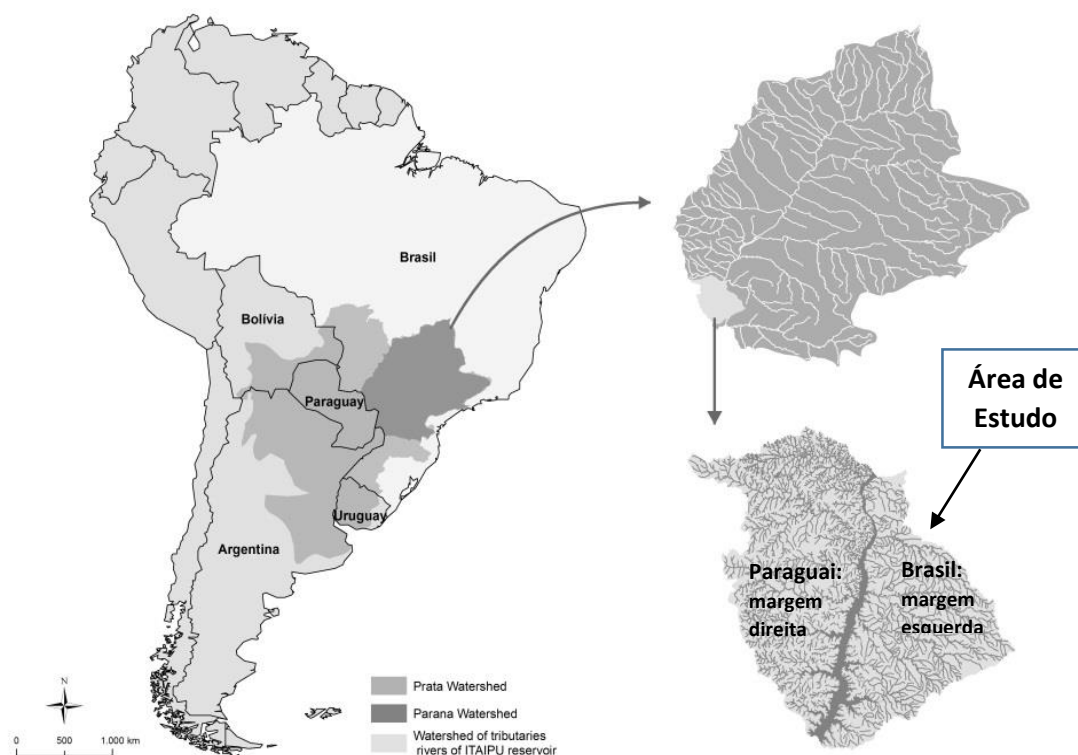


Figura 2: Bacia hidrográfica do Prata: margem paraguaia. Bacia hidrográfica do Paraná: margem brasileira.
Fonte: Divisão de Geoprocessamento – Itaipu Binacional.

Esse trabalho faz parte do projeto intitulado: “*Estudo da Dinâmica de Micropoluentes em Diferentes Matrizes Ambientais na Região Trans-fronteiriça Brasil e Paraguaia*”, que inclui três sub-projetos que abordam: a análise de micropoluentes; a diversidade de peixes e algas; a dinâmica de compostos específicos no solo. Integram estes sub-projetos diferentes grupos de pesquisa que trabalham com diferentes metodologias para o biomonitoramento das microbacias em torno do reservatório da Itaipu Binacional:

O estudo da histologia em fígado de peixes faz parte do grupo de pesquisa: “*Efeitos de micropoluentes na biodiversidade de peixes e algas das microbacias de entorno do reservatório de Itaipu*”. O trabalho foi desenvolvido seguindo o delineamento descrito abaixo:

Para a coleta de *H. mustelinus* foram selecionados riachos (microbacias) na margem brasileira da BP3 e margem paraguaia (Figura 3), classificados como riachos

de 2^a a 4^a ordem e que apresentassem características de estruturais da paisagem semelhantes (substrato rochoso, fluxo da corrente, sombreamento, largura, profundidade e mata ripária).

Para a seleção das microbacias foram consideradas duas variáveis:

- 1) número de micropoluentes detectados;
- 2) uso/ocupação do solo: uso não agrícola (floresta + pastagem) e uso agrícola.

Esta metodologia visou organizar os riachos em diferentes categorias de impacto, estabelecendo-se para isso 03 grupos categorizados, ou seja, 03 tratamentos amostrais: grupo A - “Baixo Impacto”; grupo B – “Médio Impacto”; grupo C – “Alto Impacto”, todas as microbacias estão identificadas no *Anexo 01*.

Em virtude das características de uso e ocupação do solo serem bastante semelhantes entre os grupos B e C, a distribuição dos riachos entre esses dois grupos foi definida pelo critério da ocorrência de micropoluentes.

A análise das amostras de água dos riachos (microbacias) foi realizada pelo grupo de pesquisa responsável pelo projeto intitulado: “*Análise de micropoluentes nas microbacias de entorno do reservatório de Itaipu- região transfronteriza (Brasil e Paraguai)*”². Os dados (ainda não publicados) demonstraram a ocorrência de 60 compostos micropoluentes diferentes e desse total, 56 confirmados positivos nas microbacias estudadas.

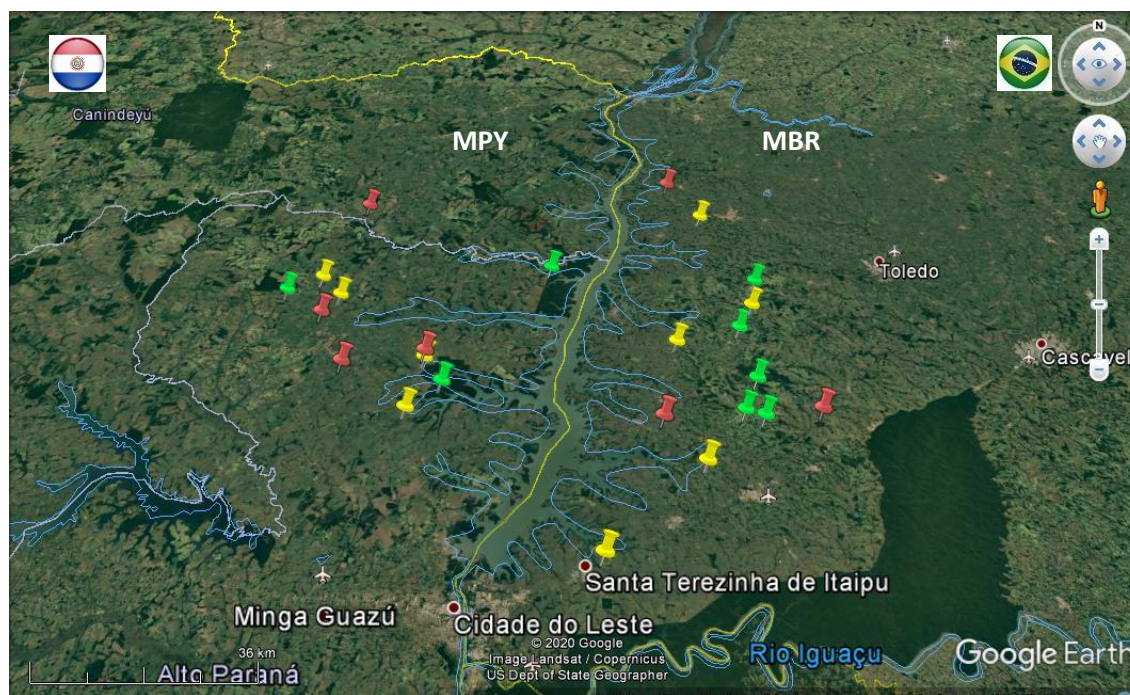
Na margem do Brasil foram identificados 35 compostos micropoluentes diferentes e nas microbacias paraguaias 21 compostos. Estes dados subsidiaram a categorização das microbacias investigadas (Tabela 1).

² Projeto: Monitoramento de micropoluentes (agrotóxicos). Dados ainda não publicados. Equipe: Profa. Gilcélia Cordeiro; Profa. Carla Sirtori; Raquel Wieles Becker; Bianca do Amaral.

Tabela 1 – Tratamentos Amostrais do Estudo

GRUPO	USO/OCUPAÇÃO DO SOLO	MICROPOLUENTES		
		(número de compostos detectados)		
DEFINIÇÃO	Não Agrícola	Agrícola	Brasil	Paraguai
A Baixo Impacto	38 e 95% (média = 68)	5 e 61% (média = 33)	18	10
B Médio Impacto	18 e 30% (média = 24)	68 e 86% (média = 77)	26	14
C Alto Impacto	15 e 33% (média = 24)	67 e 85% (média=76)	31	16

Ao longo desse trabalho os pontos de coleta serão tratados como microbacias brasileiras (MBR) e microbacias paraguaias (MPY) (Figura 3).

Figura 3 - Pontos de coleta (microbacias) que drenam parao reservatório da Itaipu (Brasil e Paraguai).

A - Microbacias não agrícolas com baixo impacto

B – Microbacias agrícolas com médio Impacto

C – Microbacias agrícolas com alto Impacto

MBR: microbacias brasileiras

MPY: mirobacias paraguaias

3.4 AMOSTRAS: Coleta e Processamento

As coletas foram realizadas nos meses de fevereiro e abril de 2019. Tais períodos se caracterizam nesta região por intenso uso de agrotóxicos: fungicidas, inseticidas e herbicidas, principalmente glifosato e atrazina. No calendário agrícola utilizado no Brasil, as principais culturas desse período são milho, feijão e soja (predominante).

Em cada ponto de coleta (riacho) foi demarcado um trecho com extensão de 30 metros rio acima, a partir do ponto de início da varredura para captura dos peixes. O ponto inicial foi demarcado por uma rede de espera fixa entre as margens e presa no fundo com pedras do próprio riacho.

Os peixes foram capturados por meio de pesca elétrica com o uso do equipamento Electrofischer modelo: LR-24 BP, marca Smith-Root e com auxílio de puçá de pesca. Os peixes capturados foram mantidos vivos, acondicionados em sacos plásticos com água retirada de seu local de origem (enriquecida com oxigênio de cilindro portátil), e posteriormente transferidos para o laboratório para dissecação e processamento.

No laboratório, cada saco identificado pelo seu respectivo ponto era aberto e os peixes retirados para o início do processamento. Foram processados todos os indivíduos de *H. mustelinus* coletados dos riachos de ambas as margens, totalizando 110 indivíduos. Primeiramente, eram tomados os dados morfométricos de cada indivíduo (peso, comprimento total, comprimento padrão), posteriormente eram extraídas amostras de sangue para testes mutagênicos³ e enfim as amostras de fígado eram retiradas e imediatamente colocadas em tubos criogênicos contendo fixador de rotina para histologia (Paraformaldeído 4%).

No projeto inicial desse trabalho estava previsto a coleta e análise de 05 indivíduos (peixes) por microbacia, para que fosse realizada uma comparação dos achados histológicos entre os riachos de cada grupo categórico. No entanto, durante as coletas não foi possível atender esse quantitativo em alguns riachos. Desta forma, foram consideradas para a análises comparativas o número total de indivíduos por grupo (A, B e C). Portanto, foram capturados, dissecados e preservados para análise histopatológica um total de 110 peixes (*H. mustelinus*), sendo 56 indivíduos provenientes da margem brasileira e 54

³ Processamento e ensaio realizado pela equipe de colaboradores: Projeto de pesquisa - Análise do potencial mutagênico e genotóxico dos micropoluentes dos riachos do Paraná 3 Brasil e Paraguai em sangue de *Heptapterus mustelinus*.

indivíduos da margem paraguaia (Figura 4A,E,G). Todos os peixes coletados foram tombados e depositados na coleção de ictiologia da UNILA.

Figura 4 - Dissecção de *H. mustelinus*, processamento das amostras e confecção de lâminas histológicas.



Figura 4 – **A**: coleta de dados morfométrico; **B,C**: coleta de sangue; **D,E**: dissecção de *H. mustelinus*. **G**: amostras hepáticas no tubo com fixador histológico; **F**: inclusão das amostras em resina; **H**: bloco de resina com amostra de fígado pronta para corte; **I**: operação do micrótomo; **J**: lâminas com cortes histológicos montadas e coradas.

3.5 HISTOLOGIA

3.5.1 Preparo da Laminas

As etapas que constituem o preparo das lâminas incluem: a) fixação do material; b) lavagem em tampão fosfato de sódio pH = 7,4; c) desidratação; d) embebição em resina; e) inclusão em resina (emblocagem); f) corte em micrótomo; g) montagem dos cortes em lâminas; h) coloração; i) montagem em lamínula e bálsamo do Canadá. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; NORMANN, 2008; POLIZELI, 2008) (Figura 4F,H, I, J).

As amostras de fígado permaneceram no fixador (Paraformaldeído 4%) sob refrigeração por pelo menos 30 dias. Após esse período foi realizada a lavagem das amostras utilizando solução de Tampão Fosfato de Sódio ($0,2 \text{ Mol L}^{-1}$, pH 7,4), permanecendo sob refrigeração por pelos menos 72 horas.

Após a amostra de fígado ser retirada da solução tampão, foi realizado o processo de desidratação do tecido para substituir a água das células por álcool. A desidratação se deu em banhos de 30 minutos com progressivas concentrações de etanol na seguinte sequência/ordem: 70%; 80%; 90%, 95%; 99,9% (nessa última concentração foram realizados 02 banhos de 30 minutos).

Após o último banho em etanol 99,9%, as amostras de fígado foram imersas em resina de infiltração (ou embebição) (Historesina Leica) e permaneceram armazenadas em refrigeração por pelo menos 48 horas. Transcorrido esse tempo, as amostras foram retiradas da resina de infiltração e então acomodadas em histomoldes para que fossem finalmente submersas em resina de inclusão (Historesina Leica), contendo agente polimerizador para a formação dos blocos (Figura 4F).

Para otimizar a secagem dos blocos, os histomoldes foram mantidos em estufa de secagem a 40°C por pelo menos 05 dias. Após a secagem, os blocos foram retirados dos histomoldes e então colados em pequenos blocos de madeira que serviriam de suporte para uso no micrótomo e para a realização dos cortes (Figura 4H). A execução dos cortes histológicos foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Histologia do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita (UNESP – Rio Claro - SP), utilizando micrótomo rotativo automatizado (Marca: Leica, modelo: RM 2255), no qual

as amostras emblocadas foram seccionadas em cortes com espessura de 5 μm (Figura 4I).

Após os cortes serem colocados nas lâminas de microscopia, deu-se prosseguimento a coloração, utilizando-se os corantes Hematoxilina e Eosina. Nesse processo as lâminas com os cortes seguiram o seguinte processo: imersão de sete minutos em solução de Hematoxilina de Harris; lavagem em água corrente por cinco minutos; imersão de cinco minutos em solução de Eosina amarela 3%; lavagem em água corrente até retirar o excesso de corante; secagem da lâmina.

3.5.2 Análises Histológicas

Para cada amostra de fígado de *H. mustelinus*, estabeleceu-se a análise de 01 lâmina, onde foram selecionados, de forma casualizada, 05 cortes desta lâmina e para cada corte a escolha também casualizada de 01 área de aproximadamente 10.000 μm^2 para a análise. Todo o processo de análise das lâminas deu-se às cegas, onde não estava identificado o local de origem (microbacias) da amostra, evitando-se assim um viés tendencioso na análise (Figura 4J).

Para a análise das imagens utilizou-se o equipamento de microscopia de luz marca Zeiss – modelo: PrimoTech, com câmera AXION Cam – Zeiss, utilizando-se nas imagens o aumento final de 500 x e 1000 x.

3.5.3 Índices Histológicos

Para mensurar os danos nos tecidos, são utilizados índices histopatológicos, em que se aplicam fórmulas matemáticas, permitindo assim uma avaliação numérica e comparativa de diferentes estudos (ZENI *et al.*, 2016).

Nesse estudo, adotou-se a metodologia proposta por Bernet *et al.*, (1999), a qual baseia-se na extensão e relevância patológica da alteração.

Para tanto, as alterações histológicas foram enquadradas em cinco padrões de reação (RP) sendo:

- a. RP1 – Distúrbios Circulatorios: resultado de condições patológicas do sangue ou do fluxo sanguíneo no tecido. Incluem alterações relacionadas à hemorragia e ao edema intercelular.
- a. RP2 – Alterações Regressivas: resultados de processos que resultam na redução funcional de um órgão ou sua perda. Incluem processos como alterações estruturais, alterações no plasma, depósitos, alterações no núcleo, atrofia e necrose.
- b. RP3 – Alterações Progressivas: alterações que levam a um aumento na atividade das células e/ou tecidos, como hipertrofia, hiperplasia.
- c. RP4 – Inflamações: reações geralmente associadas a outros tipos de padrões de reação, mas que incluem exsudato e infiltração leucocitária.
- d. RP5 – Tumores: proliferação exacerbada de células, incluem tumores benignos e malignos.

Nessa metodologia Bernet *et al.* (1999), sugere que quando se avalia um único órgão as análises sejam transformadas em valores matemáticos, resultando em dois índices:

- **Iorg rp** – Índice Reação do Órgão, que expressa as lesões por tipo de reação. Permite avaliar a gravidade das alterações identificadas.
- **I org** – Índice do Órgão, que representa o grau de dano no órgão. O cálculo desse índice permite a comparação entre os graus de danos de um mesmo órgão em diferentes indivíduos.

Para os cálculos desses índices são considerados dois atributos: Fator de Importância (w) e Valor de Ocorrência (a). O Fator de Importância (w) considera que a relevância da lesão (Tabela 3) vai depender de sua importância patológica (Tabela 4), ou seja, como ela afeta o funcionamento do órgão e a capacidade de sobrevivência do peixe. Cada alteração é classificada em três (03) fatores de importância, atribuindo-se valores de 1 a 3 (Tabela 3).

Tabela 2 - Fatores de importância da lesão histológica (BERNET, *et. al.*, 1999)

Fator de Importância (w)	Classificação	Especificação
(w) = 1	Mínima	A lesão é facilmente reversível quando se encerra a exposição ao contaminante.
(w) = 2	Moderada	A lesão é reversível na maioria dos casos quando o agente estressor é neutralizado.
(w) = 3	Marcada	A lesão é geralmente irreversível, ocasionando a perda parcial ou total do funcionamento do órgão.

w: fator de importância

Tabela 3 - Valor de importância (w) por tipo de reação (BERNET *et al.*, 1999)

Padrão de Reação	Valor de “w”
RP 1 - Distúrbios Circulatórios	
Dilatação Sinusóides (dilatação de vasos)	1
Congestão Vascular (causado por processos venosos ou arteriais)	1
Hemólise Vascular	1
Hemorragia (extravasamento de sangue dos vasos)	1
Edema Intercelular (fluido do tecido estagnado que vazou dos capilares para o tecido)	1
RP 2 - Mudanças Regressivas	
Degeneração Hidrópica	1
Metamorfose alta	2
Necrose (perda do limite celular)	3
Edema Intercelular	1
Atrofia (redução do número e volume das células e redução de substâncias intracelulares)	2
Degeneração Vacuolar	1
Alteração Núcleo (mudanças no formato núcleo e estrutura cromatina)	2
Alteração Arquitetura (mudanças na estrutura do tecido, bem como formato e arranjo das células)	1
Alteração Plasma : - degeneração granular, - vacuolização gordurosa, - degeneração hialina (espessamento de finas fibras do tecido conectivo)	1
RP 3 – Alterações Progressivas	
Hipertrofia (alargamento do volume celular, sem aumento do número de células)	1
Hiperplasia (alargamento do tecido ou órgão com grande número de células sem aumento de seu volume)	2

RP 4 - Inflamações

Exudado	1
Infiltração Leucocitária (penetração de leucócitos nas paredes dos vasos sanguíneos e infiltração ao redor do tecido)	2

RP 5 - Tumores

Tumor Benigno (células diferenciadas substituindo as células normais do tecido, apesar de serem quase semelhantes)	2
Tumor Maligno (rápida proliferação de células com destruição do tecido)	3

O Valor de Ocorrência (a) é o valor atribuído para cada alteração patológica, relacionando-se o grau de importância e a extensão da lesão. Utiliza-se um *score* de pontuação que varia de 0 a 8 (Tabela 5), de acordo com a extensão em que a lesão é identificada (BERNET, *et. al.*, 1999; RAUTENBERG, *et al.*, 2015).

Tabela 4 - - Valor de Ocorrência (a), BERNET, *et. al.*, 1999; RAUTENBERG *et al.*, 2015).

"w"	"a" (% do dano no órgão)				
	0	2	4	6	8
1	0 – 5%	5,1 – 25%	25,1 – 50%	50,1 – 75%	>75%
2	0 – 5%	5,1 – 15%	15,1 – 25%	25,1 – 50%	>50%
3	0 – 5%	5,1 – 10%	10,1 – 20%	20,1 – 30%	>30%

a: área de extensão da lesão (%)

Baseado nesses atributos e em seus valores aplicam-se as seguintes fórmulas para o cálculo dos Índices sugeridos:

$$I_{org\ rp} = \sum alt (a\ org\ rp\ alt \times w\ org\ rp\ alt)$$

$$I_{org} = \sum rp \sum alt$$

Em que, org = órgão; rp = padrão de reação; alt = alteração; w = valor de importância; a = valor de ocorrência.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados referentes aos índices histológicos das alterações observadas são apresentados com média \pm SD. Como o conjunto de dados não atendeu aos pressupostos de normalidade/homocedasticidade, foi aplicado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, considerando a significância para $p < 0,05$. As diferenças quando ocorreram foram determinadas pelo *pos test* Dunn. Esses dados foram analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prism 5.0 (2007).

As comparações das alterações histológicas observadas foram realizadas conforme descritas abaixo:

- 1) Comparações dos índices histológicos de cada alteração individualmente entre os três tratamentos (A, B e C) para as microbacias brasileiras e da mesma forma para as microbacias paraguais.
- 2) Comparações dos índices histológicos para cada tipo de alteração dentro de cada tratamento: Grupo A (Brasil); Grupo A (Paraguai); Grupo B (Brasil); Grupo B (Paraguai); Grupo C (Brasil); Grupo C (Paraguai).
- 3) Comparações dos índices histológicos do conjunto (total) de alterações identificadas em cada um dos grupos em separado para cada país.

As comparações do índice Padrão de Reação (RP) foram realizadas conforme descritas abaixo:

- 1) Os índices para cada Padrão de Reação observado foram comparados dentro de cada grupo, comparando-se os países: Grupo A (Brasil e Paraguai); Grupo B (Brasil e Paraguai); Grupo C (Brasil e Paraguai).
- 2) Os diferentes Padrões de Reação observados foram comparados entre si dentro de cada grupo individualmente por país: Grupo A (Brasil); Grupo A (Paraguai); Grupo B (Brasil); Grupo B (Paraguai); Grupo C (Brasil); Grupo C (Paraguai).

Especificamente para os dados referentes ao índice histológico “Iorg”, que também não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade, os dados foram transformados em log, antes da análise de variância paramétrica, ANOVA em modelo fatorial, considerando fator 1: os países (Brasil e Paraguai) e o fator 2: o impacto agrícola da microbacia (baixo, médio e alto impacto). Os dados foram analisados estatisticamente com o programa BioEstat 5.0 (2007).

4. RESULTADOS

Foi analisado o total de 110 amostras de fígado de peixes da espécie *Heptapterus mustelinus* coletados nas bacias brasileiras e paraguaias. Na margem brasileira um total de 56 amostras de peixes, foram coletados em 13 diferentes microbacias. Na margem paraguaia, um total de 54 amostras de peixes foram coletados em 11 diferentes microbacias (Tabelas 06 e 07).

Tabela 5 – Número de riachos amostrados e total de peixes analisados no lado brasileiro.



 BRASIL		
GRUPO	Nº. de Riachos (pontos)	Nº. de Peixes Analisados
A	05	22
B	05	23
C	03	11
TOTAL	13	56

Tabela 6 – Número de riachos amostrados e total de peixes analisados no lado paraguaio.

 PARAGUAI		
GRUPO	Nº. de Riachos (pontos)	Nº. de Peixes Analisados
A	03	14
B	04	20
C	04	20
TOTAL	11	54

4.1 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

O fígado dos peixes de *Heptapterus mustelinus* se encontra localizado na parte anterior do corpo, constituído por 02 lóbulos bem vascularizados (Figura 5A-D). O órgão está conectado a vesícula biliar e ao baço. (Figura 5B,E). As análises por microscopia de luz, demonstraram um tecido hepático típico dos peixes teleósteos, com hepatócitos poliédricos, que podem variar sutilmente de tamanho. Suas células estão organizadas em cordões ladeadas por sinusóides (Figura 5F-H).

Figura 5 - Morfologia do fígado de *H. mustelinus*.

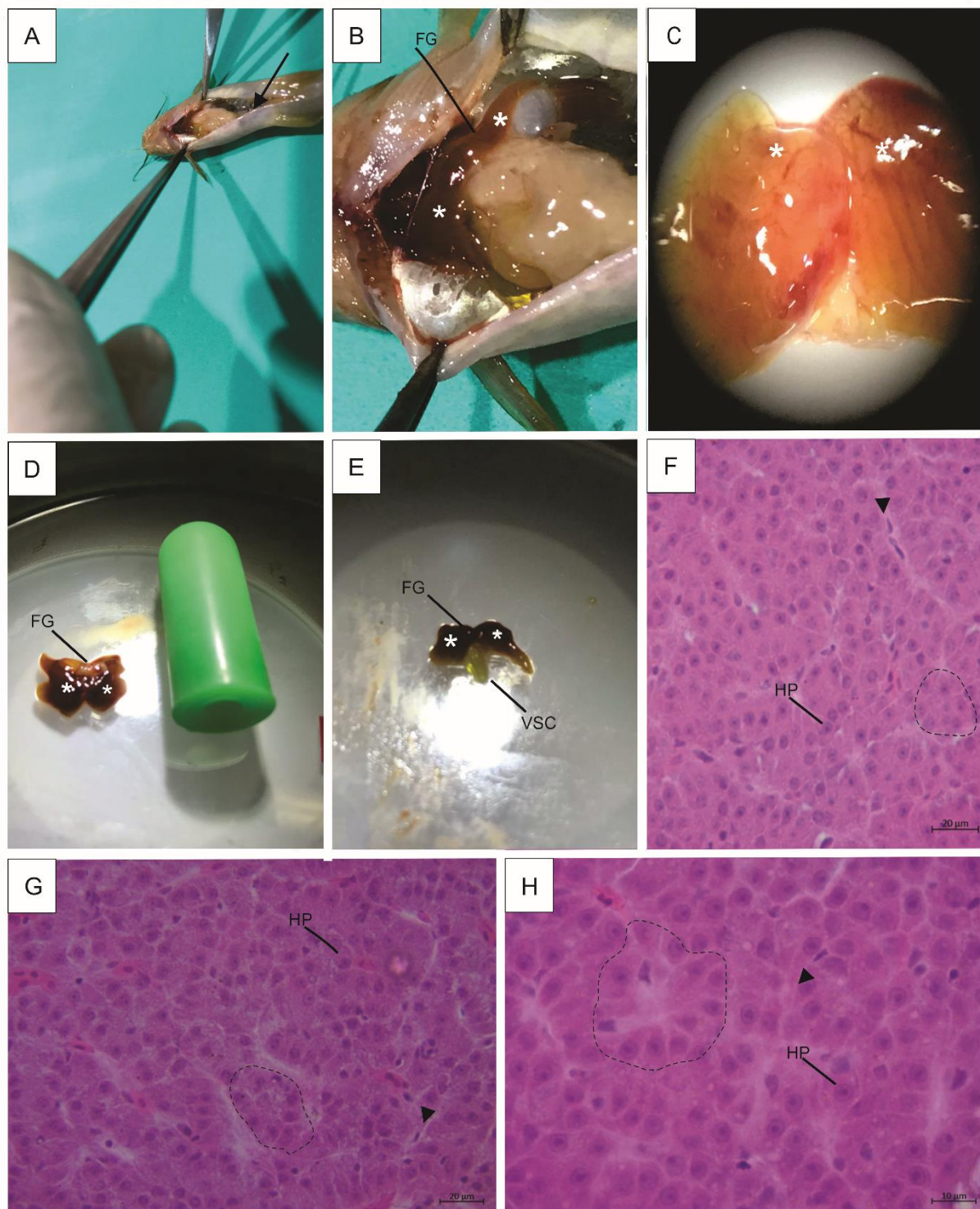


Figura 5 – Morfologia e histologia do fígado de *H. mustelinus* corado com Hematoxilina e Eosina (HE). **A:** incisão. **B, C, D:** visão geral do fígado (FG); **E:** fígado conectado a vesícula biliar (VSC). **F, G, H:** tecido hepático normal, mostrando hepatócito (HP), sinusóide (ponta da seta), cordões (contorno pontilhado). F, G: 500 x; H: 1000 x; C (estereomicroscópio) 300 x.

Ainda que em diferentes proporções e em categorias diferentes, foram encontradas alterações histológicas em todas as amostras analisadas (Tabela 8). Na maioria delas, foi possível observar alterações no núcleo como hipertrofia, alteração na cromatina e no formato do núcleo e deslocamento do núcleo para periferia da célula (Figura 6A-F). Também foram observadas anormalidades como degeneração celular (Figura 6G-H). As outras alterações mais comuns encontradas foram: vacuolização do citoplasma (Figura 7A-C); hipertrofia celular (Figura 7D); necrose (Figura 7E,F); hemorragia (Figura 7 G,H).

Tabela 7 - – Frequência (%) das alterações histológicas identificadas em amostras de fígado de *H. mustelinus* coletados em margens brasileiras e paraguaia da BP3.



TRATAMENTO	DISTÚRBIOS CIRCULATORIOS	MUDANÇAS REGRESSIVAS				ALTERAÇÕES PROGRESSIVAS	
		Hemorragia	Necrose	Degeneração Vacuolar (citoplasma)	Alteração de Núcleo (Formato; Alteração Cromatina; Núcleo Periférico; Atrofia; Hipertrofia).	Alteração na Arquitetura (Degeneração Celular e Desorganização dos Cordões)	Hipertrofia Celular
MBR - A		22.73%	31.82%	36.36%	100.00%	72.73%	22.73%
(<i>n</i> total = 22)		(<i>n</i> = 05)	(<i>n</i> = 07)	(<i>n</i> = 08)	(<i>n</i> = 22)	(<i>n</i> = 16)	(<i>n</i> = 05)
MBR - B		26.09	—	39.13%	100.00%	69.57%	43.48%
(<i>n</i> total = 23)		(<i>n</i> = 06)		(<i>n</i> = 09)	(<i>n</i> = 23)	(<i>n</i> = 16)	(<i>n</i> = 10)
MBR - C		18.18%	09.09%	09.09%	100.00%	54.54%	45.45%
(<i>n</i> total = 11)		(<i>n</i> = 02)	(<i>n</i> = 01)	(<i>n</i> = 01)	(<i>n</i> = 11)	(<i>n</i> = 06)	(<i>n</i> = 05)
MPY - A		33.33%	13.33%	73.33%	100.00%	78.57%	20.00%
(<i>n</i> total = 14)		(<i>n</i> = 05)	(<i>n</i> = 02)	(<i>n</i> = 11)	(<i>n</i> = 14)	(<i>n</i> = 11)	(<i>n</i> = 03)
MPY - B		20.00%	25.00%	65.00%	100.00%	85.00%	45.00%
(<i>n</i> total = 20)		(<i>n</i> = 04)	(<i>n</i> = 05)	(<i>n</i> = 13)	(<i>n</i> = 20)	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 09)
MPY - C		30.00%	30.00%	35.00%	100.00%	75.00%	50.00%
(<i>n</i> total = 20)		(<i>n</i> = 06)	(<i>n</i> = 06)	(<i>n</i> = 07)	(<i>n</i> = 20)	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 10)

Tabela 7 – Frequência (%) das alterações histológicas em amostras hepáticas de *H. mustelinus* nos diferentes grupos - **A**: bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes; **B**: bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **C**: bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes. **MBR**: bacias do Brasil; **MPY**: bacias do Paraguai; *n*: número de amostras.

Figura 6 - Alterações histológicas de fígado em *H. mustelinus* (núcleo e degeneração celular)

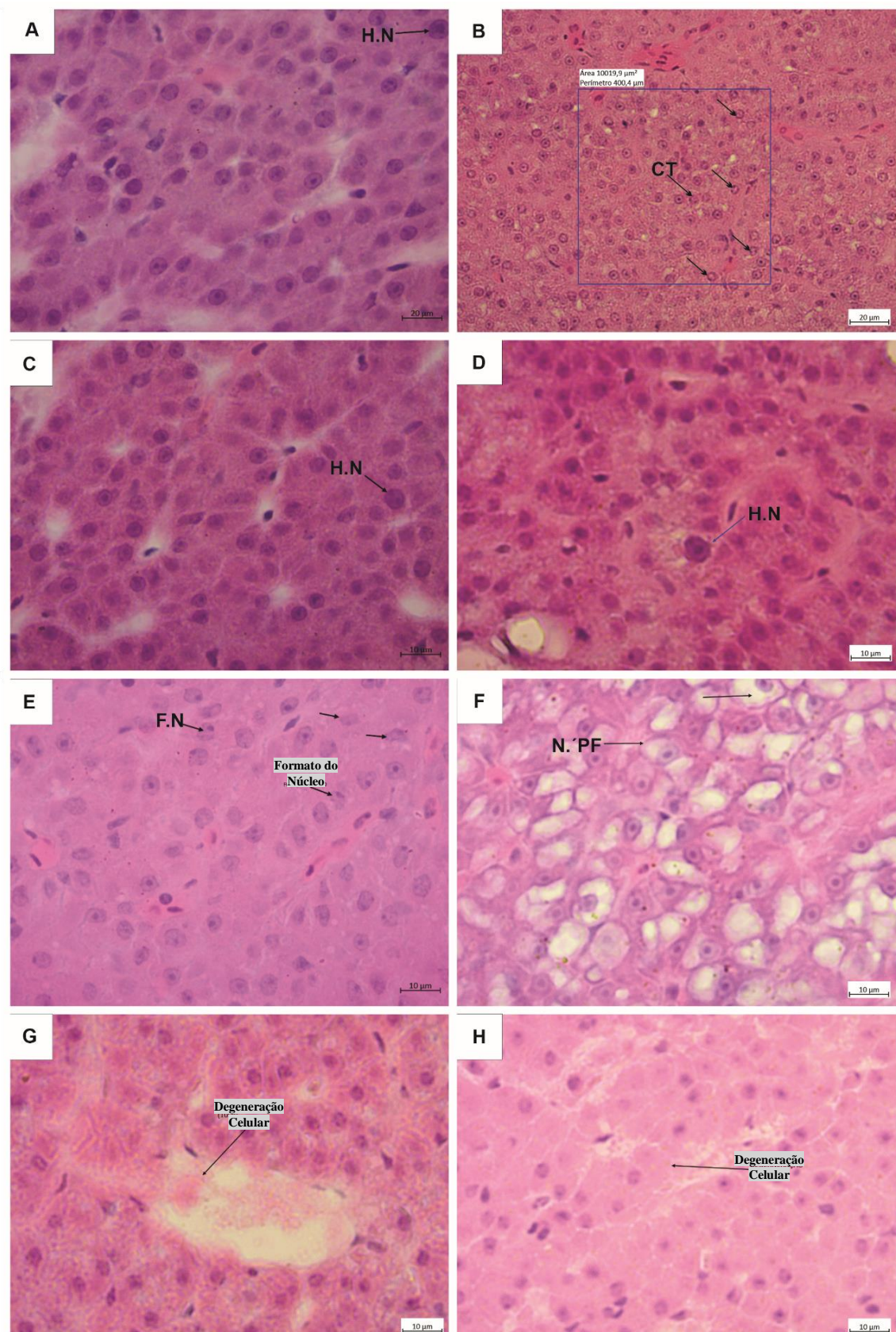


Figura 6 – Histologia do fígado de *H. mustelinus* corado com Hematoxilina e Eosina (HE). **A, C, D:** hipertrofia nuclear (HN) (seta); **B:** alterações na cromatina (CT) (seta); **E:** alterações no formato do núcleo (FN) (seta); **F:** deslocamento do núcleo para periferia (N.PF) (seta); **G, H:** degeneração celular (seta). A e B: 500x; C – H: 1000x.

Figura 7 - Alterações histológicas de fígado em *H. mustelinus* (vacuolização, necrose e hemorragia).

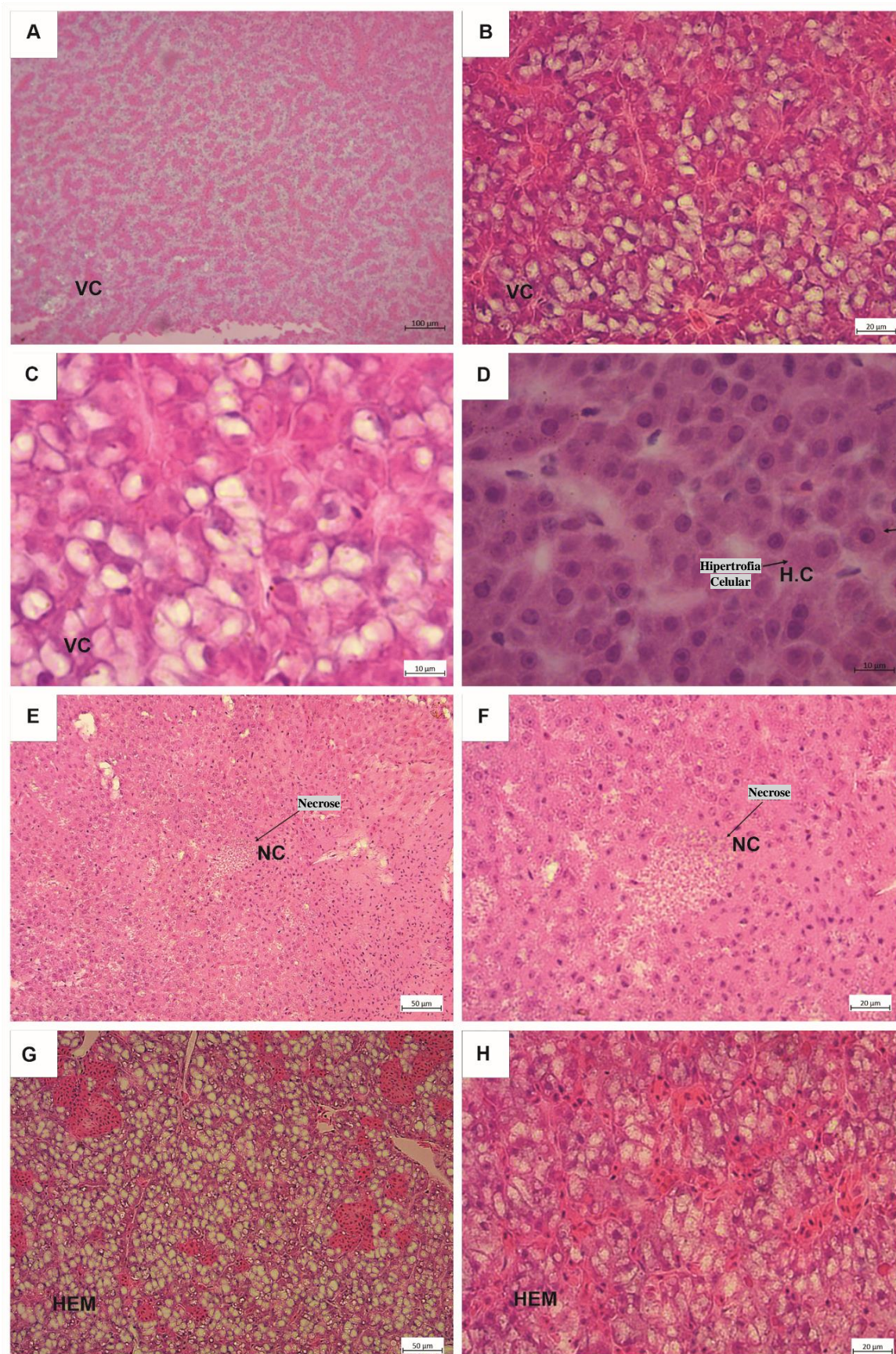
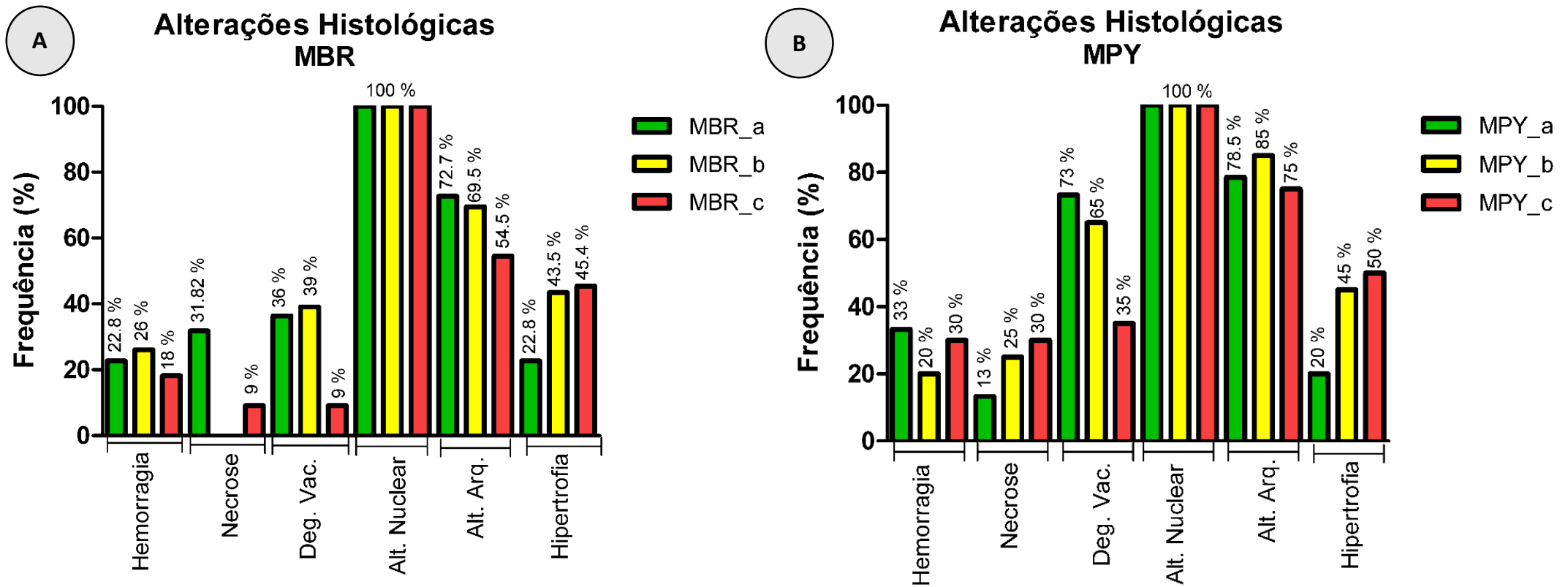


Figura 7 – Histologia do fígado de *H. mustelinus* corado com Hematoxilina e Eosina (HE). **A, B, C**: Degeneração vacuolar (VC); **D**: hipertrofia celular (H.C) (seta); **E, F**: necrose (NC) (seta); **G, H**: hemorragia (HEM); (A: 100x); (B, F, H: 500 x); (E, G: 200 x); (C, D: 1000 x).

Apesar das alterações terem sido observadas em todas as amostras hepáticas, nem todas elas foram estatisticamente significativas, uma vez que a metodologia utilizada (BERNET *et al.*, 1999) atribui *score* igual a zero para as alterações que ocorreram em até 5% da extensão do corte histológico analisado, conforme (Tabela 5). Desse modo, embora a ocorrência das alterações conste nos resultados em termos de sua frequência (em relação total das amostras analisadas) (Figura 8 e Tabela 8), nem sempre foram gerados índices ($I_{org\ rp}$; I_{org}) com o valor acima de zero.

Figura 8 – Frequência de alterações histológicas identificadas em amostras de fígado de *H. mustelinus*, coletados em margens brasileira (A) e paraguaia (B).



O perfil total das alterações histológicas observadas nas microbacias brasileiras e paraguaias está demonstrado nas figuras 9 e 10.

As análises quantitativas (índices) dessas anormalidades histológicas das amostras de fígado dos diferentes grupos foram comparadas pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis / Dunn*.

1 – Alteração histológica (tipos observados) comparados individualmente entre os diferentes grupos (A, B e C), análise por país:

As microbacias brasileiras (MBRa, MBRb, MBRc) e microbacias paraguaias (MPYa, MPYb e MPYc) não demonstraram diferenças significativas, quando cada tipo de alteração observada é comparado entre os diferentes grupos (A, B e C), para cada um dos países analisados individualmente (Figuras 9 e 10).

Figura 9 -Perfil dos índices histológicos das alterações: Hemorragia, Deg. Vacuolar e Alteração na Arquitetura do Tecido em *H. mustelinus* (BR e PY).

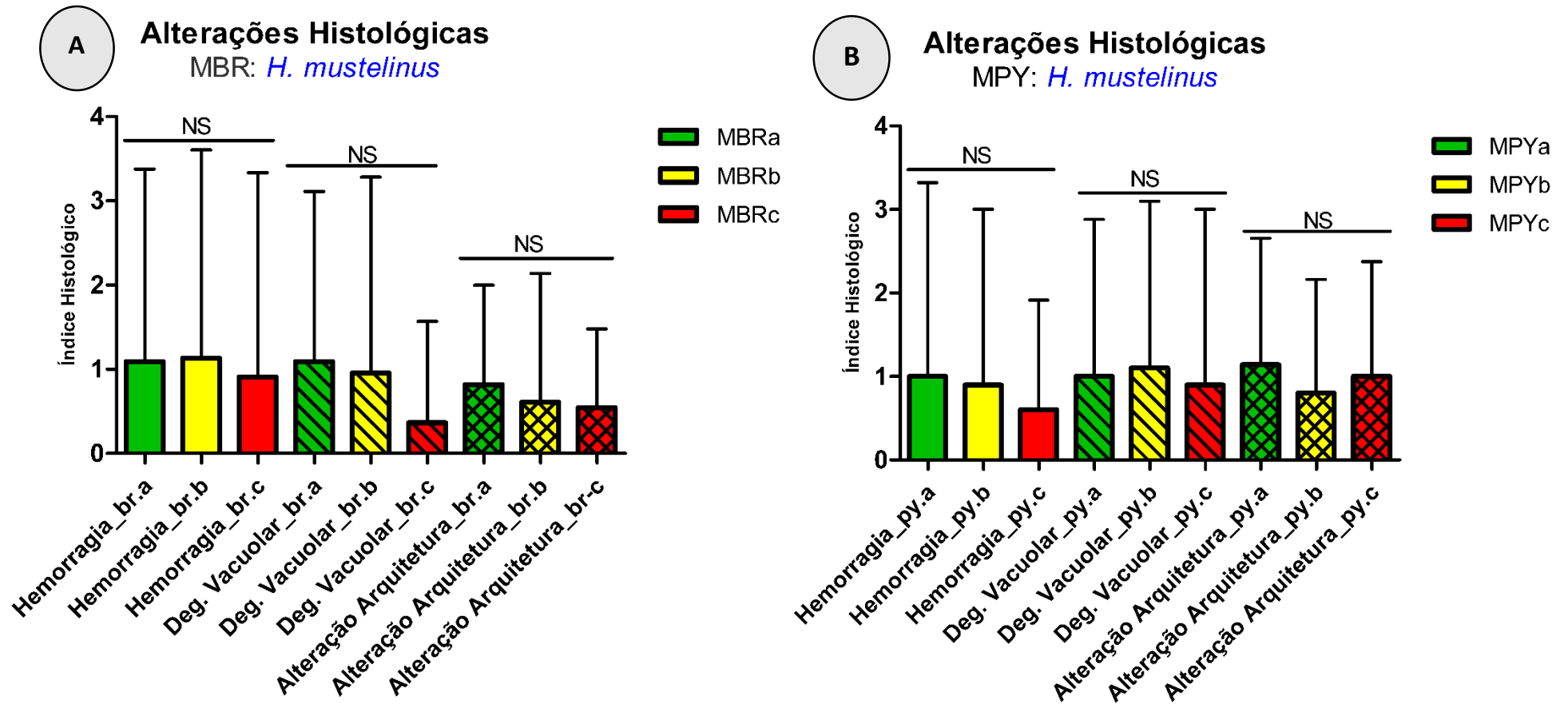


Figura 9- Índices histológicos (médias e SD superior) das alterações: Hemorragia, Degeneração Vacuolar e Alteração na Arquitetura observadas em amostras de fígado de *H. mustelinus*. **a- verde**- bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes; **b- amarelo**- bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **c-vermelho**- bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes. **A**: Microbacias do Brasil (MBR). **B**: Microbacias do Paraguai (MPY). *Teste de Kruskal- Wallis / Dunn*. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.0001$ (***) ; NS: sem diferenças significativas.

Figura 10 – Perfil dos índices histológicos das alterações: Hipertrofia Celular, Alt. Núcleo e Necrose em *H. mustelinus* (BR e PY)

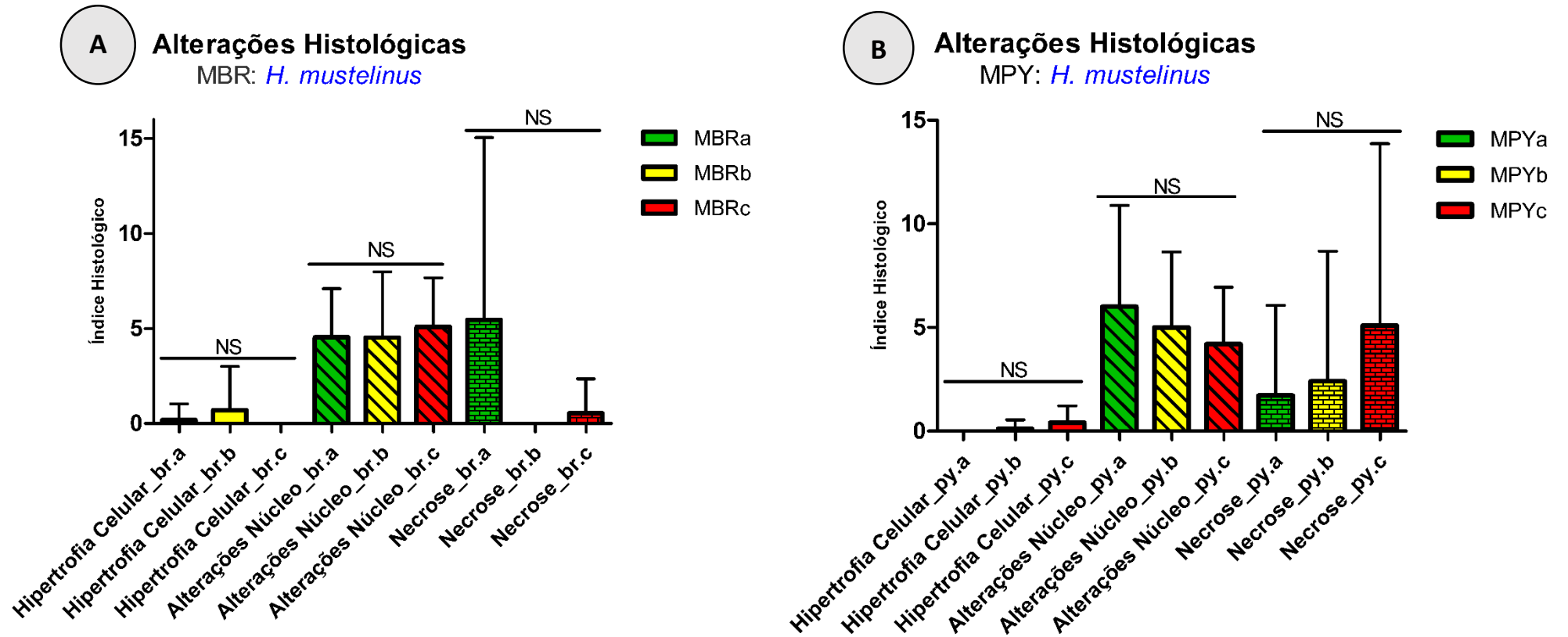


Figura 10 – Índices histológicos (médias e SD superior) das alterações: Hipertrofia Celular, Alt.do Núcleo e Necrose observadas em amostras hepáticas de *H. mustelinus*. **a- verde-** bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes; **b- amarelo-** bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **c- vermelho-** bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes. **A:** Microbacias do Brasil (**MBR**). **B:** Microbacias do Paraguai (**MPY**). *Teste de Kruskal- Wallis / Dunn*. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) e $P < 0.0001$ (***); **NS:** sem diferenças significativas.

2 – Observação individual das alterações histológicas: Hemorragia, Degeneração Vacuolar e Alteração na Arquitetura do Tecido.

As alterações histológicas hemorragia, degeneração vacuolar e alteração na arquitetura do tecido, foram observadas em todas as microbacias tanto do Brasil quanto do Paraguai (Figura 11A,B,C). No entanto, não foram observadas diferenças significativas quando os valores médios dos índices de cada uma dessas alterações são comparados dentro de cada grupo comparando-se os países.

Figura 11 – Comparação (Br x Py) do índice histológico das alterações: Hemorragia, Deg. Vacuolar e Alt. na Arquitetura dentro de cada grupo.

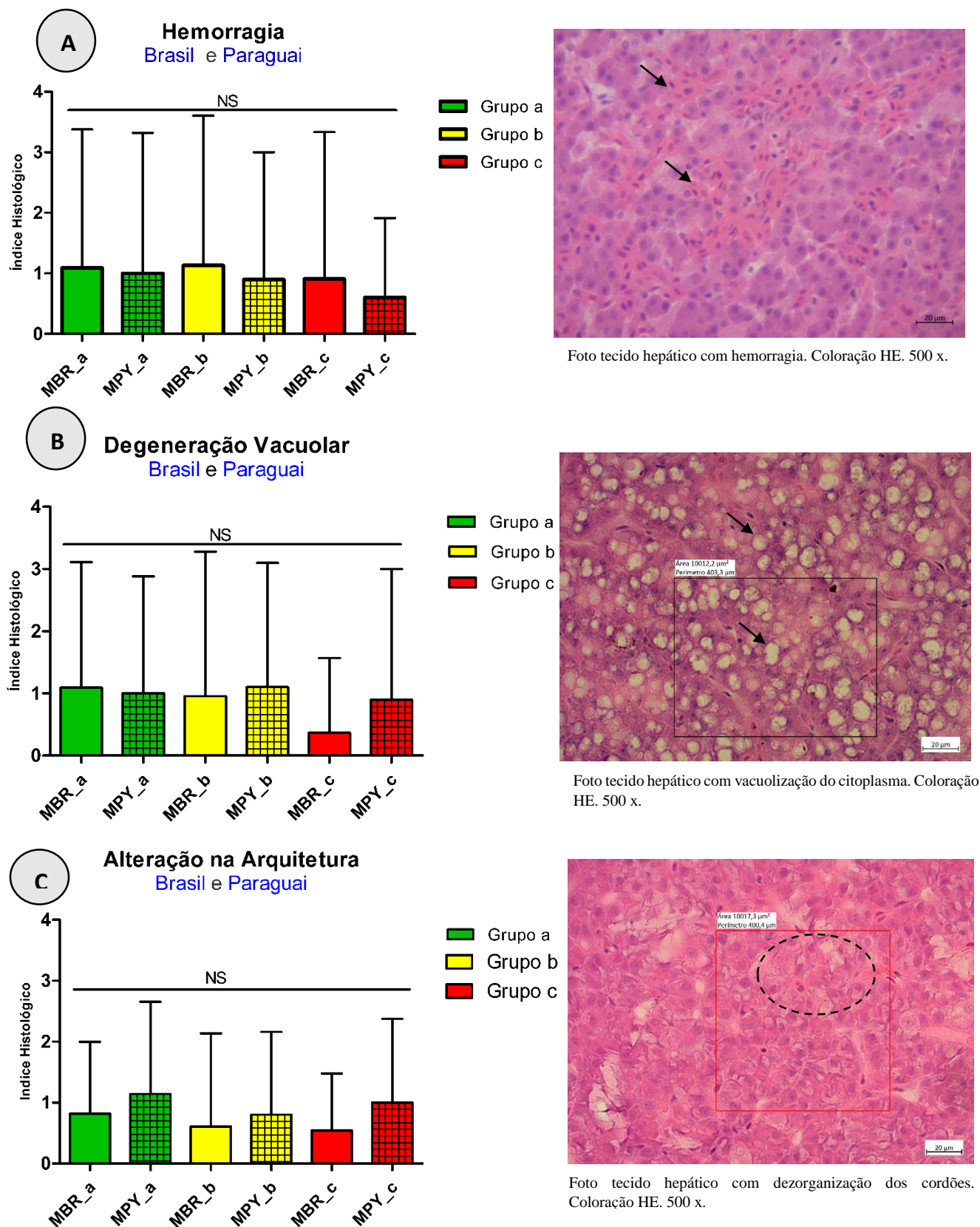


Figura 11 – Br x Py: índices das alterações histológicas (médias e SD superior) de amostras de fígado em *H. mustelinus* **A:** Hemorragia. **B:** Degeneração Vacuolar. **C:** Alteração na Arquitetura do tecido. (MBR): microbacias brasileiras. (MPY): microbacias paraguaias. **a- verde-** bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes; **b- amarelo-** bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **c- vermelho-** bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes.. ANOVA, Teste de Kruskal- Wallis / Dunn. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,0001$ (***); NS: sem diferenças significativas.

3 – Observação individual das alterações histológicas: Hipertrofia Celular, Alteração Nuclear e Necrose.

Alterações do tipo hipertrofia celular não foram observadas nas amostras do grupo MPYa (Paraguai) e MBRC (Brasil) (Figura 12A). No entanto, as alterações nucleares foram observadas em todas as microbacias dos dois países (Figura 12B). Especificamente, a necrose só não foi observada nas amostras de fígado do grupo MBRb (médio impacto) da margem brasileira (Figura 12C).

Observa-se uma frequência aumentada de alterações do tipo necrose no grupo MBRa (5,45 \pm 9,61) em relação ao grupo MPYa (1,71 \pm 4,36) conforme figura 12C. Embora exista essa tendência indicada pelo índice histológico, não foram observadas diferenças significativas quando os valores médios dos índices de cada uma dessas alterações são comparados dentro de cada grupo comparando-se os países. Tal fato está relacionado a heterogeneidade amostral dentro de cada grupo evidenciado pelos altos desvios padrões (Tabela 9).

Figura 12 - Comparação (Br x Py) do índice histológico das alterações: Hip. Celular, Alt. Nuclear e Necrose dentro de cada grupo.

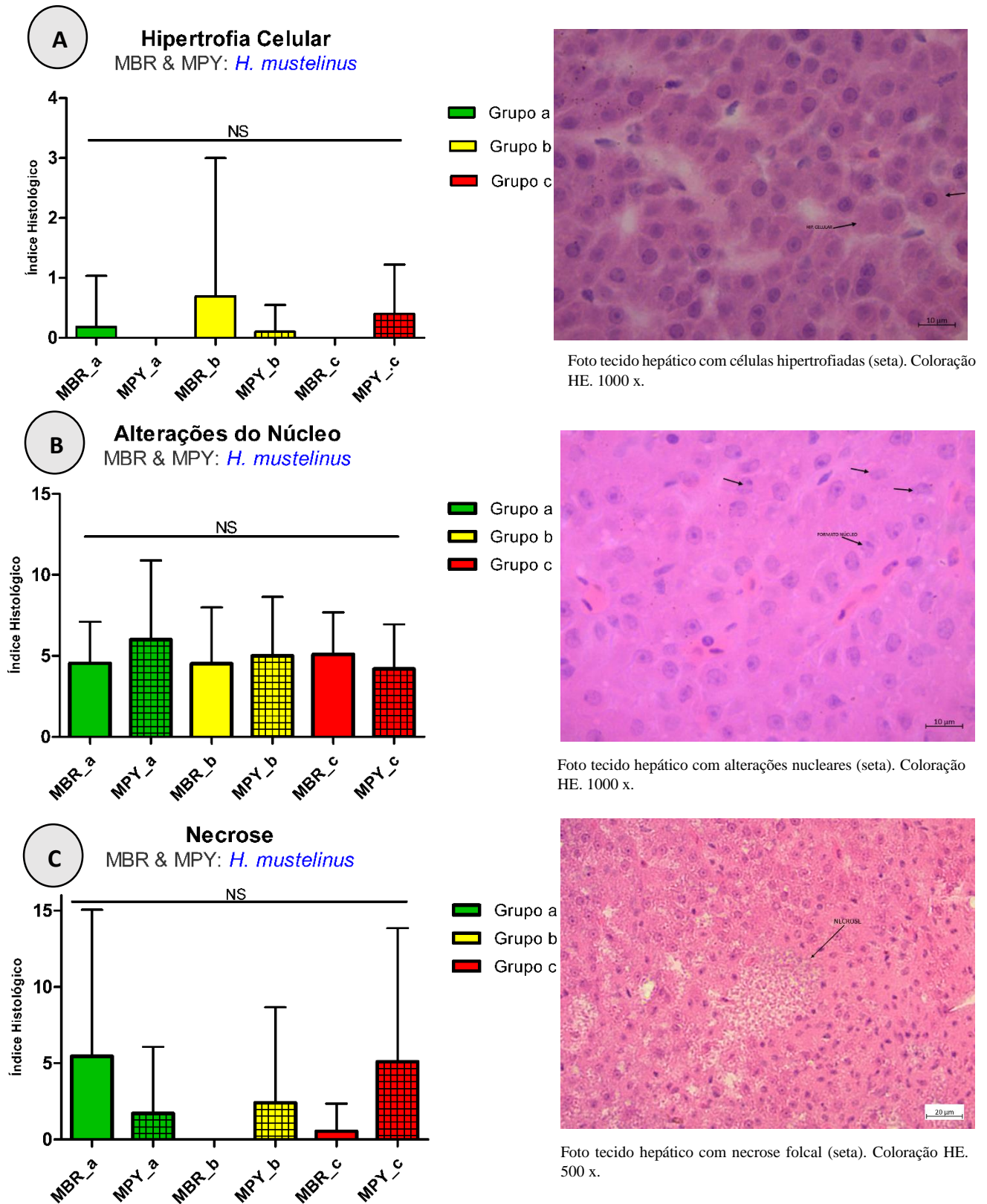


Figura 12 - Br x Py: índices das alterações histológicas (médias e SD superior) de amostras de fígado em *H. mustelinus* **A:** Hip. Celular. **B:** Alt. Núcleo. **C:** Necrose. (MBR): microbacias brasileiras. (MPY): microbacias paraguaias. **a- verde**- bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes; **b- amarelo**- bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **c- vermelho**- bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes.. ANOVA, Teste de Kruskal- Wallis / Dunn. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,0001$ (***) ; NS: sem diferenças significativas.

Tabela 8 – Índices histológicos (médias e desvio padrão) das alterações de amostras de fígado em *H. mustelinus* coletados no Brasil e Paraguai.

Alterações Histológicas	Brasil			Paraguai		
	MBR a (n = 22)	MBR b (n = 22)	MBR c (n = 11)	MPYa (n = 14)	MPY b (n = 20)	MPY c (n = 20)
Hemorragia	1.09 ±2.29	1.13 ±2.47	0.91 ±2.43	1.00 ±2.32	0.90 ±2.10	0.60 ±1.31
Necrose	5.45 ±9.61	0.00 ±0.00	0.55 ±1.81	1.71 ±4.36	2.40 ±6.28	5.10 ±8.77
Degeneração Vacuolar	1.09 ±2.02	0.96 ±2.33	0.36 ±1.21	1.00 ±1.88	1.10 ±2.00	0.90 ±2.10
Alterações de Núcleo	4.55 ±2.56	4.52 ±3.48	5.09 ±2.59	6.00 ±4.90	5.00 ±3.64	4.20 ±2.75
Alterações de Arquitetura	0.82 ±1.18	0.61 ±1.53	0.55 ±0.93	1.14 ±1.51	0.80 ±1.36	1.00 ±1.38
Hipertrofia Celular	0.18 ±0.85	0.70 ±2.30	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.10 ±0.45	0.40 ±0.82

Valores representam as médias e desvio padrão ±SD. Os valores entre parênteses representam *n*: número de amostras. **a**: bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes; **b**: bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **c**: bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes. **MBR**: bacias do Brasil; **MPY**: bacias do Paraguai.

3 – Conjunto (total) das alterações histológicas observadas em cada grupo.

Quando os diferentes tipos de alterações são comparados entre si dentro de cada grupo (A, B e C), individualmente por país, foi possível observar diferenças significativas. (Figuras 13, 14 e 15).

As alterações nucleares foram as anormalidades mais frequentes e com maiores índices histológicos (médias) observadas na maioria dos grupos conforme figuras 13, 14 e 15. As exceções ocorreram nas microbacias MBRa (Brasil) e MPYc (Paraguai) (Figuras 13A e 15B). Nestes dois grupos os índices médios para necrose foram maiores em relação às alterações nucleares. Assim, no grupo MBRa as diferenças estatísticas foram entre necrose e alterações nucleares ($p: 0,01$) (Figura 13A) e embora exista maior tendência para necrose no grupo MPYc (média 5,10) em relação às alterações nucleares (média 4,20), diferenças estatísticas não foram observadas (Figura 15B).

Portanto, com exceção de MBRa e MPYc, para os demais grupos (MBRb, MBRc, MPYa, MPYb) as alterações nucleares foram o tipo de alteração com os maiores índices histológicos e demonstraram diferenças significativas quando comparada aos demais tipos de alterações observadas (hemorragia, degeneração vacuolar, alteração na arquitetura do tecido, hipertrofia celular e necrose) (Figuras 13B; 14AB; 15A).

Figura 13 – Comparação das alterações histológicas em *H. mustelinus* nas Microbacias agrícolas de baixo impacto de micropoluentes.

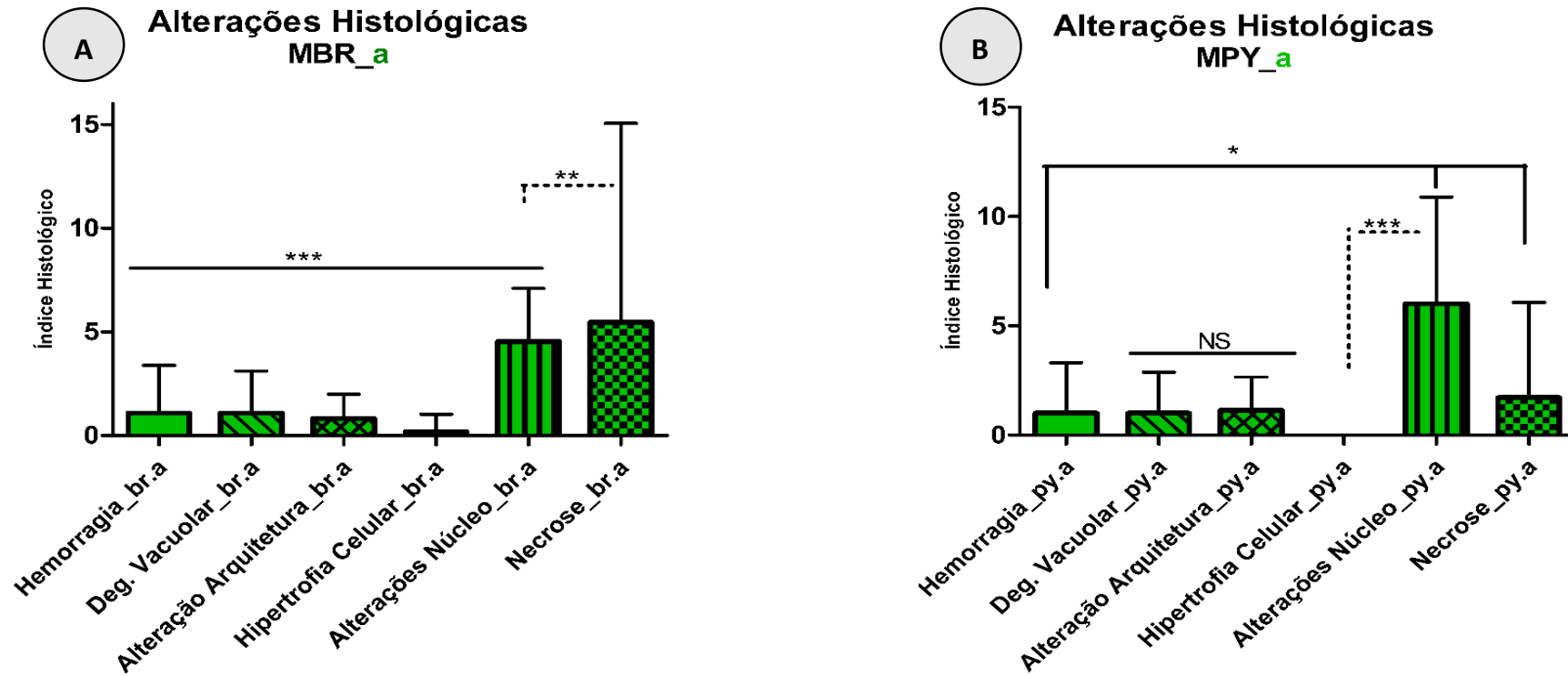


Figura 13 – Comparação das alterações histológicas (média e SD superior) observadas em amostras de fígado em *H. mustelinus*. **A:** Microbacias do Brasil em área não agrícola e baixa contaminação de micropoluentes (**MBR_a**). **B:** Microbacias do Paraguai em área não agrícola e baixa contaminação de micropoluentes (**MPY_a**). Análises estatísticas, baseadas nos testes de variância ANOVA, *Teste de Kruskal- Wallis* com múltiplas comparações, com pós teste de *Dunn*. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,0001$ (***), **NS**: sem diferenças significativas.

Figura 14 -- Comparação das alterações histológicas em *H. mustelinus* nas microbacias agrícolas e de médio impacto de micropoluentes.

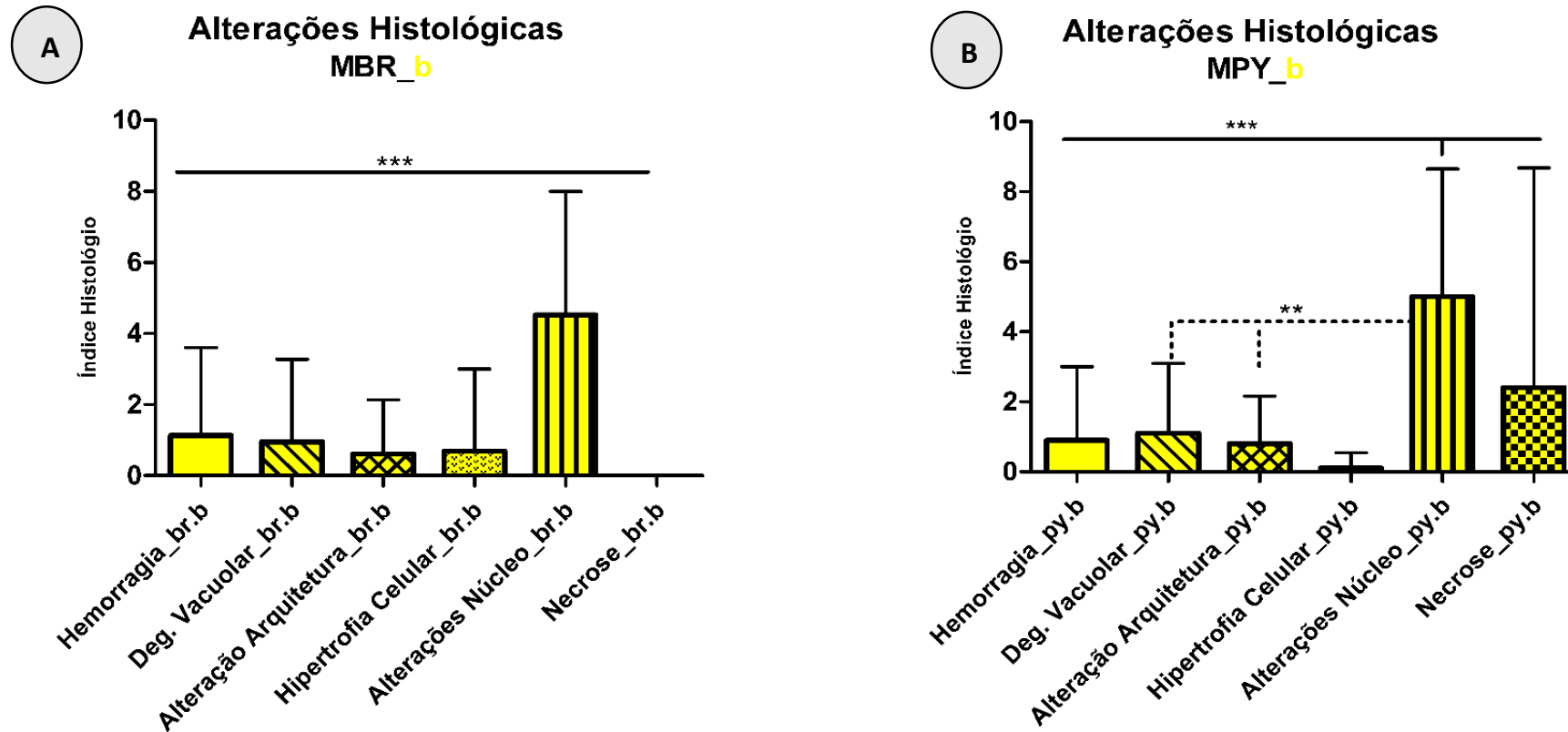


Figura 14 - Comparação das alterações histológicas (média e SD superior) observadas em amostras de fígado em *H. mustelinus*. **A:** Microbacias do Brasil em área agrícola e média contaminação de micropoluentes (**MBR_b**). **B:** Microbacias do Paraguai em área agrícola e média contaminação de micropoluentes (**MPY_b**). Análises estatísticas, baseadas nos testes de variância ANOVA, *Teste de Kruskal- Wallis* com múltiplas comparações, com pós teste de *Dunn*. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,0001$ (***), NS: sem diferenças significativas.

Figura 15- Comparação das alterações histológicas em *H. mustelinus* nas microbacias agrícolas e de alto impacto de micropoluentes.

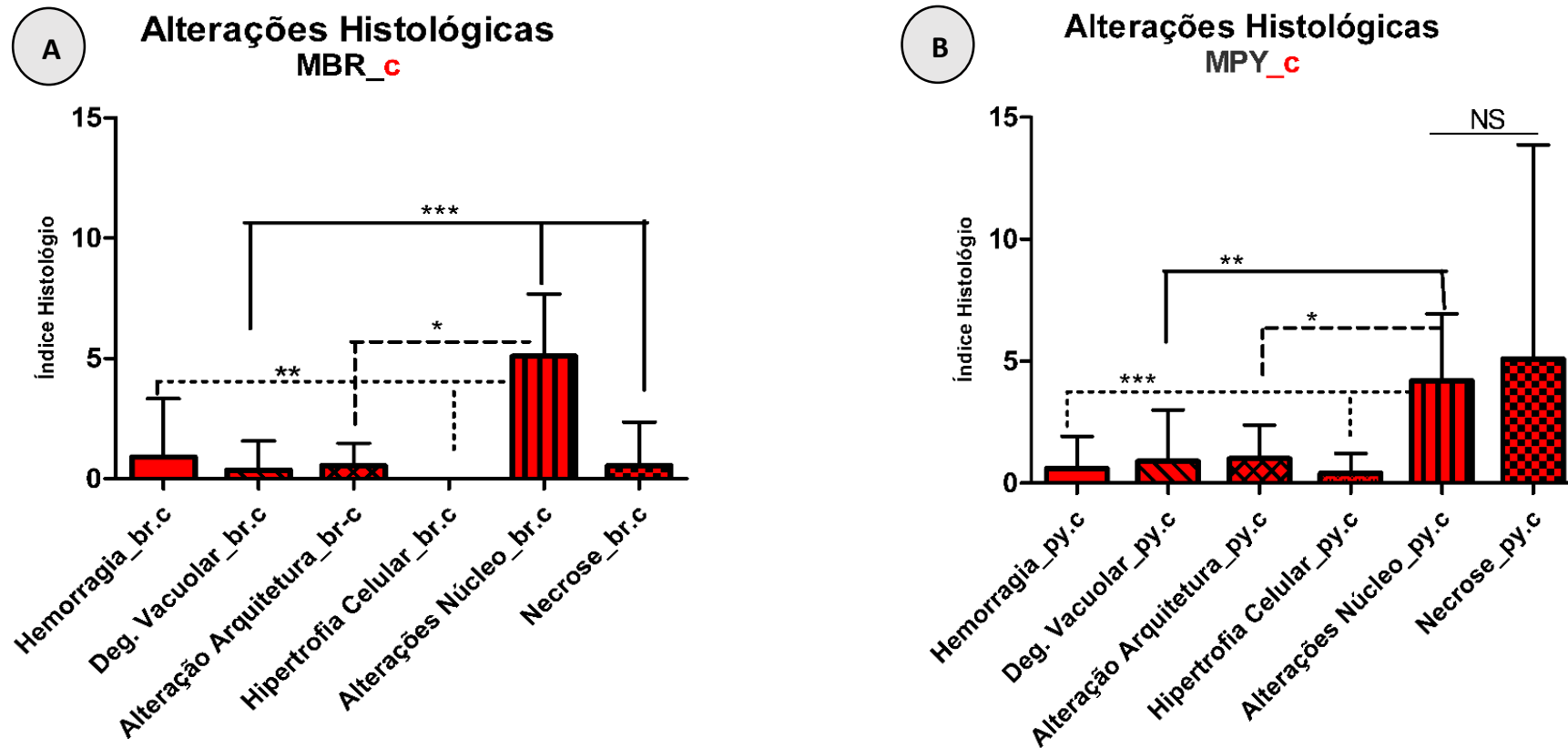


Figura 15- Comparação das alterações histológicas (média e SD superior) observadas em amostras fígado em *H. mustelinus*. **A:** Microbacias do Brasil em área agrícola e alta contaminação de micropoluentes (**MBr_c**). **B:** Microbacias do Paraguai em área agrícola e alta contaminação de micropoluentes (**MPY_c**). Análises estatísticas, baseadas nos testes de variância ANOVA, *Teste de Kruskal- Wallis* com múltiplas comparações, com pós teste de *Dunn*. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,0001$ (***), NS: sem diferenças significativas.

4.2 ÍNDICES HISTOLÓGICOS

O índice Iorg.rp “Padrão de Reação” permite expressar as lesões por tipo de reação, possibilitando a comparação entre os padrões (importância e a frequência de ocorrência). Foram observadas alterações histológicas associadas aos seguintes padrões de reação: Distúrbios Circulatórios (RP1); Alterações Regressivas (RP2); Mudanças Progressivas (RP3). No entanto, não foram observadas alterações associadas aos padrões: Inflamações (RP4) e Tumores (RP5) (Figura 16).

Figura 16 - Índice histológico: Padrão de Reação em *H. mustelinus*.

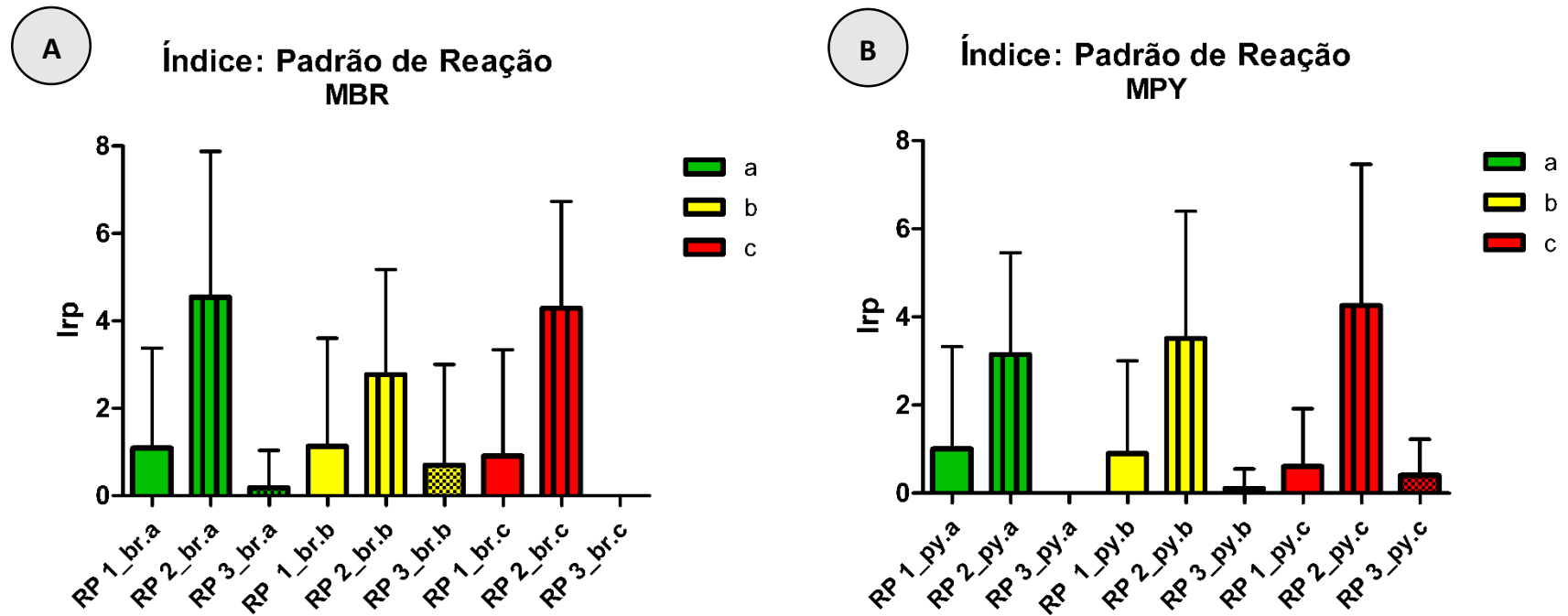


Figura16 - Perfil histológico (média e SD superior) para o índice: Padrão de Reação de fígado em *H. mustelinus*. **A - MBR:** microbacias brasileiras. **B - MPY:** microbacias paraguaias-. **a -Colunas em verde-** bacias não agrícolas com baixa contaminação com micropoluentes; **b -colunas em amarelo** microbacias agrícolas com média contaminação com micropoluentes; **c -colunas em vermelho-** bacias agrícolas com alta contaminação com micropoluentes. **RP1** – Distúrbios Circlatórios; **RP2** – Mudanças Regressivas; **RP3** Alterações Progressivas.

1 – Padrões de Reação: RP1, RP2 e RP3 comparados individualmente dentro de cada grupo em relação aos países.

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os padrões de reação quando esses índices são comparados dentro de cada grupo entre os dois países: Brasil e Paraguai (Figura 17).

Quando observamos os padrões de reação, RP1, RP2 e RP3 de cada grupo, observa-se uma tendência aumentada para alguns desses grupos quando são comparados entre Brasil e Paraguai. Em RP1 essa tendência é observada nos índices entre as microbacias de alto impacto: MBRc (média 0,91) e MPYc (média 0,60), conforme figura 17 A. Em RP2 entre as microbacias baixo impacto: MBRa (média 4,55) e MPYa (média 3,14) e microbacias de médio impacto: MBRb (média 2,76) e MPYb (média 3,51), conforme figura 17 B. Esta tendência também é observada em R3 porém nos 03 grupos: baixo impacto MBR a (média 0,18) e MPYa (média 0,00); médio impacto: MBRb (média 0,70) e MPYb (média 0,10) e alto impacto MBRc (média 0,00) e MPYc (0,40) (Figura 17 C).

Embora exista essa tendência observada em RP1, RP2 e RP3, indicada pelas médias dos índices histológicos (RP), diferenças significativas não ocorreram em virtude da heterogeneidade amostral dentro de cada grupo evidenciado pelos altos desvios padrões (Tabela 10).

Figura 17- Padrões de Reação para os diferentes grupos, análise: MBR x MPY.

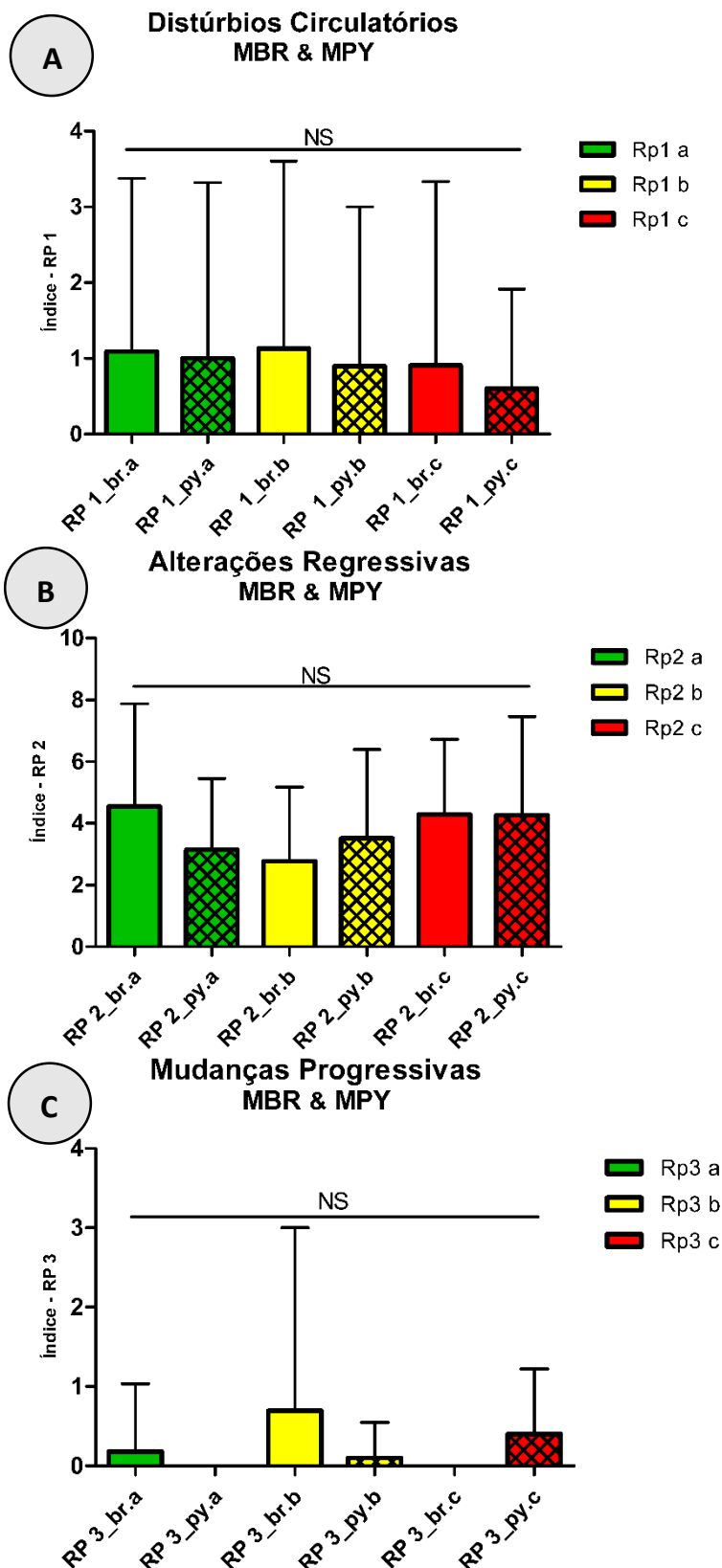


Figura 17 – Padrão de reação (média: SEM) de fígado em *H. mustelinus*. **A:** RP1 - Distúrbios Circulatórios (BR x PY). **B:** RP2 - Mudanças Regressivas (BR x PY). **C:** RP3 - Alterações Progressivas (BR x PY). **a- verde-** bacias não agrícolas com baixa contaminação com micropoluentes; **b- amarelo-** bacias agrícolas co média contaminação com micropoluentes; **c-vermelho-** bacias agrícolas com alta contaminação com micropoluentes. Análises estatísticas, baseadas nos testes de variância ANOVA, *Teste de Kruskal- Wallis* com múltiplas comparações, com pós teste de *Dunn*. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,0001$ (***)

Tabela 9 - Índice Histológico (médias e desvio padrão): Padrão de reação das amostras hepáticas de *H. mustelinus* coletados no Brasil e Paraguai

Índie Histológico	Brasil			Paraguai		
	MBRa (n = 22)	MBRb (n = 23)	MBRc (n = 11)	MPYa (n = 14)	MPYb (n = 20)	MPYc (n = 20)
Irp1 - Distúrbios Circulatórios	1.09 ±2.29	1.13 ±2.47	0.91 ±2.43	1.00 ±2.32	0.90 ±2.10	0.60 ±1.31
Irp2 - Mudanças Regressivas	4.55 ±3.33	2.76 ±2.41	4.29 ±2.44	3.14 ±2.31	3.51 ±2.89	4.26 ±3.21
Irp3 - Alterações Progressivas	0.18 ±0.85	0.70 ±2.30	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.10 ±0.45	0.40 ±0.82

Valores representam as médias e desvio padrão ±SD. Os valores entre parênteses representam *n*: número de amostras. **a**: bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes; **b**: bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **c**: bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes. **MBR**: bacias do Brasil; **MPY**: bacias do Paraguai.

2 – Conjunto de Padrões de Reação observados dentro de cada grupo, análise individual por país.

Quando os padrões de reação observados (RP1, RP2 e RP3) são comparados entre si dentro de cada grupo, analisando-se cada país individualmente, os maiores índices foram observados nas alterações histológicas enquadradas no Padrão de Reação RP2 – Alterações Regressivas, em todos os níveis de impactos nas microbacias do Brasil e do Paraguai (Figuras 18 e 19). Assim, as alterações regressivas foram as anormalidades histológicas que mais contribuíram para o dano geral do fígado de *H. mustelinus* nas diferentes microbacias. As diferenças significativas foram observadas dentro de cada grupo (A, B e C) quando o índice RP2 é comparado com os demais padrões de reação: Distúrbios Circulatórios (RP1) e Mudanças Progressivas (RP3) (Figuras 18 e 19).

As alterações enquadradas no padrão de reação, Alterações Progressivas (RP3), não foram observadas no grupo MPYa do Paraguai (Figura 18B) e para o Brasil no grupo MBRc (Figura 18C).

Figura 18 - Perfil histológico para os índices de padrão de reação RP1, RP2 e RP3 para as microbacias de baixo impacto de micropoluentes (Brasil e Paraguai).

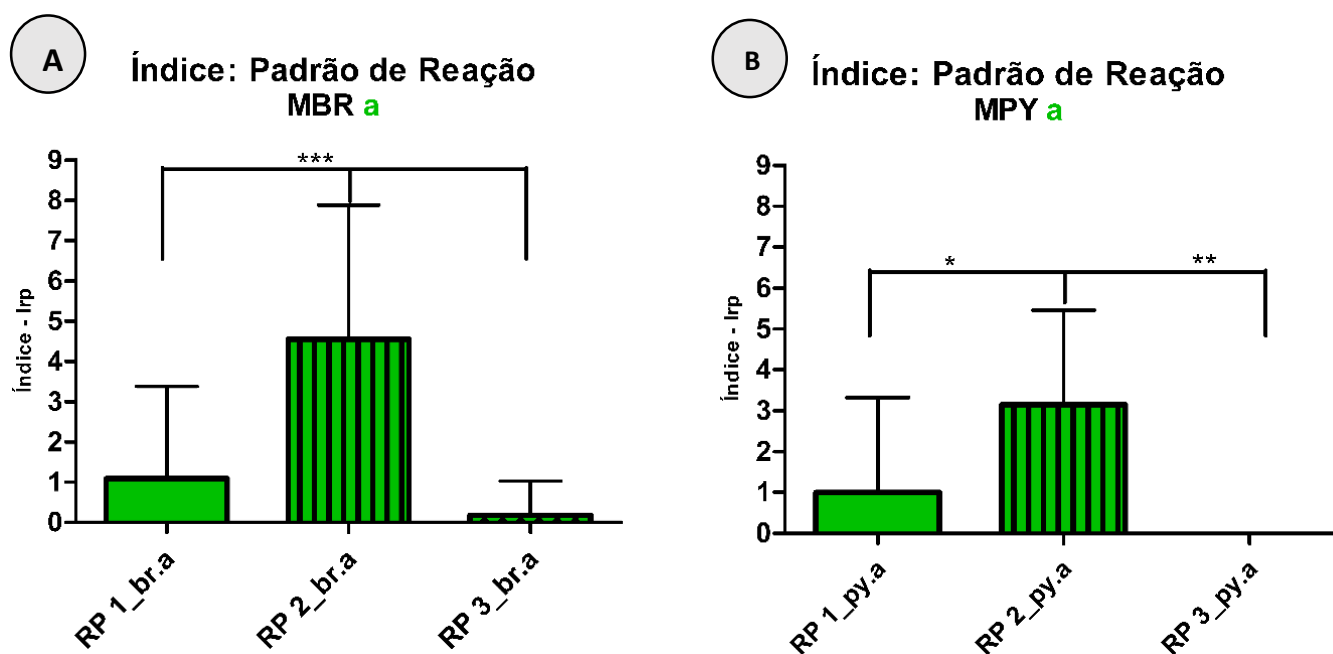


Figura 18 – Padrão de reação (média e SD superior) em fígado de *H. mustelinus* coletados nas microbacias da BP3. **A:** **MBRa** – microbacias do Brasil em áreas não agrícolas com baixo impacto de micropoluentes, **B:** **MPYa** - microbacias do Paraguai em áreas não agrícolas com baixo impacto de micropoluentes. **RP1** – Distúrbios Circulatórios. **RP2** – Mudanças Regressivas. **RP3** – Alterações Progressivas. Análises estatísticas, baseadas nos testes de variância ANOVA, *Teste de Kruskal- Wallis* com múltiplas comparações, com pós teste de *Dunn*. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,0001$ (***).

Figura 19 - Perfil histológico para o índice padrão de reação RP1, RP2 e RP3 para as microbacais de médio e alto impacto d (Brasil e Paraguai).

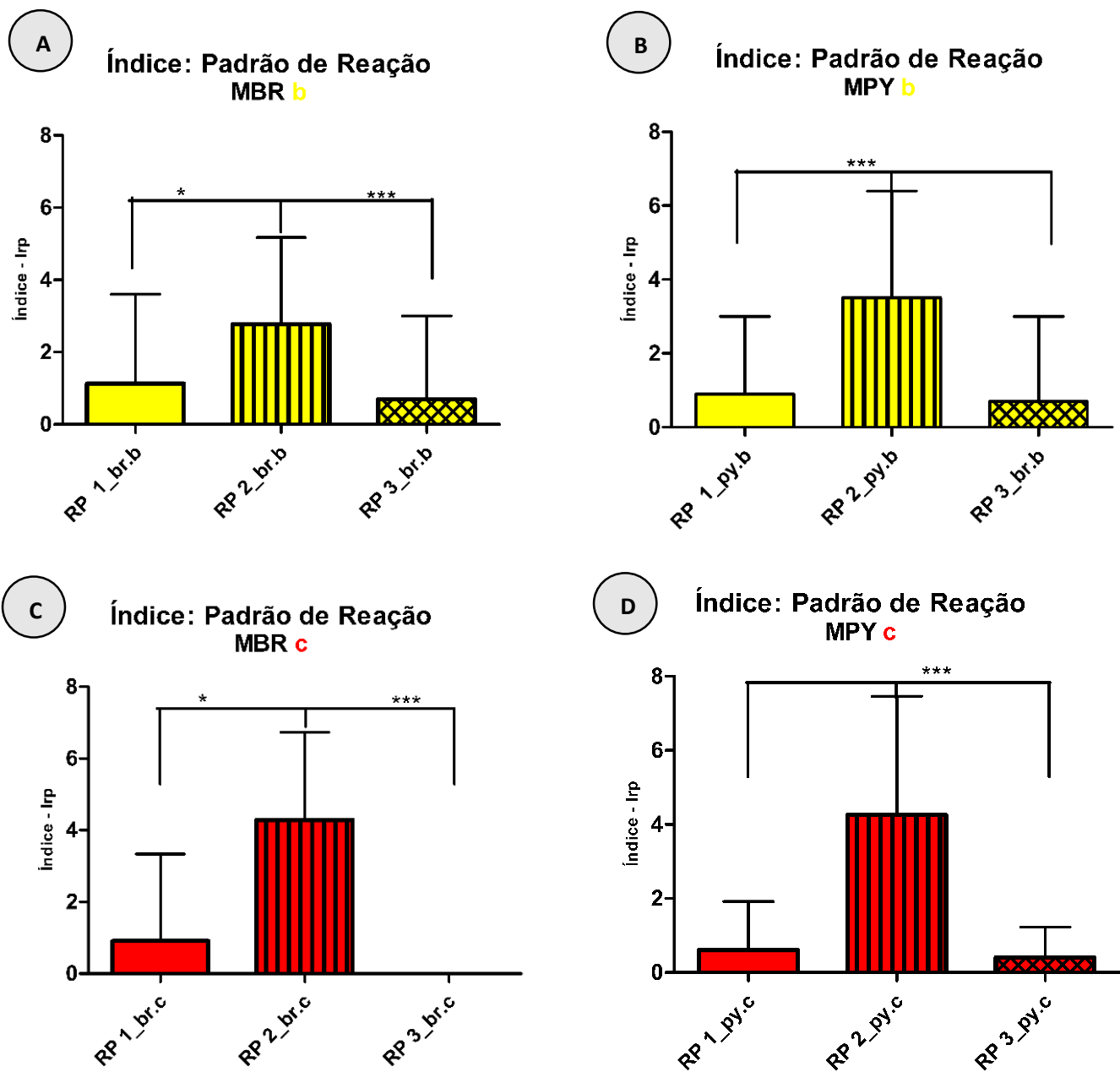


Figura 19– Padrão de reação (média e SD superior) em fígado de *H. mustelinus* coletados nas microbacais da BP3. **A e B: (em amarelo)** – microbacais em áreas agrícolas com médio impacto de micropoluentes, **C e D: (em vermelho)** - microbacais em áreas agrícolas com alto impacto de micropoluentes. **RP1** – Distúrbios Circulatorios. **RP2** – Mudanças Regressivas. **RP3** – Alterações Progressivas Análises estatísticas, baseadas nos testes de variância ANOVA, *Teste de Kruskal- Wallis* com múltiplas comparações, com pós teste de *Dunn*. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,0001$ (***).

O índice histológico Iorg permite verificar o grau de dano no órgão investigado, nesse caso o fígado em *H. mustelinus*. Embora não fossem observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos e entre os países como mostra a figura 20, baseando-se nas médias de Iorg dos grupos, nota-se uma tendência de maior dano para as amostras coletadas no tratamento MBRa (média $5,82 \pm 5,54$) para margem do Brasil (Tabela 10).

Figura 20- Índice histológico para dano no fígado (Iorg) em *H. mustelinus*.

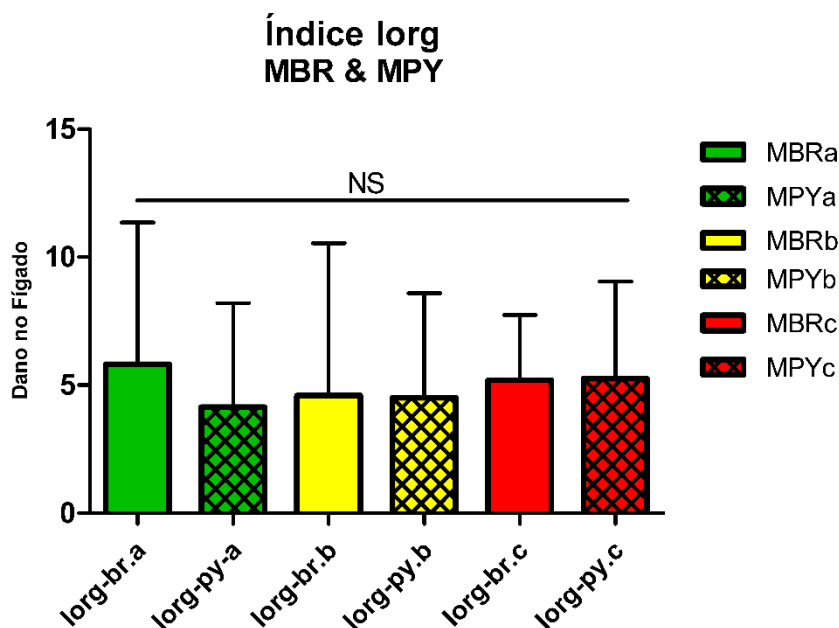


Figura 20 – Iorg: Índice do dano no órgão (média e SD superior) em fígado de *H. mustelinus* coletados em diferentes microbacias da BP3 nas margens Brasil (MBR) e Paraguai (MPY). **a- verde-** bacias não agrícolas com baixa contaminação com micropoluentes; **b- amarelo-** bacias agrícolas com média contaminação com micropoluentes; **c- vermelho-** bacias agrícolas com alta contaminação com micropoluentes. Análises estatísticas, baseadas nos testes de variância ANOVA, *Teste de de Kruskal-Wallis* com múltiplas comparações com pós teste de *Dunn*. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.0001$ (***).

Tabela 10 - Índice Iorg correspondente ao grau de dano no fígado de *H. mustelinus* nos diferentes grupos do Brasil e Paraguai.

Índice Histológico	Grupo a	Grupo b	Grupo c
Iorg_MBR	5.82 ± 5.54	4.59 ± 5.95	5.20 ± 2.54
	(n = 22)	(n = 23)	(n = 11)
Iorg_MPY	4.14 ± 4.06	4.51 ± 4.08	5.26 ± 3.78
	(n = 14)	(n = 20)	(n = 20)

Valores representam as médias e desvio padrão \pm SD de Iorg. Os valores entre parênteses representam *n*: número de amostras. **a:** bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes; **b:** bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **c:** bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes. **MBR:** bacias do Brasil; **MPY:** bacias do Paraguai.

Como forma de se testar o efeito das variáveis: países (Brasil e Paraguai) e impacto agrícola da microbacia (a; b; c) sobre os achados histológicos (Iorg), foi aplicado o teste ANOVA em modelo Fatorial. Os dados do índice Iorg foram verificados quanto ao atendimento aos pressupostos de homogeneidade de variâncias (teste de Levene) e normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e após transformações de logaritmização atendeu aos requisitos necessários para a aplicação desse teste estatístico.

Os resultados demonstraram uma interação positiva entre Iorg e os países investigados, tendo seu efeito observado entre as microbacias com baixa contaminação. Para estas microbacias brasileiras (MBRa) Iorg foi maior quando comparado com o Paraguai (MPYa) (Figura 21).

Figura 21– Índice histológico de dano no fígado frente as variáveis testadas.

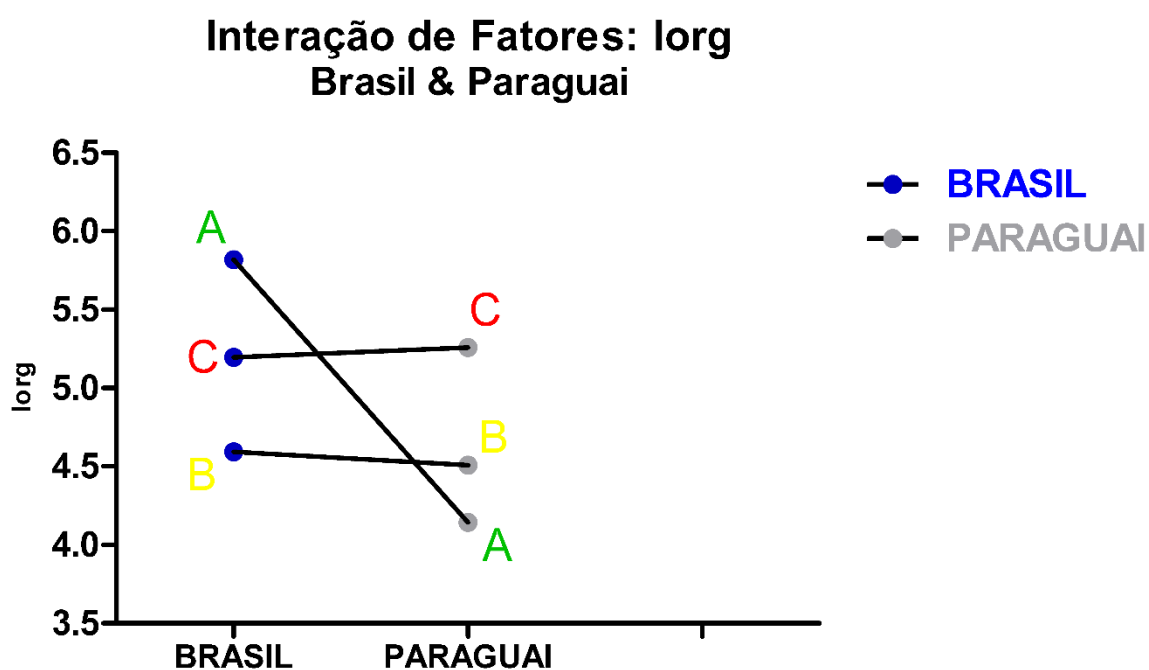


Figura 21- Interação de fatores das variáveis: países e impacto agrícola das microbacias. **A (em verde)** – microbacias não agrícolas com baixo impacto de micropoluentes. **B: (em amarelo)** – microbacias em áreas agrícolas com médio impacto de micropoluentes, **C (em vermelho)** - microbacias em áreas agrícolas com alto impacto de micropoluentes. **Iorg** – Índice de dano no órgão (fígado). Análises estatísticas, baseada no teste de variância ANOVA, modelo Fatorial: interaçõesignificativa entre microbacias A (Brasil e Paraguai).

5. DISCUSSÃO

Considerando que a área de estudo está localizada em uma região com uma proeminente atividade agropecuária, que faz uso de agrotóxicos no processo de produção e ainda que as áreas de entorno da maioria dessas microbacias investigadas são constituídas de áreas agrícolas, este cenário nos permite entender a ocorrência confirmada de compostos micropoluentes nos riachos associadas a essas ações/atividades (antropogênicas) que ocorrem na região em torno do reservatório da Itaipu. No entanto, ao compararmos individualmente a ocorrência desses compostos em cada país, nota-se um maior número destes micropoluentes nas microbacias brasileiras (36 compostos) em relação às microbacias do Paraguai (22 compostos), sugerindo assim, que as áreas estudadas do lado brasileiro podem estar potencialmente mais impactadas e possivelmente mais susceptíveis aos efeitos da presença desses contaminantes.

A histologia tem se mostrado uma ferramenta bioindicadora confiável e amplamente utilizada nos estudos ecotoxicológicos, seja para estudos em ambientes controlados (BALLESTEROS *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2007; ANNABI *et al.*, 2011; ZENI *et al.*, 2016) ou para experimentos em campo (STENTIFORD *et al.*, 2003; RAUTENBERG, *et al.*, 2015; CAMARGO; MARTINEZ, 2007; MARCHAND *et al.*, 2009; MCHUGH *et al.*, 2011). As investigações histológicas realizadas por inúmeros grupos de pesquisa indicam que o fígado pode ser um órgão sensível a fatores xenobióticos no ambiente (MARCON, *et al.*, 2009; VALON, *et al.*, 2013; PEREIRA, 2014; YANCHEVA, *et al.*, 2016). Dentre as alterações histológicas mais encontradas em estudos de fígado de peixes expostos a pesticidas, a hipertrofia celular, degeneração vacuolar, alteração do núcleo, alteração na arquitetura do tecido, hemorragia e necrose, são as mais frequentes (MELA, *et al.*, 2013; SARAIVA, *et al.*, 2015; VREYS, *et al.*, 2019).

Uma vez que a necrose se trata de uma alteração não reversível, portanto de grande impacto à saúde do organismo (MCHUGH *et al.*, 2011) por estar relacionada à resposta à exposições crônicas de diversos pesticidas, metais pesados e águas residuais (TRONCOSO, *et al.*, 2012; RAUTENBERG, *et al.*, 2015), bacias que apresentam um perfil de impacto ecológico distinto, como é o caso das microbacias MBRa e MPYc, não era esperado que apresentassem semelhanças (na frequência desta anormalidade). No

presente estudo, entretanto, observou-se que o índice para necrose no fígado de *H. mustelinus* se mostrou mais evidente nesses dois grupos de cada país: MBRa (baixo impacto na margem brasileira) (média = 5.45 ± 9.61) e MPYc (alto impacto na margem paraguaia) (média = 5.10 ± 8.77). Esses dados sugerem que para esse critério (ocorrência de necrose), bacias brasileiras consideradas aqui como de baixo impacto antrópico podem apresentar características de impacto semelhante aos observados em bacias do Paraguai caracterizadas, conforme critérios estabelecidos nesse trabalho, como ambientes de alto impacto ecológico. Se observamos também os resultados de micropoluentes para esses dois grupos, os resultados apontam um número bem próximo de compostos identificados, MBRa com 18 micropoluentes identificados e MPYc com 16 micropoluentes identificados, o que sugere que as alterações histológicas estão mais relacionadas ao critério de micropoluentes do que a paisagem das microbacias.

Surpreendentemente, a necrose, considerada uma alteração de grande impacto à saúde do indivíduo, não foi registrada no grupo de peixes da microbacia MBRb, ainda que este ambiente tenha apresentado um maior número de micropoluentes detectados (26, quando comparados as bacias MBRa e MPYc (18 e 16) compostos identificados respectivamente) e que, em contraste, registraram nas análises histológicas as maiores médias de ocorrência para necrose, respectivamente 5.45 e 5.10 (índices de alterações). Desse modo, a realização de análises quantitativas em relação à concentração de micropoluentes é necessária para elucidar se tais fatos estão ou não relacionados à influência de micropoluentes específicos, bem como a interação entre eles no ecossistema local. Em estudos com *Prochilodus lineatus* confinados em riachos e próximos a áreas agrícolas, as análises químicas da água demonstraram que a concentração de alguns contaminantes variou com o tempo em virtude da interferência da atividade agrícola e as alterações histológicas também parecem sofrer essa variação, resultando em danos mais expressivos nos períodos de concentração mais alta de poluentes (VIERIA, *et al.*, 2019).

Quando avaliamos o perfil histológico de degeneração vacuolar no fígado, observa-se uma frequência indiscriminada em todos os grupos das bacias investigadas. Acredita-se que esse perfil histológico possa decorrer da metabolização anormal de lipídeos, podendo resultar no deslocamento do núcleo para a periferia, bem como, na degeneração citoplasmática (MELA *et al.*, 2013; YANCHEVA *et al.*, 2016). A vacuolização pode ocorrer em decorrência de acúmulo de glicogênio ou lipídeo devido à ingestão de energia acima da demanda metabólica, comumente observada em peixes em

cativeiro ou também estar associada a um mecanismo de defesa do organismo contra a ação de compostos químicos lipofílicos (WOLF, *et al.*, 2014). Segundo MELA *et al.* (2013), para que isso ocorra, os lipídeos requerem a porção lipo-solúvel do poluente, minimizando seus efeitos. No entanto, alguns autores descrevem que essa alteração pode estar relacionada a uma característica comum a algumas espécies, estando associados à sua fisiologia normal (WOLF, *et al.* 2014; COLIN, *et al.*, 2016). Vreys, *et al.*, (2019) trabalharam com biomarcadores histológicos em *H. mustelinus* coletados em campo e, embora também tenham identificado degeneração vacuolar (lipídica e hidrópica), esta foi observada apenas em alguns dos indivíduos analisados no respectivo estudo, o que sugere não ser uma característica fisiológica normal para esta espécie, mas sim resultado da presença de micropoluentes. Assim a alta frequência de degeneração vacuolar observada no presente estudo, pode indicar uma relação com a presença de contaminantes nesses locais.

Segundo Marchand *et al.*, (2009), estressores estão associados a alterações nos hepatócitos e podem ser observadas não somente no citoplasma, mas também no núcleo, sendo que essas últimas (alterações nucleares) refletem uma resposta importante do órgão, pois a progressão dessas anormalidades pode comprometer o funcionamento do fígado, caso a exposição ao agente estressor seja mantida (CAMARGO, MARTINEZ, 2007; YANCHEVA *et al.*, 2016). Foram observadas alterações nucleares em 100% dos indivíduos analisados, portanto, em todos os grupos (a, b e c) de ambos países. Resultados semelhantes nos quais alterações nucleares apareceram com maior frequência, também foram observados em experimentos com *Gambusia affinis* (ANNABI *et al.*, 2011), sob exposição aguda a Cádmiio, e *Clarias gariepinus* (MARCHAND *et al.*, 2009) em águas eutrofizadas, onde se observou uma hipertrofia nuclear bem evidente nos hepatócitos. Alterações do núcleo, como hipertrofia nuclear, também registrada em todas as microbacias analisadas nesse estudo, podem estar associadas a distúrbios na regulação osmótica na membrana dos hepatócitos, assim como a uma etapa preliminar a necrose e morte celular (CAMARGO, MARTINEZ, 2007; YANCHEVA, *et al.*, 2016). Assim, o registro de alterações nucleares em todos os indivíduos da bacia, é um possível indicativo de resposta do órgão à presença dos micropoluentes, e talvez sejam etapas preliminares de processos degenerativos mais graves causados pela presença de contaminantes, considerando que estes foram detectados em todos esses locais.

Sob a perspectiva proposta por Bernet *et al.* (1999), também adotada nesse estudo, podemos ainda considerar as alterações nucleares, tão evidentes nesse estudo, como alterações funcionalmente importantes, uma vez que, segundo o próprio autor, podem resultar na redução ou perda funcional de um órgão (apesar de serem consideradas como reversíveis, na maioria dos casos, se o agente estressor é neutralizado). Nesse sentido, seria importante considerar a repetição das análises (histológicas e química na água) para verificar a influência da sazonalidade sobre estas respostas biológica. Considerando que a ocorrência dos micropoluentes esteja diretamente relacionada à aplicação de agrotóxicos, os períodos em que esses não ocorrem ou sejam mínimos (na área de entorno do reservatório da Itaipu), poderiam resultar em alterações nucleares correspondentemente reduzidas. Assim, para analisar tal relação, é fundamental estabelecer novas coletas em períodos baseados no calendário agrícola brasileiro para os principais cultivos da região (milho e soja por exemplo), uma vez que no Brasil este calendário já é bem estabelecido (julho e setembro, correspondente ao período do vazio sanitário; outubro e novembro, correspondente ao período da safrinha) (IAPAR, 2020), embora o Paraguai não siga esta mesma metodologia sazonal de cultivo.

A ocorrência das alterações histológicas enquadradas em três dos padrões de reação RP1, RP2 e RP3, também foram encontradas em resultados de outros experimentos, como em análise do efeito de atrazina em *Rhamdia quelen* (MELA *et al.*, 2013); DDT em *Hydrocynus vittatus* (MCHUGH *et al.*, 2011) e pesticidas em *Gambusia affinis* (RAUTENBERG, *et al.*, 2015). Nas microbacias investigadas, alterações associadas a tais padrões de reação podem indicar um perfil histológico mais relacionado a processos moderados de respostas ao impacto antropogênico, uma vez que alterações descritas no padrão de reação RP5 “Tumores”, são mais comuns a exposição de longo prazo em ambientes cronicamente impactados (OLIVEIRA-RIBEIRO, *et al.*, 2005), não foram detectadas no presente estudo.

Entre os três padrões observados, o padrão RP2 “alterações progressivas” foi o mais evidente, estando presente em todos os grupos investigados, tanto para Brasil como para o Paraguai. Esses dados estão de acordo com outros estudos de campo, como os encontrados em *Gambusia affinis* e *Clarias gariepinus*, que também demonstraram alterações progressivas como as mais frequentes em peixes coletados nos locais mais impactados, sendo também as mais significativas em relação aos demais padrões de reação (MARCHAND, *et al.*, 2009; RAUTENBERG, *et al.*, 2015). Portanto, no presente

estudo, os índices de RP2 contribuíram mais para os valores gerados para Iorg, índice que reflete o grau do dano geral do órgão. Esses resultados estão de acordo com os achados observados em pesquisa com *H. mustelinus* coletados em riachos da Argentina (VREYS *et al*, 2019), reforçando que tais alterações histológicas podem ser evidências mais frequentes dos efeitos da presença de contaminantes na água.

A interação observada entre a variável: países (Brasil e Paraguai), pode demonstrar através do índice de lesão hepático “Iorg”, que os peixes coletados nas microbacias brasileiras MBRa apresentaram o fígado mais comprometido do que os peixes coletados nestas mesmas microbacias do lado paraguaio. Esses resultados também podem estar associados a diferença observada em relação ao número de micropoluentes detectados nestas microbacias, sendo 18 no Brasil e 10 no Paraguai. Isso reforça a indicação da relação de efeito da presença destes compostos contaminantes na ocorrência de lesões do fígado em *H. mustelinus*, observados nesse estudo.

Resultados semelhantes também foram observados pelo grupo de pesquisa⁴ “Análise do potencial mutagênico e genotóxico dos micropoluentes dos riachos do Paraná 3 Brasil e Paraguai em sangue de *Heptapterus mustelinus*”, que realizou análises mutagênicas em eritrócitos quanto a ocorrência de anormalidades nucleares e micronúcleos, utilizando os mesmos indivíduos (peixes) desse estudo. Os resultados obtidos nessas análises (dados ainda não publicados) demonstraram diferenças significativas ($P < 0,01$) de micronúcleos (MN) observados nos indivíduos coletados nas microbacias MBRa e MPYa, indicando que bacias brasileiras menos impactadas (MBRa) podem ter influência de mais fatores xenobióticos no ambiente do que nas bacias MPYa.

Biomarcadores são indicadores biológicos que respondem de várias maneiras aos efeitos da exposição a um estressor (YANCHEVA, *et al.*, 2016). Neste sentido, os resultados obtidos pelo teste de MN estão de acordo com os achados histológicos, especificamente em relação ao índice Iorg, que por meio do teste de interação dos dados com as variáveis “países” e “impactos agrícola das microbacias (a; b; c)”, demonstrou que, quando comparadas as mesmas microbacias, os indivíduos coletados no lado brasileiro (MBRa) apresentavam mais alterações no teste do MN, além de apresentarem o fígado mais comprometido, quando comparados aos do lado paraguaio (MPYa). Esses dados permitem sugerir que especificamente nesses locais da margem brasileira (MBRa),

⁴ Dados ainda não publicados, colaboradores: Profa. Tathiana Corrêa de Melo; Pedro Henrique Grignet; Maria Antonela Silva Lezcano

os peixes parecem responder mais intensamente à presença de estressores do que na margem paraguaia (MPYa). Os dados das análises químicas da água também dão suporte a essa hipótese, uma vez que as bacias MBRa apresentam quase duas vezes mais tipos de micropoluentes quando comparadas às bacias de MPYa.

As investigações de biomarcadores histológicos e mutagênicos, principalmente a interação entre eles, em peixes expostos aos micropoluentes em ambientes naturais, devem levar em consideração as características ambientais (uso e ocupação do solo; ocorrência de contaminantes), bem como muitas variáveis interespecíficas (sexo; dieta; saúde; status reprodutivo). Embora exista a atenção para inúmeras variáveis ambientais, os dados histológicos (Iorg) nesse estudo, também corroborados pelos resultados mutagênicos (MN), foram eficientes no contexto de apontar que as bacias que compõem os grupos MBRa e MPYa, embora sejam categorizadas como bacias de baixo impacto, apresentam indicativos de impactos diferentes, e tais impactos podem estar associados a quantidade e a concentração de micropoluentes nesses ambientes.

Finalmente, aos retomarmos o delineamento proposto nesse estudo, quanto à divisão das microbacias em 03 grupos categóricos de impacto (a; b; c), associando-o ao perfil de dano hepático (Iorg), observa-se que os peixes coletados nas microbacias do Paraguai apresentaram respostas alinhadas aos tratamentos propostos, ou seja, com índices de menor valor para as amostras coletadas no grupo de menor impacto e os maiores valores nas microbacias de maior impacto, confirmando também os achados de compostos micropoluentes que seguiram esta mesma variação. No entanto, no Brasil o perfil de dano hepático demonstrou comportamento distinto aos grupos (a, b, c), pois os maiores valores ocorreram inesperadamente nos peixes coletados nas microbacias de baixo impacto.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos demonstram a existência de alterações histopatológicas em todas as amostras analisadas e indicam que o fígado está respondendo a algum “agente estressor” presente na área de estudo e que diferenças significativas destas respostas biológicas foram mais evidentes nas microbacias de menor impacto. Levando em

consideração as análises qualitativas das amostras de água das microbacias, somadas ao fato de que estão em regiões com uso agrícola do solo, os resultados obtidos até o momento indicam que pode haver relação entre esses dois aspectos na ocorrência de alterações histológicas, uma vez que essa relação já tem sido amplamente demonstrada em outros estudos. Não obstante, como tais resultados não podem ser associados exclusivamente a um único composto micropolvente, tal relação poderá ser melhor entendida com a quantificação dos micropoluentes nesses locais de estudo.

Para auxiliar na compreensão dos efeitos de micropoluentes sobre os biomarcadores histológicos, é importante continuar os ensaios e análises em outros períodos ao longo do ano, baseados no calendário agrícola (vazio sanitário e safrinha) para verificar se a sazonalidade na aplicação de agrotóxicos tem relação com as respostas encontradas. Desse modo, se supõe que os danos histológicos se agravam conforme o aumento da concentração dos contaminantes, seriam necessárias análises temporais para confirmar tal interferência.

Outra análise importante para complementar a compreensão de um cenário complexo em que diferentes características (físicas, químicas e biológicas) influenciam o ecossistema/ambiente, seria associar mais alguns aspectos da paisagem, especificamente nas microbacias de baixo impacto, como a ocorrência de mata ripária por exemplo, verificando assim se poderiam ser fatores adicionais à maior exposição dos animais e interferências antrópicas nestes locais.

Portanto, este conjunto de diretrizes e análises adicionais sugeridas, em relação à quantificação de micropoluentes, sazonalidade dos ensaios e características da paisagem nas microbacias de baixo impacto, poderiam contribuir para um melhor entendimento dos efeitos biológicos observados nestes locais.

7. REFERÊNCIAS

- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. - **Melano-macrophage centres and their role in fish pathology**. Journal of Fish Diseases **26**: p.499-509, 2003.
- AGOSTINHO, A. A.; HAAN, N. S.; VAZZOLER, A. E. M. – **A planície de inundação do alto Rio Paraná: aspectos, físicos, biológicos e sócio-econômicos**. EDUEM, Maringá, 1997.
- AGOSTINHO, A. A.; OKADA, E. K.; GREGORIS, J. **A pesca no reservatório de Itaipu: aspectos sociais e impactantes do represamento**. In: R. Henry (org.), Ecologia de Reservas: Estrutura, Funções, Aspectos Sociais, FAPESP / FUNBIBIO, Botucatu, p. 281-319, 1999.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S.; GOMES, A. L. - **Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters**. Conservation Biology, v.19, n° 3, p. 646–652, jun. 2005.
- ALBINATI - A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; DE LIRA, A.D.; SANTOS, G.B.; VIDAL, L.V.O. - **Histological biomarkers - chronic toxicity for roundup in piauçu (*Leporinus macrocephalus*)** - Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.61 n° 3 Belo Horizonte June 2009.
- ALMEIDA, J. S.; MELETTI, P.C.; MARTINEZ, P.C. - **Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus***. Comp. Biochem. Physiol. v.140, p. 356–363, 2005.
- ANNABI, A.; MESSAOUDI, L.; KEKENI, A.; SAID, KH. - **Cadmium accumulation and histological lesion in mosquitofish (*Gambusia affinis*) tissues following acute and chronic exposure**. Int. J. Environ. Res., 5(3):745-756, 2011.
- ANDRÉA, M.M. **Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/index.htm. Acesso em: 19/4/2018.
- ANTUNES, A.M. **Avaliação da exposição aguda e sub-letal ao Glifosato (N-fosfometilglicina) e ao AMPA (ácido amino-metil-fosfônico) em brânquias e fígado de *Poecilia reticulata* com o emprego de biomarcadores moleculares e**

morfológicos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Mestrado: Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Goiás, 2013.

AZEVEDO, A. F.; CHASIN, A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos: RiMa, p.277-280, 2004.

BALLER, L. – **Caracterização dos perfis longitudinais dos rios nas bacias hidrográficas do Paraná 3 (Brasil) e Alto Paraná (Paraguai).** Dissertação de Mestrado – UNIOESTE, 2014.

BALLESTEROS, M.L.; BIANCHI, G.E.; CARRANZA, M.; BISTONI, M.D.L.A.; - **Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes).** J Environ Sci Heal B Pestic Food Contam Agric Wastes, 42: p.351–357, 2007.

BARJA-FERNADEZ, S.; MÍGUEZ, J. M. ÁLVAREZ-OTERO, R. - **Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenylether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*).** Ecotoxicology and environmental safety. Ecotoxicology and Environmental Safety. 95: p. 60-68, 2013.

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, n.22, p. 22-34, 1999.

BRAGA, B. et al. **Introdução a engenharia ambiental: o desafio do desenvolvimento sustentável.** 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRASILEIRO, G. F – **Bogliolo - patologia.** 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012.

BUSQUETS, R.; IVANOW, A.; MBUNDI, L.; HORBERG, S.; KOZYCHENKO, O.P.; CRAGG, P.J.; WHITBY, R.; MIKHALOVSKY S.V.; TENNINSON, SR.; JUNGVID, H.; CUNDY, A.B. - **Carbon-cryogel hierarchical composites as effective and scalable filters for removal of trace organic pollutants from water.** Journal of Environmental Management – Elsevier. v. 182: p.141 – 148, 2016.

CALLISTO, M; MORENO, P. O; MACEDO, D.R.- **Biomonitoramento e pressões da urbanização: Uma abordagem integrada entre Ecologia e Geografia na bacia do rio das Velhas.** Revista Espinhaço - UFVJM, p. 2-12, 2019.

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

CARNEIRO FF, PIGNATI W, RIGGOTO RM, AUGUSTO LGS, RIZOLA A MULLER NM, ALEXANDRE VP, FRIEDRICH K, MELLO MSC, editores. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro: ABRASCO, 2015. p. 628. Disponível em: https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf. Acesso em: dez., 2019.

CECCON, J.P. **Indicadores biológicos para avaliação de riachos Neotropicais: protocolo de avaliação rápida e biomarcadores em *Astyanax* spp.** Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Doutorado em Biologia Comparada do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá, p.15, 2016.

COLIN, N.; PORTE, C.; FERNANDES, D.; BARATA, C.; PADRÓS, F.; CARRASÓN, M.; MONROY, M.; CANO-ROCABAYERA, O.; SOSTOA, A.; PIÑA, B.; MACEDA-VEIGA, A. - **Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers.** *Science of the Total Environment*.540:307-323, 2016.

COMITE DA BACIA BP 3, **Plano Nacional da Bacia Hidrográfica do Paraná 3**, 2014. Disponível em: http://www.aguasparana.pr.gov.br/arquivos/File/Parana_3/plano_de_bacia. Acesso em: set. 2019.

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

DELLA FLORA, Alexandre - **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de atrazina e seus principais produtos de transformação nas águas superficiais da bacia hidrográfica do paraná 3** - Dissertação Mestrado – UFRGS – 2018.

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 Totoal Environment*. 699: 248-257, 2019.

DE MELO, G.C.; FANTA, E.; RUDNICKI, C.A.M.; CARDOSO W.; CLETO, F.; WERNECK, P. - **Efeitos subletais do organofosforado folidol 600 no fígado do peixe de água doce jundiá, *Rhamdia quelen***. XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, resumo nº1220, Brasília, 2004.

FAN, F.M.; MESQUITA, M.O.; SANTOS, V.C.F.; LUCAS, E.O.; ZANELA, R.; PRESTES, O.D.; BANDEIRA, N.M.G. - **Resíduos de agrotóxicos em água e solo de município em região produtora de fumo no Rio Grande do Sul**. Saúde coletiva, desenvolvimento e (in) sustentabilidades no rural. p. 89-108, 2018.

FERNANDEZ, L.; BECHARA, J. A. - **An assessment of fish communities along a piedmont river receiving organic pollution (Aconquija Mountains, Argentina)**. Acta Biológica Colombiana, 15(2), p.79-100, 2010.

FERNANDES A, FERREIRA-CARDOSO JV, GARCIA-SANTOS, S.; CARROLA, MATOS, P.J.S.; FONTOÍNHAS-FERNANDEZ, A. - **Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper**. Pesqui Vet Bras 27: p.103–109, 2007.

FONSECA, C.G.M. **Remoção de micropoluentes de interesse emergente em matriz aquosa por adsorção em carvão ativado em pó e superfino**. Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Unicamp. 2019.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of Fish Histology**, Enfield, NH: Science Publishers, 224 p., 2009.

GERNHÖFER. M.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R. - **Ultrastructural biomarkers as tool to characterize the health status of fish in contaminated streams**. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery. 8: 241–260, 2001.

GOROSTIAGA, O.L.; ERICO, E.; LIAMAS, P.; MOLINAS, A.; FRANCO, E.; GARCIA, S.; RIOS, S. - **Mapa de reconocimiento de suelos de la region oriental do PY – Projeto de Racionalización del Uso de la Tierra**, 1995.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. – **Peixes da planície de inundação do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes**. Editora UEM, 2007.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 392p., 2005.

HADDAD, C.; RIBAS, D. S.; PEREIRA, G. A.; SILVA, R. J. M. - **Agrotóxicos no Brasil**. Jornal Eletrônico Faculdade Vianna Júnior, v. 11, n. 1, p. 19-19, 2019.

HAAS, P.; HOEHNE, L.; KUHN, D. **Revisão: avaliação dos efeitos do glifosato no ecossistema agrícola e sua toxicidade para a saúde humana**. Revista Destaques Acadêmicos, v. 10, n° 4, 2018.

HINTON, D.E.; HUGGETT, R. J.; KIMELI, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L.- **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 155-208, 1992.

HINTON, D. E.; LAUREN, D. J. - **Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes potential bio-markers of exposure**. In: McCarthy, J. F. Shugart, L. R. (eds.) Biomarkers of environmental contamination, 1990.

IBAMA. **Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins. Histórico de vendas – Boletim 2016 – Os 10 ingredientes ativos mais vendidos**. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=54. Acesso em dez.2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins – histórico de vendas de 2000 a 2012**. Brasília, DF: IBAMA; MMA. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/servicosonline/index.php/difusao-de-conhecimento/relatorio-de-agrotoxicos/124-agrotoxicos-relatorio--semestral>. Acesso em: fev.2020.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ – **Zoneamento Agrícola**. Disponível em: www.iapar.br/pagina-1044.html. Acesso em: ago. 2020.

ITAIPU BINACIONAL – **Base de dados da Bacia do Paraná PY**. Marr.ce, 2019, Fonte da base de dados, disponível em: <https://www.catastro.gov.py/municipios>. Acesso em: dez. 2019.

ITAIPU BINACIONAL - **Diario Itaipu Electrónico: ITAIPU realiza monitoreo de peces en el lago Ypacaraí** (2017). Disponível em: https://die.itaipu.gov.py/index.php?secao=noticias_itaipu&q=pt/node/26687&conteudo=26687. Acesso em: set. 2020.

JAPENGA, J.; KOOPMANS, G.F.; MALM, O.; VIEIRA, E. **Organic micropollutants on river sediments from Rio de Janeiro State**, Cad. Saúde Pública vol.18 no.2 Rio de Janeiro, p. 477-478, 2002.

JORGENSEN, S. E. **Handbook of ecological models used in ecosystem and environmental management**. Demark: Copenhagen University. 2011.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Guanabara Koogan S.A., p. 324-334, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8 ed. Guanabara Koogan S.A., p. 2-5, 1995.

LEAL, M. E.; BREEM, C. Q.; SCHULZ, U.H.; **Lista da ictiocenose da bacia Rio dos Sinos, Sul do Brasil**. Inst. Pesca, São Paulo: 35.2: 307-017, 2009.

LIMA, C.S; GRAZZIOTTI, I.S; SILVA, L.M.V. **Uso de bioindicadores na avaliação da qualidade da água do rio Araraquara no Distrito de Guaraná, Aracruz-ES**. *Revista Ifes Ciência*, v. 4, n° 2, 2018.

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. - **Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment**. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, out./dez. 2010

LOUREIRO, M. – *Hepta pterus mustelinus*. Disponível em: https://www.fishbase.se/Summary/SpeciesSummary.php?id=47802&lang=portuguese_p_o. Acesso em: ago.2019.

MACEDA-VEIGA, A.; MONROY, M.; NAVARRO, E.; VISCOR, G.; SOSTOA, A. **Metal concentrations and pathological responses of wild native fish exposed to sewage discharge in a Mediterranean river**. *Science of the Total Environment* 449. P.9–19, 2013.

MAGALHAES, D.P.; FILHO, A.S.F.; - **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. *Oecol. Bras.* v.12. n° 3, p. 355-381, 2008.

MARCHAND, M.J.; VAN DYK, J.C.; PIETERSE, G.M.; BARNHOOM, E.J.; BORNMAN, M.S. - **Histopathological alterations in the liver of the sharptooth catfish *clarias gariepinus* from polluted aquatic systems in south africa**. *Environ Toxicol*: p.133-147, 2009.

MARCON, B.; SEVANAYAGAM, M.; CENGIZ, E. UNLU, E. - **Histopathological changes in the gill and liver tissues of freshwater fish, *cirrhinus mrigala* exposed to dichlorvos**. *Brazilina Archives of Biology and Tehnology na International Journal*, v..52, 5: 1291-1296, 2009.

MCHUGH, K.J.; SMIT, N.J.; VUREN, J.H.H.; VAN DYK, J.C.; BERVOETS, L.; COVACI, A.; WEPENER, V.- **A histology-based fish health assessment of the tigerfish, *Hydrocynus vittatus* from a DDT-affected área**. *Physics and Chemistry of the Earth*, 36: 895-904, 2011.

MELA, M - **Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)**. *ESLSEVIER – Ecotoxicologia e Segurança Ambiental*, 93 – p.13-21, 2013.

MENDONÇA, C.F.R, **Determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais da Bacia do Paraná 3**. Dissertação de Mestrado apresentado ao curso de Pós-graduação em Química do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, p.53; p.57, 2018.

MORAES, R. F. – **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, políticas de regulação e prevenção da regulatória.** / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - Brasília: Rio de Janeiro: Ipea, 2019.
http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf. Acesso em: junho de 2019.

MUMFORD S.; HEIDEL, J.; SMITH, C.; MORRISON, J; MACCONNELL, B.; BLAZER, V. **Fish Histology and Histopathology. Shepherdstown, West Virginia** – United States of America, National Conservation Training Center, 357 p., 2007.

NORMANN, C.A.B.M. **Práticas em biologia celular**, 1 ed. Editora Universitária Metodista IPA, p. 205 – 208, 2008.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia.** 3 ed. São Paulo: Atheneu, p.135, 2008.

OSTRENSKY, A. - **Avaliação dos efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais e sobre o zooplâncton marinho.** Universidade Federal do Paraná, Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais. Curitiba, jun. 2004. Disponível em: http://files.anp.gov.br/round9/arquivos_r9/guias_R9/sismica_R9/Bibliografia/GIA-UFPR%202004%20-%20Relat%C3%B3rio%20Impacto%20em%20Peixes.pdf. Acesso em: maio.2019.

PEREIRA, B.F. **Análise dos efeitos da exposição a ambientes poluídos na morfologia e no envelhecimento precoce, de brânquias e fígado em peixes.** Dissertação de Mestrado apresentado ao curso de Pós-graduação Doutorado em Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Biociências da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Rio Claro – SP p. 31, 2014.

PERES, F.J.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G.S. – **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema.** Cap 1. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/cap_01_veneno_ou_remedio.pdf

PIGNATI W, PEREIRA ON, CÂNDIDO SAM. **Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros.** Ciênc. Saúde Colet.19(12):4669-4678, 2014.

POLIZELI, M.L.T.M. **Manual prático de biologia celular**, 2ª ed. Holos Editora, p. 42 – 46. 2008.

RABITTO, I. S.; ASSIS, C.; COSTA, J. R.; PELLETIER, E. - **Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings.** Ecotoxicology and Environmental Safety. 60: 147-156, 2005.

RAUTENBERG, G.E.; AMÉ, M.V.; MONFERRÁN, 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 Suquia River.** Ecological Indicators 48: 706–720, 2015.

OLIVEIRA-RIBEIRO C.; VOLAIRE. Y; SANCHEZ-CHARDE, A.; ROCHE, H. - **Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France.** *Aquatic Toxicology*:74(1):53-69, 2005.

RIBEIRO, L.G. **Qualidade e ecotoxicidade da água da Bacia Hidrográfica do rio São José dos Dourados-SP.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Rede Nacional em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos, por meio da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2018.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI-DARIO, F. D.; MINCARONE, M.M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. - **Fish biodiversity and conservation in South America.** *Journal of Fish Biology*. n° 89, p. 12–47, 2016.

RICHARDSON, N.; GORDON, A.K.; MULLER, W. J.; PLETSCHEKE, B.L.; WHITFIELD, A.K. - **The use of liver histopathology, lipid peroxidation and acetylcholinesterase assays as biomarkers of contaminant-induced stress in the Cape stumpnose, *Rhabdosargus holubi* (Teleostei: Sparidae), from selected South African estuaries.** *Water AS*. v.36, n° 4, p.409, July 2010. Disponível em: <http://www.wrc.org.za>.

ROBBINS, S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHEL, R. N. – **Robbins - Patologia básica.** 8ª ed: Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ROBBINS, S.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO. – **Robbins & Cotran - Patologia: bases patológicas das doenças.** 8ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ROCHA, M.L.C.F. – **Indicadores e biomarcadores de contaminação ambiental na ictiofauna da baía de Santos e do Canal de Bertiooga, São Paulo.** – Tese de Doutorado apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo., 2009.

RODRIGUES, L.B. - **Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos.** Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás. p.32, 2016.

SARAIVA, A.; COSTA, J.; SERRÃO, J.; CRUZ, C.; EIRA, J.C. - **A histology-based fish health assessment of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax* L.)** – *J. Aquaculture*, v.448, p.375-388, 2015.

SCHWARZENBACH, R. P.; ESCHER, B. I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T.B.; JOHNSON, C. A.; GUNTEN, U. V.; WEHRLI, B. - **The challenge of micropollutants in aquatic systems.** *FRESH WATER RESOURCE*, v. 313, p. 1072 – 1077, aug, 2006

SIAGRO (2018) - SEAB, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná – **Plano de plano de vigilância e atenção à saúde de populações expostas aos agrotóxicos do estado do paraná 2017 a 2019**, Disponível em:

http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/PlanoAgrotoxic30_05_18.pdf. Acesso em: dez. 2019.

SIAGRO. Agencia de Defesa Agropecuaria do Parana - ADAPAR, 2018.
Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/>>

SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática**. p.25-27. Londrina – PR, 2004.

SILVA, J.A; ANDRADE, D.P., COUTINHO, C.B; ANDRADE, D.C - **Influência dos processos antropogênicos na qualidade da água e na estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos no córrego Pedra Branca, Alfenas (MG)**. Ciência ET Praxis. v. 11, n. 21, p. 121-128, 2019.

SISINO, C.L.S.; FILHO, E. C.O., **Princípios da toxicologia ambiental: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciências, p.23., 2013.

STAM, C.; Rasanen, K.; BURDON, F.J.; ALTERMATT, F.; JOKELA, J.; JOSS, A; ACKERMANN, M.; EGGEN, R.I.L. - **Unravelling the Impacts of Micropollutants in Aquatic Ecosystems: Interdisciplinary Studies at the Interface of Large-Scale Ecology**. Advances in Ecological Research, v. 55, p. 183 – 216, 2016.

STENTIFORD, G.D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S.W. **Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants**. Mar: Environ. Res. 55.2, p.17 – 159, 2003.

TAKASHIMA, F. HIBIYA, T. **An atlas of fish histology. Normal and pathological features**. Tokyo: Kodansha: Gustav Fischer Verlag, 1995.

THOMSON, R. G. - **Patologia Geral Veterinária**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A, 1983.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G., **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**, 2003.

TORRES, A. G.; REYES, R. B. – **Heptapeturs mustelinus (Valenciennes, 1835)**.

Disponível em:

https://www.fishbase.se/Summary/SpeciesSummary.php?id=47802&lang=portuguese_p
o. Acesso em: ago.2019.

TRONCOSO, I.C., CAZENAVE, J., BACHETTA, C.; BISTONI, M.A.

- **Histopathological changes in the gills and liver of Prochilodus lineatus from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina)**. Fish Physiol Biochem **38**, 693–702, 2012.

VAN RIJN JA, REINA RD. **Distribution of leukocytes as indicators of stress in the Australian swellshark *Cephaloscyllium laticeps***. *Fish Shellfish Immunol*, 29: p. 534 – 538, 2010.

VALON, M.; VALBONA, A.; SULA, E.; FAHRI, G. DHURATA, K; FATMIR, C. **Histopathologic Biomarker of Fish Liver as Good Bioindicator of Water Pollution in Sitnica River, Kosovo**. *Global Journal of Science Frontier, Research Agriculture and Veterinary*.v. 13, p. 40-44, 2013.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. - **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review**. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149., 2003

VEIRA, C. E. D.; COSTA, P.G.; CALDAS, S. S.; TESSER, M. E.; RISSO, W. E.; SCARRONE, A. L. V.; PRIMEL, E. G.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C.B. R. - **An integrated approach in subtropical agro- ecosystems: Active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish**. *Science of the Total Environment*, 666: p. 508–524, 2019.

VREYS, N.; AMÉ, M. V.; FILIPPI, I.; CASENAVE, 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.*, 76(3):453-468, 2019.

WOLF, J. C.; BAUMGARTNER, W. A.; BLAZER, V.S.; CAMUS, A. C.; ENGELHARDT, J. A.; FOURNIE, J.W.; FRASCA, S. J.; GROMAN, D. B.; KENT, M.L.; KHOO, L.H.; LAW, J. M.; LOMBARDINI, E.D.; RUEHL-FEHLERT, C.; SEGNER, H. E.; SMITH, S.A.; SPITSBERGEN, J. M.; WEBER, K.; WOLFE, M.J. – **Nonlesion, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers and readers**. *Toxicologic Pathology*, XX: 1-29, 2014

YANCHEVA. V.; VELCHEVA, I.; STOYANOVA, S.; GEOGIEVA, E.- **Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review**. *APPLIED ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL RESEARCH* 14(1): p. 47-75, 2016.

ZAGATOO, P. S.; BERTOLETII, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2 ed. São Carlos: RiMa, p. 117, 2008.

ZENI, T. O.; VICENTRE, A.L.; CASTILHO-VESTPHAL, G. G.; HORODESKY, A.; MONTANHINI, R.; OSTRENSKY, A. **Effects of iodized salt on the histopathology**

of the gills and liver in *Rhamdia quelen* and *Metynnis maculatus*. Aquaculture Research, p. 1-11, 2016.

ZENI, T. - **O uso da histopatologia por microscopia de luz em estudos com peixes dulcícolas em condições ambientais controladas.** Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia da Universidade Federal do Paraná, 2016.

ANEXO 1 – Microbacias Estudadas na Área de Entorno do Reservatório da Itaipu (Brasil e Paraguai)

Tabela 11 -Microbacias brasileiras que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional.

MICROBACIA	IDENTIFICAÇÃO	NOME	COORDENADAS	ÁREA NÃO AGRÍCOLA (%)	ÁREA AGRÍCOLA (%)
MBRa	BR-04 A	Córrego Três Ranchos	-54.0369	76,99	23,01
			-24.7894		
	BR-06 A	Córrego Esperança	-54.0861	80,83	19,17
			-24.9236		
	BR-09 A	Rio Branco	-54.0861	94,81	5,19
-25.1304					
BR-10 A	Rio Feijão Verde	-54.0619	72,29	27,71	
		-25.1426			
BR -11 A	Córrego Cristalino	-54.0660	81,49	18,51	
		-25.0547			
MBRb	BR-01 B	Córrego Ajuricaba	-54.1398	41,84	58,16
			-24.5994		
	BR-05 B	Córrego Pingo de Ouro	-54.0543	59,15	40,85
-24.8746					
BR-07 B	Rio Morenã	-54.2204	65,82	34,18	
		-24.9755			

	BR-15 B	Rio Laranjita	-54.1837	31,42	68,58
			-25.2550		
	BR- 17 B	Córrego Bonito	-54.3758	20,38	79,62
			-25.4335		
MBRc	BR-03	Córrego Belmonte	-54.2077	23,91	76,09
			-24.4667		
	BR-08 C	Rio São João	-54.2565	32,72	67,28
			-25.1443		
	BR-12 C	Rio Xaxim	-53.9482	27,57	72,43
			-25.1259		

Tabela 11 - MBR– microbacias do Brasil. **a-** bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes;

b- bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **c-**bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes

Tabela 12 - Microbacias paraguaias que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional

MICROBACIA	IDENTIFICAÇÃO	NOME	COORDENADAS	ÁREA NÃO AGRÍCOLA (%)	ÁREA AGRÍCOLA (%)
MPYa	PY -08 A	Arroyo Barreo Pochy	55.0505174444 24.8150888333	53,47	46,53
	PY-15 A	(sem nome desagua no Itabã)	54.69110 25.04044	77,03	22,97
	PY- 16 A	(sem nome desagua em Limoy)	54.48239 24.75131	38,05	61,95
	PY 17 A	(sem nome, proximo ao reservatório)	54.55342 25.02367	39.76	60.25
MPYb	PY – 10 B	Arroyo Carumbey	54.9321229167 24.8477155	13,45	86,55
	PY – 06 B	Afluente do Arroyo Corumbey	54.97987 24.79551	18,1	81,9
	PY – 02 B	Arroyo Lopez - Cue	54.75537 25.13982	18,68	81,32
	PY – 03 B	Arroyo Itabo - Mi	54.72856 25.02264	25,47	74,53
MPYc	PY- 04 C	(sem nome, desagua Itabã)	54.73397	18,9	81,1

25.00123

PY- 05 C	Arroyo Itabo Guazu	54.90077	27,67	72,33
		25.01390		
PY- 11 C	Afluente do Arroyo Payagua-y	54.9670632222	15,25	84,75
		24.8817506944		
PY- 07 C	Arroyo Gasory	54.91500	25,74	74,26
		24.56200		

Tabela 12 - MPY– microbacias do Paraguai. **a-** bacias não agrícolas com baixa contaminação de micropoluentes;

b- bacias agrícolas com média contaminação de micropoluentes; **c-**bacias agrícolas com alta contaminação de micropoluentes