Carlos Eduardo Tolussi

**Influência antrópica no ambiente aquático sobre os
processos fisiológicos associados à maturação oocitária em
peixes teleósteos**

**Anthropic influence of aquatic environment in the
physiological processes associated with oocyte maturation in
teleost fish**

São Paulo
2016

Carlos Eduardo Tolussi

**Influência antrópica no ambiente aquático sobre os
processos fisiológicos associados à maturação oocitária em
peixes teleósteos**

**Anthropic influence of aquatic environment in the
physiological processes associated with oocyte maturation in
teleost fish**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências na
área de Fisiologia Geral.

Esta é uma versão corrigida e o
exemplar original se encontra na
biblioteca do Instituto de
Biociências da USP

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica

Tolussi, Carlos Eduardo

Influência da ação antrópica do ambiente aquático sobre os processos fisiológicos associados à maturação oocitária em peixes teleósteos/ Carlos Eduardo Tolussi; Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton – São Paulo, 2016.

74 p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Vitelogenina; 2.Reprodução; 3. Ecotoxicologia; 4. Peixes; 5. Fisiologia.
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton
Universidade de São Paulo – Instituto de Biociências

Dedico este Trabalho:

A minha mãe Adelina, ao meu pai Francisco e para minha amada esposa Aline, por todo o incentivo que me deram nessa jornada...Obrigado!

Agradecimentos

Primeiramente eu gostaria de agradecer a minha orientadora, prof. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton, por ter me dado a oportunidade de ingressar nessa maravilhosa área científica e também por todo o auxílio, orientação e compreensão, ao longo da minha trajetória que se iniciou em Mogi das Cruzes, passou pelo mestrado e culminou neste trabalho. Quero agradecer também a confiança depositada em mim em alguns momentos “críticos” do experimento. Por estes e outros motivos eu gostaria de expressar minha gratidão e admiração por essa grande profissional na qual me espelho e me orgulho de ser orientado.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou este trabalho com uma bolsa de doutorado (2011/15453-5) e proporcionou que eu realizasse diversas outras atividades como a Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) processo 2014/01866-4, além do auxílio de projeto regular (2012/50371-2).

Aos técnicos, funcionários, professores e amigos do Departamento de Fisiologia da USP pela colaboração, principalmente aos professores Dr. Carlos Arturo Navas Iannini, o professor Dr. Fernando Ribeiro Gomes pela colaboração e à professora Dra. Silvia Cristina Ribeiro de Souza, pela colaboração e ajuda de seu laboratório para análise de algumas amostras, além da Dra. Lilian Cristina Silveira que me auxiliou muito neste processo. Aos professores Dra. Anupama Kumar e o pós-doutorando Dr. Peter Bain do CSIRO onde desenvolvi os trabalhos com biologia molecular, obrigado pela oportunidade. À professora e amiga Dra. Fabiana Lo Nostro por me dar o prazer de ser colaboradora deste trabalho e pela amizade.

Aos meus eternos companheiros do LAMEROA – Aline, Cristiéle (hoje professora da UNESP de Ilha Solteira), Tiago (hoje professor da Universidade Federal do Amapá), Amanda, Jaboti, Paulo, Jajá (hoje pesquisador na FIPERJ-RJ), Bruno, Renato, Mariana, Raisal, Bianca, Gabriela, Thiago Silva e Juliana por me ajudarem a evoluir na minha profissão e como pessoa. Obrigado gente! Eu admiro e gosto muito de vocês! A galera de Mogi das Cruzes, Alê, Cristine, Débora, Tiago, Bruna Marcus, Juliane e Gabriel (ajuda em algumas análises) e Roberta pelas conversas e tudo mais.

Gostaria de agradecer especialmente aos meus pais Maria Adelina de Oliveira Tolussi e Francisco Carlos Tolussi, e minha irmã Renata Tolussi, por me incentivar, me educar

e por me apoiar em toda a minha vida, inclusive para a elaboração desta tese. Sem vocês eu não seria ninguém!

A minha querida e imprescindível Aline Dal'Olio Gomes, pelo incentivo, por me entender do início ao fim, pelo carinho e pelo auxílio pessoal e profissional. Eu te amo e te admiro muito, mas muito mesmo! Obrigado por estar ao meu lado!

A minha profunda gratidão a todos aqui citados, pois, eles de uma maneira, mais ou não incisiva têm uma importância na realização deste trabalho e em minha vida.

Índice Geral

Lista de Abreviações.....	i
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
1 – Introdução.....	1
1.1 - Ecotoxicologia.....	1
1.2 - Xenoestrógenos e Reprodução em Peixes.....	6
2- Objetivos.....	10
2.1 – Objetivo Geral.....	10
2.2 – Objetivos Específicos.....	10
3 – Material e Métodos.....	11
3.1- Espécie estudada.....	11
3.2 – Área de Estudo.....	12
3.3- Delineamento Experimental.....	14
3.4- Eutanásia dos animais e obtenção das amostras.....	15
3.5 - Análises de Dot blot.....	16
3.6- Concentração de 17 β -estradiol e absorbância da vitelogenina plasmática.....	16
3.7- Quantificação da Expressão Gênica de RNA por meio de RT-qPCR.....	19
3.8- Índice Gonadossomático (IGS) e Índice Hepatossomático (IHS).....	21
3.9- Análises Histológicas.....	21
3.10 - Cálculo da Fecundidade Absoluta e Relativa.....	22
3.11- <i>Weight of Evidence</i> (WoE).....	22
3.12 - Análise Estatística.....	24
4- Resultados.....	25
4.1- Análises de Água e Sedimento.....	25
4.2- Massa e Comprimento corpóreo.....	32

4.3- <i>Dot blot</i> , Concentração Plasmática de Estradiol, Absorbância da VTG e Expressão Gênica de VTG e ER.....	33
4.4- IGS e IHS.....	38
4.5- Análise histológica do ovário e Fecundidade Absoluta e Relativa.....	39
4.5- Weight-of-Evidence (WoE).....	46
5- Discussão.....	48
5.1- Análise de Sedimento e água e suas influências nos peixes.....	49
5.2 - <i>Dot blot</i> , Concentração Plasmática de Estradiol, Absorbância da VTG, Expressão Gênica de VTG e ER, e Fecundidade.....	52
5.3- IGS e IHS, Análise histológica das gônadas e reprodução do Lambari.....	56
5.4 – Análise de WoE.....	59
6- Considerações Finais.....	60
7- Referências Bibliográficas.....	62

Lista de Abreviações

17 α 20 β -DHP - 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-one

17 α OHP -17 α -hidroxiprogesterona

20 β HSD - 20 β -hidroxi-esteroide-desidrogenase

AChE - Acetilcolinesterase

AOX - Acetil-CoA oxidase

A. fasciatus- *Astyanax fasciatus*

BB - Reagente de bloqueio

BIL - Reservatório Billings

BSA - Soro de albumina bovina

CA - Concentração de adição

Ca²⁺ - Cálcio

Cd – Cádmio

Ct – Limiar do Ciclo

Clo-a - Clorofila-a

cm – Centímetro

Col – Coliformes fecais

CR – Coeficiente de Risco

Cr – Cromo

Cr III - Cromo trivalente

Cr VI - Cromo hexavalente

CT - Comprimento total

Cu – Cobre

dNTP - Desoxinucleotídeo

EC50 - *Effective concentration* que inibe biomarcadores de 50% dos indivíduos

ED50 - *Effective dose* que inibe biomarcadores de 50% dos indivíduos

EDA - Análise de Efeito Direcionado

ELISA - Elisaimunoensaio

ER - Receptor de estradiol

ERA - *Environmental risk assessment*

EROD - Etoxiresorufina O-desetilase

EUA - Estados Unidos da América

FA - Fecundidade absoluta

FR - Fecundidade relativa

FSH - Hormônio folículo estimulante

g – Gramas

GnRH - Hormônio liberador de gonadotropinas

GPx - Glutathione peroxidases

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

Hg – Mercúrio

IA - Ação independente

IGS - Índice Gonadossomático

IHS - Índice Hepatossomático

Inv/12 – Inverno de 2012

Inv/13 – Inverno de 2013

IPCC - *Intergovernmental Panel on Climate Change* ou *Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas*

LC₅₀ - *Letal Concentration* para 50% dos indivíduos

LD₅₀ - *Letal Dose* para 50% dos indivíduos

LH - Hormônio luteinizante

LOEC - *Lowest observed effects concentration*

LOEL - *Lowest observed effects level*

LOEs - Linhas de evidências

Lv - Lipovitelina

MC – Massa corpórea

MoA - Modos de Ação

MT - Metalotioneína

Na⁺ - Sódio

Ni – Níquel

Nia – Nitrato

NOEC - *No observed effects concentration*

NOEL - *No observed effects level*

Out/12 – Outono de 2012

PAS - Ácido Periódico de Schiff

Pb – Chumbo

PBS - Tampão fosfato salino

PCBs - bifenilas poli-cloradas

PN - Reservatório de Ponte Nova

Pri/2012 – Primavera de 2012

Pri/2013 – Primavera de 2013

Pv - fosvitina

RMSP - Região Metropolitana de São Paulo

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SETAC - *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*

SOD - Superóxido dismutase

TEMED - Tetrametiletilenodiamina

TIE - Avaliação e Identificação de Toxicidade

TTBS - *Tris-Buffered Saline*

USEPA - *United States Environmental Protection Agency*

Ver/12 – Verão 2012

Ver/14 – Verão 2014

VTG - Vitelogenina

VTG-R - Receptor de vitelogenina

WB - *Wash Buffer*

WoE - *Weigh-of-Evidence*

Zn – Zinco.

Resumo

A ecotoxicologia emergiu como uma necessidade de avaliar e mitigar os impactos antrópicos no ambiente natural e nas comunidades viventes no local, utilizando uma gama de experimentos em campo e em laboratório. Dentre as diversas áreas estudadas a reprodução é um dos processos que podem ter seu desempenho diminuído devido à ação antrópica, sendo assim importante seu estudo na ecotoxicologia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do ambiente impactado nos processos fisiológicos associados à maturação oocitária em fêmeas de *Astyanax fasciatus*. Fêmeas de *A. fasciatus* foram coletadas entre 2012 e 2014 e machos (como indicadores da presença de compostos estrogênicos) entre 2013 e 2014, com duas coletas a cada estação do ano em dois reservatórios, Ponte Nova (referência) e Billings (impactado). Amostras de água e sedimento foram também coletadas nos mesmos pontos para análise dos parâmetros físicos e químicos. Estes resultados foram comparados com a resolução CONAMA/357 e calculado o coeficiente de risco. Para ambos os sexos foram analisadas a expressão gênica da vitelogenina e do receptor de estradiol, a concentração plasmática de vitelogenina e estradiol. Foram também realizadas as análises de fecundidade relativa e absoluta, histologia das gônadas, assim como o cálculo dos índices gonadossomático e hepatossomático, apenas nas fêmeas. O coeficiente de risco mostrou que o reservatório Billings apresenta um alto risco para os metais e dos compostos orgânicos. Foram observados valores elevados na concentração plasmática de estradiol e expressão de vitelogenina em machos deste reservatório, na primavera de 2013, assim como foram observados valores mais elevados de fecundidade relativa e absoluta nas fêmeas, no inverno e primavera deste mesmo ano, em comparação com os animais do reservatório referência (Ponte Nova). Esses resultados sugerem que no inverno e primavera de 2013, os poluentes como os aqui analisados e outros aqui não detectados, podem ter interferido na reprodução em *A. fasciatus* do reservatório Billings. No entanto, é necessário destacar que essas alterações podem, em dado momento, prejudicar o processo de maturação oocitária, sendo então importante monitorar e realizar mais estudos de análise de risco ambiental no reservatório.

Abstract

The ecotoxicology has arisen as a need to evaluate and mitigate the anthropic impacts in wild environmental and in the local communities, using several bioassays and wild experiments. Among the several studied areas, the reproduction is a process that can have its performance reduced due to the anthropic impacts, showing the importance of studying these processes in ecotoxicology. The aim of this study was to evaluate the influence of the impaired environment in the physiological processes associated with oocyte maturation of *Astyanax fasciatus* females. *Astyanax fasciatus* females were sampled between 2012 and 2014 and males (as indicators of the presence of estrogenic compounds) from 2013 to 2014, with two samplings at each season, in two reservoirs, Ponte Nova (reference) and Billings (impacted). Sediments and water were sampled in the same sites to evaluate the chemical and physical parameters. The results of the analysis were compared with the CONAMA/357 guidelines and the hazard risk was calculated. The gene expression of vitellogenin and estradiol receptor, vitellogenin and estradiol plasma level were performed in males and females. The relative and absolute fecundity, gonad histology, gonadosomatic and hepatosomatic index were evaluated only in females. The hazard risk at Billings reservoir was high for organic compounds and metals. Estradiol levels and vitellogenin gene expression were higher in males sampled in Billings in the spring/2013, as well as the relative and absolute fecundity, that were higher in the winter and spring of the same year, when compared with the animals from the reference site (Ponte Nova). These outcomes suggest that during winter and spring of 2013 the pollutants, as analyzed in this study, as well as others that were not detected, may have interfered in the reproductive process of *A. fasciatus* at Billings reservoir. However, it is necessary to observe that these alterations might, at a given time, impair the oocyte maturation process, being important to monitor and accomplish additional studies of the environmental risk assessment at Billings reservoir.

1. Introdução

1.1 Ecotoxicologia

1.1.1 Histórico e definições

A humanidade aumentou sua intervenção na natureza, a fim de satisfazer suas necessidades e desejos crescentes, decorrentes de um modelo de civilização emergida nos dois últimos séculos, que elevou a industrialização como forma de produção e organização do trabalho. Como consequência, houve uma elevação da disponibilidade de uma grande gama de produtos químicos potencialmente tóxicos para o ecossistema. Diante disso, surgiram conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente (Zagatto e Bertoletti, 2006). Dois principais momentos em que esses conflitos surgiram merecem destaque. O primeiro ocorreu durante a década de 1940, com o uso do DDT, que apresentou bons resultados contra doenças e pragas, mas causou um declínio na população de algumas espécies de pássaros nos Estados Unidos. Este fato culminou com a publicação do livro *Primavera Silenciosa*, escrito por Rachel Carson em 1962 (Zagatto e Bertoletti, 2006), que chamou a atenção de uma grande parte da comunidade científica para o tema. Outro acontecimento importante ocorreu em 1956 no Japão, na cidade de Minamata, devido à contaminação do lago Minamata por mercúrio, cádmio e bifenilos policlorados (PCBs) que afetaram a população local. A doença de Minamata, causada por mercúrio, surgiu devido ao lançamento deste efluente por uma indústria que o usava como catalisador na fabricação de acetaldeído (Zagatto e Bertoletti, 2006). Com base nos eventos descritos aqui, além de outros, o interesse na prevenção e mitigação de questões relacionadas aos impactos ambientais tem aumentado gradativamente nestas últimas décadas, culminando com a formação de organizações científico-políticas, como o *Intergovernmental Panel on Climate Change* ou *Painel Intergovernamental Sobre Mudanças Climáticas* (IPCC) criado em 1988.

Os primeiros testes de toxicidade com despejos industriais foram realizados entre 1863 e 1917, mas só na década de 1930 os testes de toxicidade aguda foram feitos com organismos aquáticos com experimentos relacionados à causa/efeito. No entanto, somente na década de 1940 foi recomendado o uso de peixes para avaliar a toxicidade de dejetos líquidos (Rand, 1995). Nas décadas de 1950 e 1960 foram identificados diversos agentes tóxicos e fontes pontuais de poluição e, em vários países foram

estabelecidos padrões e critérios de qualidade de água, focados na potabilidade, com a finalidade de manter a qualidade dos recursos hídricos (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Durante a década de 1960 o *Water Quality Act – USA* estabeleceu os primeiros padrões de qualidade de águas para a proteção da vida aquática realizando testes de toxicidade aguda. Estes testes utilizavam organismos sensíveis e representativos do ambiente aquático e que pudessem ser cultivados em escala laboratorial. Isso culminou com o desenvolvimento de sofisticados sistemas de condução de testes de toxicidade aguda e crônica na década de 1970 (Zagatto e Bertoletti, 2006). Nesta década, pesquisadores americanos observaram que os limites dos agentes tóxicos estudados isoladamente não correspondiam à preservação da qualidade da água e manutenção da vida aquática (Hanmer e Newton, 1984), o que promoveu uma reavaliação da confiabilidade nos padrões de qualidade de água.

Na década de 1980 foram desenvolvidos ensaios de toxicidade de curta duração em diferentes estágios de vida dos animais, a fim de aumentar a eficiência e diminuir custos. Nesta década de 1990 foram desenvolvidos estudos de toxicidade *versus* levantamento das comunidades aquáticas *in loco* (Zagatto e Bertoletti, 2006). Um importante processo que marca os estudos relacionados com a natureza e magnitude de riscos para receptores ecológicos foram as análises de riscos ambientais. Um momento emblemático para o desenvolvimento desses ensaios foi a criação do primeiro documento de análise de risco desenvolvido pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) em 1975 chamado de *Quantitative Risk Assessment for Community Exposure to Vinyl Chloride* e em 1976 de outro documento denominado *Interim Procedures and Guidelines for Health Risk and Economic Impact Assessments of Suspected Carcinogens*. De maneira geral, este último documento apresentava um processo para ser seguido na análise do risco de ocorrência de câncer devido à exposição aos pesticidas, recomendando que os dados de saúde fossem analisados independentemente dos ponderamentos sobre os impactos econômicos (USEPA <http://www.epa.gov/risk/about-risk-assessment> acessado em 29/02/2016) e a partir daí muitos trabalhos realizados ao redor do mundo passaram a utilizar os guias publicados por esta agência como base para a realização de seus experimentos.

Em 1979 foi fundada a *Society of Environmental Toxicology and Chemistry* (SETAC) nos Estados Unidos (EUA), baseada na dinâmica do crescimento do número

de membros, assistências às reuniões e publicações. Hoje em dia o SETAC tem dois escritórios administrativos na cidade de Pensacola, Florida – EUA fundado em 1990 e em Bruxelas, Bélgica, estabelecido em 2003. Atualmente, o SETAC apresenta 5 filiações ao redor do mundo, sendo elas, SETAC África, Ásia/Pacífico, Europa, América do Norte e América do Sul (SETAC acessado em 29/02/2016).

Como foi mencionado, até o momento é possível estabelecer que os estudos de ecotoxicologia provenham da toxicologia em primeira instância, mais precisamente da toxicologia ambiental, relacionando os resultados observados em laboratório com uma análise ecológica observada no ambiente. Sendo assim, é necessário relacionar as duas primeiras áreas para que se obtenha uma definição de ecotoxicologia. A toxicologia de modo geral inclui o entendimento dos tipos de efeitos causados por químicos nos processos bioquímicos e fisiológicos, a sensibilidade relativa dos diferentes organismos à exposição química e a toxicidade relativa dos diferentes químicos e suas classes. Já a toxicologia ambiental tem como objetivo entender os efeitos, a sensibilidade e a toxicidade relativa destas substâncias nos organismos observados na natureza. Neste conceito, o foco destes estudos está na avaliação sobre a estrutura e função dos organismos frente aos compostos químicos, e seus testes são realizados tendencialmente em laboratório, ou seja, não há prioritariamente um objetivo ecológico (Chapman, 2002). Considerando-se que a ecologia tem como principal foco entender os princípios gerais que estruturam as comunidades naturais (Menge, 2000), o estudo da ecotoxicologia tem como necessidade a união da ecologia com a toxicologia ambiental (Baird *et al.*, 1996) (Fig.1).

Figura 1 – O desenvolvimento da ecologia, toxicologia ambiental e ecotoxicologia. Abordagem inicial que não tem sido suplementada, mas complementada por subsequentes abordagens (Chapman, 2002).

Um dos princípios dos estudos ecotoxicológicos é a escolha das ferramentas a serem analisadas. Idealmente, a seleção dos biomarcadores deve ser relativamente rápida, de custo e efetividade adequados para que muitos agentes químicos possam ser testados. Além disso, é importante a escolha de um conjunto de biomarcadores de fácil análise, que possibilite a realização de padrões e validações entre laboratórios e que reflitam o processo ou o mecanismo a ser estudado. Em resumo, as ferramentas escolhidas devem minimizar a ocorrência de falso negativo (Ankley *et al.*, 1998). Outro ponto importante é o critério de escolha das espécies, geralmente as espécies escolhidas são econômica e ecologicamente viáveis. No entanto, no último critério é necessário avaliar e estabelecer uma espécie “guarda-chuva” daquela comunidade, que deve ser amplamente disponível no ambiente, evitando um grande esforço de captura, de fácil manutenção em laboratório, além de geneticamente estáveis (Chapman, 2002).

Com base no que foi dito no parágrafo anterior são estabelecidas três definições importantes dentro da ecotoxicologia, o conceito de biomarcador, bioindicador e indicador ecológico. Biomarcador é uma resposta biológica para um químico ambiental em um nível sub-individual medido dentro de um organismo ou em um dos seus produtos (urina, fezes, pelos, etc.) que indica uma derivação do estado natural que não pode ser identificado no organismo intacto. Bioindicador é definido como a informação de um dado organismo sobre a condição do seu ambiente por meio de sua presença, ausência ou comportamento. Finalmente, indicador ecológico é uma variável do ambiente que descreve a estrutura e função do ecossistema (Van der Oost *et al.*, 2003).

Os testes realizados para os experimentos ecotoxicológicos, em laboratório, são classificados de acordo com o comprimento do experimento relativizado com a vida do indivíduo e a complexidade da comunidade biológica, havendo três tipos de estudos tóxicos em animais, os testes de toxicidade agudo, de toxicidade sub-crônico e crônico (Szynkowska e Sawlaczky, 2014). Estudos de toxicidade agudos são tipicamente testes de curto prazo (comumente 96 horas) que analisam resultados dos biomarcadores em espécies com tempo de vida curto. Os efeitos tóxicos são tipicamente reportados como LD₅₀ (*Letal Dose* para 50% dos indivíduos) para animais terrestres e LC₅₀ (*Letal Concentration* para 50% dos indivíduos) para animais aquáticos. Para testes não letais, são frequentemente utilizado ED50 e EC50 (*Effective Dose* ou *Concentration* que inibe a ação dos biomarcadores de 50% dos indivíduos) (Szynkowska e Sawlaczky, 2014).

Testes de toxicidade crônicos podem abranger um ciclo de vida inteiro do organismo (exemplo, de zigoto até a primeira idade de reprodução), no entanto, este

teste é de difícil realização devido à longa duração e ao alto custo. Considerando esta dificuldade, há três alternativas de testes, um que abrange o ciclo de vida parcial, o segundo que avalia o estágio de vida inicial, e um teste crônico de curto prazo (Szynkowska e Sawlaczky, 2014).

Ainda segundo Szynkowska e Sawlaczky (2014), o teste de ciclo de vida parcial é desenvolvido para organismos que necessitam de até 412 meses para atingir a maturação sexual. Já o teste ciclo de vida inicial, abrange desde o estágio embrionário até o juvenil. Por fim, o teste crônico de curto prazo é conduzido em um período de 4 a 7 dias. Estes testes geralmente são expressos como o nível de efeito observado mais baixo ou concentração de efeito mais baixa (LOEL e LOEC, respectivamente – da sigla em inglês *lowest observed effects level* e *lowest observed effects concentration*) e nenhum nível de efeito observado ou nenhuma concentração de efeito observada (NOEL e NOEC respectivamente – da sigla em inglês *no observed effects level* e *no observed effects concentration*). O LOEL e o LOEC são os níveis tóxicos mais baixos ou a concentração tóxica mais baixa que causa um efeito estatisticamente significativo em relação ao controle (sem presença tóxica), já o NOEL e NOEC correspondem aos níveis ou concentrações mais elevados que não cause efeito significativo em relação ao controle.

O teste de toxicidade subcrônico envolve a repetição de dosagem sobre um período estendido, mas não tão longo para constituir uma fração da expectativa de vida da espécie estudada, que normalmente varia de 30 a 90 dias e, em geral são aplicados testes de determinação de NOEL e NOEC trazendo informações sobre órgãos, bem como o potencial do agente químico ao se acumular no organismo (Szynkowska e Sawlaczky, 2014).

Mesmo com os inúmeros testes apontados acima, a complexidade do ambiente e o grande número de contaminantes químicos torna impossível a realização de testes em laboratórios integrando todas estas variáveis (Beyer *et al.*, 2014). Sendo assim, é necessário realizar uma abordagem que analisa a ecotoxicidade de diversos agentes químicos, sendo esta denominada de avaliação de risco ambiental (ERA da sigla em inglês *environmental risk assessment*). O ERA é definido como procedimentos, utilizando metodologias científicas, pelo qual o provável ou atual efeito adverso dos poluentes ou outras atividades antrópicas nos ecossistemas e seus componentes são estimados com um grau conhecido de certeza (Depledge e Fossi, 1994), geralmente

incluindo um conjunto de módulos (Fig. 2) que provém ferramentas para avaliação e gerenciamento do ambiente poluído (Beyer *et al.*, 2014).

Figura 2 – Visão conceitual dos principais componentes da estrutura *Environmental Risk Assessment* (ERA). Tais estruturas são amplamente usadas para organizar os processos de avaliação e gerenciamento da poluição química (Retirado de Beyer *et al.*, 2014).

Os atributos e definições apontados acima são muito importantes para a organização, execução e escolha da(s) espécie(s) e agentes químicos para a realização de um ou mais trabalhos ecotoxicológicos, além de darem uma sustentação que pode auxiliar na escolha do(s) local(is) e animal(is) selecionados para a realização do trabalho.

1.2 Xenoestrógenos e Reprodução em Peixes

A introdução de agentes químicos no ambiente devido à ação antrópica pode causar efeitos na saúde dos seres humanos e também das populações de animais selvagens (Vázquez *et al.*, 2009). Estes agentes químicos podem causar diversas alterações nos processos fisiológicos e bioquímicos, e para que os animais consigam manter a sua homeostase, muitas vezes é necessário um requerimento extra de energia exógena e/ou do armazenamento endógeno, como lipídios, glicogênio e proteínas (McEwen e Wingfield, 2003).

Agentes químicos que podem causar alterações nos processos fisiológicos e energéticos dos animais são conhecidos como desreguladores químicos endócrinos, que são definidos por uma gama de componentes que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios secretados naturalmente pelos organismos, e que regulam a homeostase, desenvolvimento, comportamento e reprodução tanto de animais no ambiente terrestre quanto no aquático (Nishi *et al.*, 2002). Muitos dos desreguladores químicos endócrinos podem apresentar efeitos semelhantes aos hormônios estrógenos, sendo então referidos como agentes estrogênicos (Vázquez *et al.*, 2009). Nos últimos anos, tem havido um significativo esforço para demonstrar os efeitos dos xenobióticos, que são compostos químicos estranhos ao sistema biológico, no controle fisiológico da reprodução dos animais selvagens (Vázquez *et al.*, 2009), já que eles poderiam acarretar em alterações nas vias de cascatas hormonais ou mesmo em outros processos fisiológicos envolvidos na reprodução.

Nos peixes, assim como nos demais vertebrados, o controle da reprodução ocorre primeiramente modulado pelo estímulo de sinais ambientais como o fotoperíodo, o regime de chuvas, a temperatura e as interações sociais, que são percebidos e enviados, via sinais aferentes, para vários centros cerebrais, culminando no hipotálamo. A partir daí é iniciado o controle neuroendócrino do ciclo reprodutivo, que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Yaron e Sivan, 2006). Em fêmeas, os sinais descritos acima, estimulam neurônios hipotalâmicos a sintetizar e liberar o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), que por sua vez estimula as células gonadotrópicas da hipófise a sintetizar e liberar o hormônio folículo estimulante (FSH), que via corrente sanguínea é transportado às camadas foliculares dos oócitos e, nas células da teca, converte o colesterol em testosterona. Este andrógeno é transportado às células da granulosa, nas quais é aromatizado em 17 β -estradiol pela enzima aromatase (P450), também sob influência do FSH. O 17 β -estradiol age no fígado, estimulando a síntese de vitelogenina (VTG), uma fosfoglicolipoproteína, que promove crescimento do oócito devido a sua incorporação por micropinocitose. O aumento nos níveis plasmáticos de 17 β -estradiol inibe a síntese de FSH através de uma alça de *feedback* negativo e juntamente com ação do GnRH estimulam a secreção adeno-hipofisária do hormônio luteinizante (LH) nas fases finais da maturação gonadal. O LH estimula as células da teca do folículo a produzir o 17 α -hidroxiprogesterona (17 α OHP), que é transportado às

células da granulosa e convertido a 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-one (17 α 20 β -DHP) pela enzima 20 β -hidroxi-esteroide-desidrogenase (20 β HSD). O 17 α 20 β P-DHP é o hormônio efetivo da maturação final dos oócitos e ovulação na maioria dos teleósteos (Zohar *et al.*, 2010).

Um dos processos mais importantes envolvidos na reprodução é a vitelogênese, que é definida pela incorporação das proteínas da VTG pelo oócito e seu processamento. No entanto, esse conceito deve ser estendido para incluir também a incorporação de outras moléculas como lipídeos e vitaminas (Lubzens *et al.*, 2009). A molécula determinante neste processo é a VTG, que possui um peso molecular que varia de 200–700 kDa e é produzida pelo intestino de nemátodos, corpos gordurosos nos insetos e pelo fígado nos peixes e demais vertebrados (Lim *et al.*, 2001). Esta molécula é a principal precursora das proteínas do vitelo em vertebrados e invertebrados (Finn, 2007), possuindo um papel essencial para o sucesso do desenvolvimento embrionário e do crescimento larval. Sua composição é de 79% de proteínas e 19% de lipídeos, sendo que destes lipídeos, 70% correspondem aos fosfolipídeos, que são muito importantes para a formação das membranas celulares dos animais em desenvolvimento embrionário (Jalabert, 2005).

No plasma dos teleósteos, a VTG é transportada e especificamente incorporada ao oócito por endocitose, mediada pelo receptor de vitelogenina (VTG-R) situado na membrana plasmática. Já nos oócitos, a molécula é clivada em proteínas de vitelo, sendo que na maioria dos vertebrados estas proteínas são a lipovitelina (Lv) e a fosvitina (Pv) (Davis *et al.*, 2007). Foram identificados três tipos de vitelogenina nos animais: VTG A, VTG B e VTG C. As VTG A e VTG B são seletivamente clivadas em produtos de vitelo, tendo um papel na hidratação do oócito e do embrião, além da nutrição larval, mas a VTG C ainda não tem sua função esclarecida (Davis *et al.*, 2007).

A presença de desreguladores químicos endócrinos é considerada um dos principais agentes estressores presentes em um ambiente aquático impactado, podendo resultar em diversas alterações nas respostas fisiológicas e bioquímicas dos peixes. Estas respostas incluem alterações na concentração de qualquer um hormônios mencionados acima, que estão envolvidos na reprodução, além de alterações na capacidade osmorregulatória, imunológica e metabólica, causando uma queda nos

estoques energéticos, assim como na biossíntese, utilização e eficiência energética (Schreck, 2010), como por exemplo, no processo de síntese de VTG e na vitelogênese.

Diversos trabalhos reconhecem a indução da síntese de VTG em machos expostos a diferentes xenoestrógenos, demonstrando que esta molécula é um bom biomarcador e seus resultados estão frequentemente associados com os processos reprodutivos (Caldwell *et al.*, 2012). Além disso, Miller *et al.* (2007) mencionaram que nas fêmeas, a VTG é também um bom biomarcador de efeitos na reprodução, para certas classes de desreguladores químicos endócrinos, sendo utilizada tanto em estudos toxicológicos ambientais como em trabalhos ecotoxicológicos.

As informações apresentadas até o momento permitem elaborar um método científico, que se inicia na identificação de uma problemática ambiental e a partir daí a avaliação do seu potencial deletério nos organismos, sobre diversos aspectos fisiológicos, como por exemplo, o processo reprodutivo dos peixes. Sendo assim este trabalho testou a seguinte hipótese: A poluição observada no reservatório Billings prejudica os processos fisiológicos associados à maturação oocitária do lambari-do-rabo-vermelho, *Astyanax fasciatus*.

2. Objetivos

2.1- Geral

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a influência do ambiente impactado nos processos fisiológicos associados à maturação oocitária de *A. fasciatus*.

2.2- Objetivos Específicos

1) Avaliar e identificar possíveis agentes químicos presentes na água dos reservatórios estudados que possam interferir no processo reprodutivo de *A. fasciatus*. Para isso foram analisados:

- a) Concentração de clorofila-a, fósforo e nitrogênio;
- b) Concentração de metais total;
- c) Concentração de organoclorados e fosforados;
- d) Utilização teórica de uma análise de peso de evidência *Weight-of-Evidence* (WoE) por meio de um coeficiente de risco.

2) Avaliar os processos envolvidos na síntese de vitelogenina em fêmeas e machos, utilizando-se biomarcadores como:

- a) Identificação da VTG no plasma por *Dotblot*;
- b) Concentração de estradiol plasmático;
- c) Absorbância plasmática e expressão gênica da VTG;
- d) Expressão gênica do receptor de estradiol (ER);

3) Avaliar a morfologia dos ovários e a quantidade de oócitos aptos a serem fertilizados nas fêmeas de *A. fasciatus*. Os biomarcadores utilizados para atingir estes objetivos, respectivamente foram:

- a) Análise histológica dos ovários;
- b) Fecundidade absoluta e relativa.

3. Material e Métodos

3.1- Espécie estudada

A espécie eleita para a realização deste trabalho pertence ao gênero *Astyanax* (conhecido popularmente como lambari) e à família Characidae, que engloba a maioria das espécies de peixes de água doce do Brasil, e é amplamente distribuída por toda a América Central e América do Sul (Agostinho, 1982; Barbieri *et al.*, 1982). O gênero *Astyanax* apresenta, aparentemente, pouca diferenciação morfológica, ecológica e comportamental, sugerindo um grupo em especiação recente (Gurgel, 2004). *Astyanax fasciatus* (Fig. 3) é uma espécie de pequeno porte com comprimento médio entre 10 e 20 cm possuindo grande importância como elo na cadeia alimentar devido ao seu hábito alimentar onívoro, com tendência insetívora e zooplantívora, além da sua participação como forrageiro de espécies carnívoras (Vilella *et al.*, 2002; Gurgel, 2004). *A. fasciatus*, conhecida popularmente como lambari-do-rabo-vermelho, apresenta características reprodutivas que envolvem desova do tipo total múltipla (Barbieri e Barbieri, 1988; Barbieri *et al.*, 1996; Gurgel, 2004) e realiza curtas migrações durante o período reprodutivo (Godoy, 1959; Géry, 1977). Esta espécie possui uma alta plasticidade reprodutiva, podendo apresentar desova do tipo parcelada de acordo com as características do ambiente onde vive (Silva *et al.*, 2010).

Como descrito acima, o lambari possui uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados tanto em águas limpas quanto poluídas, apresentam um tamanho pequeno e uma estratégia reprodutiva com múltiplas desovas. Todas estas características fazem com que esta espécie seja utilizada como uma espécie sentinela em diversos trabalhos relacionados aos testes toxicológicos e investigações ambientais (Schulz e Martins-Júnior, 2001; Alberto *et al.*, 2005; Carrasco-Letelier *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2011). Desta forma, considerando-se as características aqui abordadas, o lambari-do-rabo-vermelho foi escolhido como espécie modelo para a realização deste trabalho.

Figura 3: Fêmea adulta de *Astyanax fasciatus*

3.2- Área de Estudo

A área de estudo compreendeu dois importantes reservatórios da Bacia Hidrográfica do Rio Tietê, localizados na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) (Fig. 4).

Figura 4: a-b) Mapa da sub-bacia do Tietê, no Estado de São Paulo (Brasil), mostrando a localização das áreas de estudo: c) o reservatório de Ponte Nova (PN), considerado o local referência, e d) o reservatório Billings (Bil), destacando o braço Taquacetuba, considerado o local hipereutrófico. (Retirado de Gomes *et al.*, 2016).

O reservatório de Ponte Nova (Fig. 4c; 5a), localizado entre os municípios de Salesópolis e Biritiba Mirim, no Estado de São Paulo, a 35 Km da nascente do Rio Tietê (Marceniuk e Hilsdorf, 2010) possui uma área de drenagem de 320 Km² e um espelho d'água de 25,7 Km². A barragem foi construída em 1972 com o objetivo de controlar as enchentes e possibilitar condições de navegabilidade ao Rio Tietê, além de permitir a recuperação de várzeas e o abastecimento de água (Schroeder- Araújo, 1980), que ainda

é utilizado hoje como parte do Sistema Produtor Alto Tietê, abastecendo 3.3 milhões de pessoas na RMSP (SABESP, 2014). Originalmente, a região da bacia das cabeceiras do Rio Tietê era ocupada por Mata Atlântica, com predominância de Floresta Ombrófila Densa, mata ciliar e várzeas ao longo do curso d'água. Atualmente, a região encontra-se sob forte pressão ambiental devido ao intenso processo de urbanização e atividade agrícola. Contudo, essa região da bacia ainda reúne áreas de mananciais sob proteção ambiental contendo regiões parcialmente preservadas (Marceniuk e Hilsdorf, 2010). Com base nestas características, o reservatório de Ponte Nova foi considerado neste trabalho como reservatório referência.

Figura 5: Vista aérea: a) do reservatório de Ponte Nova (referência); b) do reservatório Billings; c) Braço Taquacetuba com alto grau de eutrofização em dezembro de 2012.

O reservatório Billings (Figs. 4d, 5b,c) está localizado em uma região que abrange os municípios de São Paulo, Santo André, São Bernardo do Campo, Diadema, Ribeirão Pires e Rio Grande da Serra, e foi construído em 1927 para estabelecer o nível de água do Rio das Pedras e assegurar um fluxo contínuo de água para as plantações nas cidades próximas (Mariani *et al.*, 2006). Na década de 40 seu percurso foi alterado para atuar na regulação do fluxo de água do Rio Tietê, ao qual chega via Rio Pinheiros. Além disso, é utilizado para a geração de energia elétrica e abastecimento público de água, sendo considerado o segundo maior reservatório de água da RMSP, com uma área de drenagem de 1560 Km² e um espelho d'água de 106.6 Km². O complexo Billings é

caracterizado por uma intensa ação antrópica, como lançamentos de esgotos domésticos e efluentes industriais, desmatamento, além da grande ocupação desordenada do solo. O reservatório possui sete braços, apresentando características bióticas e de poluição espacialmente diferenciadas. No presente estudo, as coletas foram realizadas no Braço Taquacetuba (Fig. 5c), região de grande importância para o abastecimento de água de São Paulo, mas já considerado em estado hipereutrófico, devido às contaminações por metais pesados e constantes florações de cianobactérias (Mariani e Pômpeo, 2008; Moschini-Carlos *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2015, 2016).

3.3- Delineamento Experimental

O trabalho foi conduzido durante os anos de 2012, 2013 e 2014 com coletas bimestrais de fêmeas adultas de lambaris, que foram iniciadas no período de janeiro até dezembro de 2012 (denominado de primeiro ano). Entre janeiro e agosto de 2013 houve uma pausa nas coletas e um reestabelecimento em setembro de 2013, seguindo até março de 2014 (chamado de segundo ano). Durante este segundo período foram coletados fêmeas e machos adultos. Todos os animais foram coletados com rede de espera. Os grupos experimentais foram organizados de acordo com as estações do ano: janeiro a março corresponde ao grupo Verão; abril a junho corresponde ao Outono; julho a setembro ao Inverno e entre outubro e dezembro a Primavera. Em cada coleta foram capturados entre 15 e 20 animais (com exceção do período de inverno, no qual foi realizada apenas uma coleta com captura de 10 animais), com um intervalo de captura entre os diferentes pontos de coleta de no máximo uma semana (Fig. 6).

Figura 6: Ilustração temporal dos períodos em que foram realizadas as coletas de fêmeas e machos durante o primeiro e o segundo ano.

Durante as análises dos resultados do primeiro ano foi observada a necessidade de coletar os machos, com a finalidade de avaliar com mais precisão se a condição

ambiental que vinha sendo observada na Billings poderia influenciar na síntese da vitelogenina, efeito que seria mais evidente nos machos.

Em ambos os pontos de captura foram coletadas, a cada estação do ano, amostras de água e sedimento de ambos os reservatórios (Fig. 7) para a quantificação da concentração das seguintes variáveis ambientais: cádmio, chumbo, cobre, cromo, mercúrio, níquel e zinco totais (água superficial e sedimento) e organoclorados e organofosforados totais (água superficial), além de clorofila-a, coliformes fecais, fósforo solúvel, nitrato e nitrito (água superficial). As análises foram realizadas pela empresa Nova ambi® e os resultados encontrados foram comparados com os valores de referência sugeridos pela resolução CONAMA/357. Os valores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH foram obtidos por meio do relatório da CETESB (2013 e 2015).

Figura 7 – Coleta de água no reservatório Billings.

3.4 - Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

Após a coleta os animais foram anestesiados com 1g de benzocaína diluída em etanol e misturada à água em uma diluição de 1:10. Uma amostra de sangue foi coletada por punção da vasculatura caudal, utilizando-se seringas heparinizadas. O sangue total foi centrifugado e as amostras de plasma obtidas. O fígado e as gônadas foram retirados para a realização das análises, além dos cálculos dos índices hepato e gonadossomático (Fig. 8). Uma porção do ovário foi fixada em Bouin acético e solução de Gilson para as análises histológicas e de fecundidade, respectivamente. O plasma e o fígado foram colocados em gelo seco no local de coleta, sendo posteriormente transportados ao laboratório e armazenados no freezer -80°C.

Figura 8– Coleta de tecidos do *A. fasciatus*, lambari-do-rabo-vermelho. GO (gônadas), FG (fígado).

3.5 - Análises de *Dot blot*

Uma análise qualitativa da presença de VTG no plasma de machos e fêmeas foi realizada por meio da técnica de *dot blot*. As amostras de plasma foram pipetadas em uma membrana de nitrocelulose e secas em temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TTBS (Tris-Buffered Saline with Tween 20- Sigma[®]) por 15 minutos (3x de 5 minutos) e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 5 minutos. O bloqueio inespecífico foi realizado com 3% de leite em pó desnatado adicionado de 3% de BSA e diluído em TTBS, por agitação contínua durante toda a noite. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TTBS por 2x durante 5 minutos e incubadas com três distintos tipos de anticorpos primários para VTG: 1) VTG anti-salmão (*Salmo salar*) monoclonal (Biosense[®]) com diluição de 1:1500, 2) VTG anti-carpa (*Cyprinus carpio*) monoclonal (Biosense[®]) com diluição de 1:2000 e 3) VTG anti-perca (*Lates niloticus*) policlonal desenvolvido no laboratório do Dr. Bernhard Allner, Hessische Landesanstalt für Umwelt, Alemanha com diluição de 1:2000.

Após a incubação com os diferentes anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TTBS (3x por 5 minutos) e incubados com o anticorpo secundário (anti-*rabbit*, 1:1000) (Dako Cytomation LSAB2[®] SystemHRP). A amplificação de sinal foi realizada com fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (DAKO[®]) em uma diluição de 1:3000 e incubado no escuro por 1 hora. Após esta incubação, as membranas foram reveladas com o kit NBT-BCIP. Por fim, todas as membranas foram escaneadas. Estas análises foram realizadas no *Laboratorio de Ecotoxicología Acuática*,

da *Universidad de Buenos Aires*, (Buenos Aires, Argentina), sob coordenação da Dra. Fabiana L. Lo Nostro.

3.6- Concentração de 17 β -estradiol e absorbância da vitelogenina plasmática

3.6.1. Concentração Plasmática de 17 β -estradiol

As análises da concentração plasmática de 17 β -estradiol foram realizadas utilizando-se kits de elisaimunoensaio (ELISA) da marca Cayman[®]. A leitura foi realizada em leitora de microplaca (Molecular Devices) em um comprimento de onda de 450 nm. As amostras foram diluídas 5 vezes com uma em uma concentração de 1 μ l de amostra para 5 μ l de solução tampão provida no kit.

3.6.2. - Western blot

As análises de *Western blot* foram conduzidas em amostras de plasma de fêmeas coletadas no ambiente não impactado utilizando anticorpos Anti-Vitelogenina LS-C76832 (anticorpo 1) e LS-C76835 (e anticorpo 2) (LifeSpan BioSciences[®]). O anticorpo 1 reconhece vitelogenina de carpa comum e o anticorpo 2 *killifish* e perca branca, e ambos foram testados com a finalidade de identificar qual destes anticorpos seria mais adequado para a análise da absorbância da vitelogenina plasmática pelo método de ELISA descrito acima. O controle positivo foi realizado com amostra de truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, utilizando um anticorpo da mesma espécie e o branco foi realizado com tampão de carga e tampão fosfato salino (PBS).

Antes de iniciar as análises, as amostras foram diluídas 2 vezes com tampão de carga e incubadas à 95°C por 5 minutos. Em seguida, foi preparado no tanque de corrida do gel o tampão de corrida (3,03g de Tris, 11,4g de Glicina, 1g de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e água Milli-Q qsp 1L), o tampão de transferência (3,03 g de Tris, 14,4g de Glicina, 800mL de água Milli-Q e 200mL de metanol), o gel de separação 8% de volume de 4,2mL (para 2 géis: 4,64 água Milli-Q, 2,5mL de 1,5M de Tris com pH de 8,8, 2,66mL de 30% de mix de acrilamida, 0,1mL de Dodecil Sulfato de Sódio a 10%-SDS- 0,1mL de persulfato de amônio a 10% -APS - e 0,005mL de o tetrametiletilenodiamina -TEMED), e o gel a 4% *stacking* (para 2mL: 2,08 de água

Mili-Q, 0,882 de 0,5M de Tris com pH de 6,8, 0,466 de 30% de mix de acrilamida, 0,035 de SDS a 10%, 0,035 de APS a 10% e 0,0035 de TEMED).

Para a preparação do gel foi pipetado entre os vidros 4,2mL gel 8% e 100μL de água Milli-Q até o gel se assentar. Em seguida a água foi retirada utilizando um filtro de papel e o gel *Stacking* 4% foi adicionado e inserido no tanque, que foi completado com tampão de corrida na porção mais interior. As amostras foram inseridas juntamente com os controles positivo e negativo, adicionando 100μl em cada poço. O gel correu em uma voltagem de 100 V em torno de 2 horas. Após a corrida, o gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose e banhada pelo tampão de transferência, sendo a reação interrompida pelo tampão de bloqueio (leite desnatado em pó em PBST) por 40 minutos. Posteriormente, foi preparado um anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio e a membrana foi incubada por 37°C com agitação constante (60 rpm) por 2 horas. Ao final, a membrana foi lavada com PBST 3 vezes por 15 minutos e a o anticorpo secundário (anticorpo de rato) foi diluído em tampão de bloqueio e incubado em 37°C por 30 minutos e, posteriormente lavado com PBST 3 vezes por 15 minutos. A revelação foi realizada com 600μL de Luminol e 600 μL de *Enhancer* adicionado na membrana por 2 minutos e 30 segundos. As imagens foram obtidas por meio de BIO-RAD Molecular Image – ChemicDoc™ XRS.

Após o teste foi observado que o anticorpo LS-C76832 possuía uma maior reação com o anticorpo da VTG do lambari, como é observado na figura 9.

Figura 9- *Western Blot* no plasma de fêmeas de lambari do ambiente não impactado testando os anticorpos 1 e 2. A1 – Anticorpo 1; A2 – Anticorpo 2; L – Marcador molecular padrão; RF – controle positivo utilizando *zebrafish* e Crt0 – controle negativo. * Imagem provinda da mancha do RF.

3.6.3 Quantificação de VTG no plasma (ELISA)

Estas análises foram iniciadas com a sensibilização da placa de ultra sensibilidade (Greiner Bio-one®) adicionando-se 100 µL de anticorpo primário monoclonal de carpa (LSBio®) LS-C76832 em cada poço, com *Phosphate Buffer Saline* (PBS - pH 7,4, Sigma®) em uma concentração de 1:500 e incubado *overnight* em uma temperatura de 17°C. Posteriormente, foi realizada a lavagem da placa, que consiste em lavar 3 vezes adicionando 300 µL de *Wash Buffer* (WB) (PBS com 0,05% de Tween-20 - Sigma®). Foi pipetado em cada poço 300 µL de reagente de bloqueio (BB) composto por 1% de soro de albumina bovina (BSA) (AMARESCO® -0332-25g), incubado por 1 hora em temperatura ambiente e, em seguida foi feita a lavagem da placa.

O procedimento de detecção de VTG nas amostras teve início pipetando-se 100 µL de amostra nos poços, sendo a diluição de 1:500 com BB, seguido pela incubação de 2 horas. Após este procedimento, foi adicionado o anticorpo secundário em um volume de 100 µL em uma diluição de 1:1000, diluído em BB com uma incubação de 2 horas. Posteriormente foi realizada uma lavagem na placa e adicionado 100 µL de estreptavidina (R&D Systems® -DY998) na diluição de 1:200, e a placa foi incubada por 20 minutos no escuro com posterior lavagem da mesma. A revelação foi realizada com a adição 100 µL de TBM (Thermo Fisher® -002023) e incubada por 20 minutos sem luz. Para parar a reação foi adicionado 50 µL de *STOP SOLUTION* (Thermo Fisher® - N600). A leitura foi feita em um comprimento de onda de 450nm em uma leitora de microplaca (Molecular Devices).

3.7- Quantificação da Expressão Gênica por meio de RT-qPCR

A expressão gênica hepática da vitelogenina (VTG) e do receptor de estradiol (ER) do fígado foram quantificadas pelo método de RT-qPCR. O RNA total foi isolado por meio do RNeasy® mini total RNA *isolation kit* (Qiagen®) de acordo com o protocolo do fabricante. A integridade das bandas 18s e 28s foi avaliada com o RNA 6000 nano kit (Agilent Technologies®) e posteriormente tratados com DNase usando o turbo DNA-free (Life Technologies®). Um micrograma de RNA foi usado como padrão para a conversão em cDNA por meio da transcriptase reversa utilizando o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen®).

O PCR foi utilizado para obter a sequência consenso para os *primers* de VTG e ER encontrados por meio de regiões conservadas de *Astyanax mexicanus* e espécies de Cypriniformes, sendo os seguintes *primers* obtidos: VTG-FI (ATGAGAGCTGTWGTGCTTGCC), VTG-RI (GGTGACCAGCATTGCCC), ER-F1 (GCAGTGCCACYGACAGG), ER-R1 (TTACAGGGCCTCGAAAGAGA). O protocolo de amplificação de cada reação foi de 2,5 µL de Ecotaq Buffer (10X) com Mg (Lucigen®), 18,3 µL de água, 1 µL de Solução Mix de desoxinucleotídeo (dNTP) com 10 nM para cada dNTP (BioLabs®), 1 µL de cada *primer* e 0,2 µL de Ecotaq DNA Polimerase 100U para 5 U/uL (LUCIGEN) com a programação do termociclador de 90°C (60 s) seguido de 40 ciclo de 95°C (10s), 60°C (0.30s), 72°C (60 s) e 72°C (5 min). Os produtos de PCR passaram por uma eletroforese com gel de agarose a 1%. O *primer* para o gene 18s (*housekeeping* usado como normalizador) foi desenhado por meio da sua sequência já publicada para *A. fasciatus* BMC (LBP13344 52793).

Os *primers* analisados para RT-qPCR foram VTG-F (GCCTCTGCGTTGTTGATCTT) e VTG-R (AAACTCTGACCCTGCTGGAA), ER-F (CAGGACATGTACTGTCAGC) ER-R (GGTTGGTTGCTGGACACA) e 18S-F (CCCTATCAGCTGTCGATGGT) 18S-R (TTACAGGGCCTCGAAAGAGA). Os genes foram quantificados através do Stratagene MX3000P real time PCR system onde cada reação continha 2 µL de amostra (diluição 1:10), 12,5 µL de Power SYBER Green PCR Master Mix, 8,5 µL de água e 1µL dos *primers*. A programação do termociclador foi 95°C (15 min) seguido de 40 ciclos 95°C (10s), 60°C (0.30s), 72°C (60 s), e 95°C (60 s), 55°C (0:30s), 95°C (0:30s) com 1 ciclo.

A curva padrão, construída pelos produtos de PCR de interesse, mostrou uma relação linear entre os valores de Ct (limiar do ciclo) e a concentração dos produtos de PCR com os seguintes valores para o coeficiente de correlação médio (R^2): 0.994, 0.993 e 1.00 de VTG, ER e 18S, respectivamente. A eficiência do PCR foi calculada com 111,9%, 99,8% e 95,5% para VTG, ER e 18S, respectivamente.

As análises de Western blot, VTG plasmática e expressão gênica por RT-qPCR foram realizadas no *Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology and Risk Assessment Laboratory*, no *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* (CSIRO), Adelaide, Austrália, sob coordenação da Dra. Anupama Kumar.

3.8- Índice Gonadosomático (IGS) e Índice Hepatosomático (IHS)

O IGS, obtido em porcentagem, foi calculado através da relação da massa das gônadas pela massa corpórea [$IGS = (massa \text{ das gônadas} / massa \text{ corpórea}) \times 100$] (Fig. 10B). O IHS, que também é obtido em porcentagem, foi calculado através da relação da massa do fígado pela massa corpórea [$IHS = (massa \text{ hepática} / massa \text{ corpórea}) \times 100$] (Fig. 10A).

Figura 10– Coleta de tecidos do *Astyanax fasciatus*, lambari-do-rabo-vermelho, para o cálculo dos índices hepatossomático (A) e gonadosomático (B).

3.9- Análises Histológicas

Para auxiliar na confirmação do estágio de maturação gonadal (análise histológica), os ovários foram desidratados por meio de uma exposição a concentrações crescentes de etanol, diafanizados em solução de xilol (*dimethylbenzene*) e infiltrados em Paraplast® (Erv-Plast, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda) de acordo com os procedimentos histológicos rotineiros (Behmer *et al.*, 1976). Cortes seriados com 5 µm foram realizados em micrótomo (Leica – RM/2255, equipado com lâminas descartáveis) e montados em lâminas com poli-lisina (*Poly-Lysine Solution – Sigma Diagnostics INS, St. Louis M.O. USA*) e corados com hematoxilina-eosina (Behmer *et al.*, 1976) ou *Metanil Yellow* + Ácido Periódico de Schiff (PAS) + hematoxilina férrica (Quintero-Hunter *et al.*, 1991). Em seguida, o material foi novamente desidratado, diafanizado e montado com lamínula e goma Damar. Os cortes preparados foram analisados e documentados, utilizando-se um sistema computadorizado de captura de imagens (microscópio de luz transmitida– Leica DM 1000; câmera fotográfica – Leica DFC 295; e programa de captura de imagem – *Leica Application Suite Professional, LAS V3.6*).

Baseado nas diferentes fases de desenvolvimento do oócito obtido na histologia e o critério adotado por Dias *et al.* (1998) e Honji *et al.* (2006), foi estabelecida uma classificação do estágio de maturação do ovário do lambari. A frequência, predominância e ausência de cada fase dos oócitos (oócito perinuclelar, oócito cortical alveolar, oócito vitelogênico, oócito atrésico e folículo pós ovulatório) foram levadas em consideração para a elaboração desta classificação (Gomes *et al.*, 2016).

3.10- Cálculo da Fecundidade Absoluta e Relativa

A fecundidade ou fecundidade absoluta corresponde ao número de oócitos liberados por uma fêmea em cada desova (Vazzoler, 1996), sendo o cálculo realizado apenas para as fêmeas maduras. Para cada indivíduo, em torno de um terço da gônada foi pesada e fixada em uma solução de Gilson durante duas semanas para a dissociação dos oocisto. Posteriormente, os oocisto foram transferidos para etanol 70% e, para a realização dos cálculos, o volume de etanol 70% foi acertado para 1 L e coletados 2,5 ml de oócitos, por meio de uma *pipeta Stempel*, para serem contados por meio de microscópio e do programa Leica DM100 (*light microscope, Leica DFC295 photographic camera and image capture Leica Application Suite Professional, LASV 3.6*) utilizando-se de três sub-amostras para de cada indivíduo. Para cada indivíduo, a fecundidade absoluta foi calculada contando o número de oócitos, que para a fecundidade relativa os oocistos foram divididas pela massa total dos ovários (fecundidade relativa). Os oocistos acima de 500 µm foram considerados como pertencentes ao lote vitelogênico e abaixo deste diâmetro, como lote residual.

3.11- Weight- of-Evidence (WoE)

A abordagem utilizada para avaliar se os compostos presentes na água podem ter um alto risco no desempenho reprodutivo dos animais do reservatório Billings utilizados neste trabalho é denominada *Weight- of- Evidence (WoE)*. Este método foi inicialmente desenvolvido para a avaliação de sedimento (Burton *et al.*, 2002). Para a realização desta análise é necessário definir os elementos essenciais que possibilitam a elaboração de conclusões mais acuradas em relação à existência ou não de algum prejuízo devido à contaminação do sedimento e, quais estressores e espécimes biológicos (ou respostas ecológicas) são as mais problemáticas (Burton *et al.*, 2002).

Mesmo esta análise sendo proposta para sedimento, a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) desenvolveu um critério de qualidade da água para dados de campo e laboratório utilizando o WoE (Cormier *et al.*, 2008), o que nos auxilia na elaboração de uma melhor conclusão sobre o risco que os compostos presentes na água poderiam causar na vitelogênese do lambari.

Para o melhor entendimento dos resultados, as variáveis analisadas foram divididas em dois conjuntos: metais (cádmio, chumbo, cromo, mercúrio, níquel e zinco total) e compostos orgânicos (clorofila-a, coliformes focais, fósforo solúvel, nitrato e nitrito). Primeiramente, foi calculado o coeficiente de risco para todas as variáveis individualmente, que consiste na razão dos valores de referência para os compostos químicos obtidos da resolução CONAMA/357 (CETESB, 2013), pelos valores dos mesmos compostos observados no presente trabalho, em cada reservatório. Após este cálculo, foi realizada a soma de todas as variáveis correspondentes ao seu conjunto de compostos e posteriormente, o valor foi dividido pelo número de variáveis presentes em cada grupo (metais $n= 6$, compostos orgânicos $n= 5$), chegando assim ao valor do coeficiente de risco. Os valores de coeficiente de risco observados entre 0-1 foram considerados de risco baixo; entre 1-2 de risco médio e acima de 2 como risco alto.

A partir de algumas variáveis obtidas no trabalho, foram estabelecidas 4 linhas de evidência: (1) Química: corresponde às análises de metais; (2) Fisiológica: concentração de VTG e estradiol plasmático; (3) Desregulador endócrino: expressão de VTG em machos; (4) Histologia e fecundidade. Estas linhas de evidência correspondem ao suporte para o estabelecimento da classificação e caracterização do risco que os compostos químicos poderiam acarretar nos animais, utilizando a lógica de WoE (Burton *et al.*, 2002; Chapman *et al.*, 2002). Uma visão geral dos parâmetros que serão aplicados, assim como a conclusão geral de acordo com as análises dos parâmetros está exemplificada na tabela 1.

Tabela 1: Esquema de classificação original da caracterização WoE utilizando 4 parâmetros (Químico, Fisiológico, Desreguladores Endócrinos, Histologia e Fecundidade) e uma conclusão (Geral) referente às análises observadas para os parâmetros.

	++	+	-
Químico	Uma ou mais análises estão acima do TEC; Concentrações de Pesticidas estão altas	Uma ou mais análises estão acima do PEC	Medidas analisadas que não excedem as diretrizes
Fisiológico	Alterações à condição fisiológica (relativamente ao controle)	Alterações à condição fisiológica (relativamente ao controle)	Sem alterações à condição fisiológica (relativamente ao controle)
Desreguladores Endócrinos	Expressão da VTG em machos	Expressão da VTG em machos	Sem expressão da VTG em machos
Histologia e Fecundidade	Disfunção na Reprodução	Disfunção na Reprodução	Sem disfunção na Reprodução
Geral	Efeitos adversos significativos previstos devido à: química elevada duas ou mais mudanças no biomarcador do lambari significativas / potencial de desregulação endócrina em pelo menos uma espécie	Potenciais efeitos adversos significativos previstos devido à: química elevada uma ou mais alterações no biomarcador do lambari significativas / potencial de desregulação endócrina em pelo menos uma espécie	Sem efeitos adversos significativos previstos devido à: redução de variáveis toxicológicas nenhuma mudança no biomarcador do lambari sinais insignificantes de desregulação endócrina

TEC: Concentração de Efeito Limiar – abaixo dos efeitos prejudiciais são improváveis de serem observadas; PEC: Concentração de Efeito Provável – acima dos efeitos prejudiciais são prováveis de serem observados; VTG: Vitelogenina, ++ Simboliza alto risco para a espécie; + Simboliza um risco à espécie; - Sem risco à espécie.

3.12 - Análise Estatística

Todos os parâmetros analisados foram submetidos ao teste de Análise de Variância *two-way* (ANOVA) para verificar a existência de diferenças estatísticas, tendo como fatores os grupos experimentais e as estações do ano. As análises foram conduzidas utilizando-se o software Sigma Stat para Windows (Jandel Corporation®) e o nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$.

4- Resultados

4.1- Análises de Água e Sedimento

4.1.1 – Variáveis químicas, físicas e biológicas da água e sedimento

No reservatório de Ponte Nova, a concentração de cromo e mercúrio total analisada nas amostras de água apresentou-se mais elevada que os valores de referência da resolução CONAMA/357 durante a estação de inverno do segundo ano (Tabela 2). Outro resultado a ser considerado foi a concentração de fósforo total e solúvel que apresentou valores mais elevados no verão do primeiro e segundo ano. Já no reservatório Billings (Tabela 3), as concentrações dos compostos orgânicos, tais como clorofila-a e fósforo total apresentaram-se mais elevados em todas as estações do ano em relação aos valores máximos estabelecidos pela resolução CONAMA/357, assim como os valores de coliformes fecais e fósforo solúvel nas estações de inverno e verão, chumbo e cobre total no outono do primeiro ano, mercúrio e níquel no inverno do mesmo ano e na primavera do primeiro ano, o mercúrio total. Por fim o pH no verão do primeiro ano mostrou-se básico. Os dados da concentração de organoclorados e organofosforados não apresentaram nenhum composto acima do estipulado pela resolução CONAMA/357, durante a realização deste estudo em ambos os reservatórios, com exceção do Coumafós (Assuntol) e o Diazinon na estação de outubro do primeiro ano (Tabelas 4 e 5).

Tabela 2: Variáveis físicas, químicas e biológicas da água analisadas ao longo de dois anos no Reservatório Ponte Nova.

Variável	CONAMA	2012				2013		2014
		Verão	Outono	Inverno	Primavera	Inverno	Primavera	Verão
Temperatura (°C)	--	21,5	18,8	16,3	23,3	18,3	21,74	22,5
Oxigênio dissolvido (mg/L)	> 5.0	6,8	8,0	7,7	5,8	7,85	6,49	5,96
pH	6.0-9.0	6,8	6,9	6,7	6,8	6,72	6,74	7,02
Carbono orgânico total (mg/L)	--	5,3	--	16,0	3,4	3,4	4,4	3,5
Carbono orgânico dissolvido (mg/L)	--	4,3	--	2,6	3,3	3,3	3,8	3,3
Clorofila-a(ug/L)	10	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0
Coliformes fecais (NMP/1000mL) (e)	1000	1,20x10e2	<1,1	<1,8	<1,8	3,5	<0,1	<18
Fósforo solúvel (mg/L)	0.01	0,12*	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,08	0,37*
Fósforo total (mg/L)	0.02	0,76*	--	<0,01	<0,01	0,02	0,11	0,38*
Nitrogênio nitrato (mg/L)	10.0	<0,1	<0,03	<0,03	0,16*	<0,1	0,78	<0,03
Nitrogênio nitrito (mg/L)	1.0	<0,01	<0,005	<0,005	<0,01	<0,01	<0,005	<0,005
Cádmio total (mg/L)	0.001	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,05	<0,005	<0,005
Chumbo total (mg/L)	0.01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,1	<0,01	<0,01
Cobre total (mg/L)	0.009	<0,005	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,005	<0,005
Cromo total (mg/L)	0.05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,16*	<0,01	<0,01
Mercurio total (mg/L)	0.0002	<0,0002	<0,0002	<0,0002	<0,0002	0,55*	0,0005	<0,0002
Níquel total (mg/L)	0.025	<0,01	<0,01	<0,01	<0,1	<0,01	<0,01	<0,01
Zinco total (mg/L)	0.18	0,03	0,02	<0,02	0,04	<0,2	<0,02	0,034

*Valores acima do limite estabelecido pela resolução CONAMA/357. < Valores com sinal estão abaixo dos limites de detecção do método de análise.

Tabela 3: Variáveis físicas, químicas e biológicas analisadas ao longo de dois anos no Reservatório Billings.

Variável	CONAMA	2012				2013		2014
		Verão	Outono	Inverno	Primavera	Inverno	Primavera	Verão
Temperatura (°C)	--	24,0	18,8	16,3	23,3	17,21	19,55	22,5
Oxigênio dissolvido (mg/L)	> 5.0	7,5	8,0	7,7	5,8	8,2	6,08	5,96
pH	6.0-9.0	9,0	6,9	6,7	6,8	7,86	7,78	7,02
Carbono orgânico total (mg/L)	--	4,8	--	16,0	3,4	4,4	4,2	3,5
Carbono orgânico dissolvido (mg/L)	--	4,4	--	2,6	3,3	4,0	4,2	3,3
Clorofila-a(ug/L)	10	25,6*	28,7	17,5*	34,4	10,2*	32,0	<10,0
Coliformes fecais (NMP/1000mL) (e)	1000	20x10e1	20x10e1	20x10e1	20x10e1	16x10e3*	<1,1	20x10e1
Fósforo solúvel (mg/L)	0.01	0,48*	0,1*	<0,05	0,15*	0,07*	<0,05	0,37*
Fósforo total (mg/L)	0.02	0,12*	--	<0,01	0,17*	0,08*	0,06	0,38*
Nitrogênio nitrato (mg/L)	10.0	<0,1	0,07	0,24*	0,17*	0,19	0,78	<0,03
Nitrogênio nitrito (mg/L)	1.0	0,2	0,24	<0,005	0,17	<0,01	0,12	<0,005
Cádmio total (mg/L)	0.001	<0,005	<0,005	<0,05	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Chumbo total (mg/L)	0.01	<0,01	0,06*	<0,1	<0,01	0,01	<0,01	<0,01
Cobre total (mg/L)	0.009	<0,005	0,01*	<0,1	<0,01	<0,005	<0,005	<0,005
Cromo total (mg/L)	0.05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Mercurio total (mg/L)	0.0002	<0,0002	<0,0002	0,27*	0,002*	<0,005	0,0002	<0,0002
Níquel total (mg/L)	0.025	<0,01	<0,01	0,11*	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Zinco total (mg/L)	0.18	0,03	0,02	0,2*	0,04	<0,2	<0,02	0,041

*Valores acima do limite estabelecido pela resolução CONAMA/357. < Valores com sinal estão abaixo dos limites de detecção do método de análise.

Tabela 4: Análise da concentração de organoclorados e organofosforados das amostras de água coletadas nos reservatórios de Ponte Nova ao longo do trabalho.

Variável	CONAMA	2012				2013		2014
		Verão	Outono	Inverno	Primavera	Inverno	Primavera	Verão
Organoclorados								
Alacloro	20.0	<0,005	<0,005	<0,005	<0,05	<0,005	<0,005	<0,005
Aldrin	0.005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Clodarno (alfa)	0.04	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Clordano (gama)	0.04	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDD (o,p')	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDD (p,p')	0.02	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDE (o,p')	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDE (p,p')	0.02	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDT (o,p')	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDT (p,p')	0.02	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Dieldrin	0.005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Dodecacloro Pentaciclodecano (Mirex	0.01	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endosulfan I	0.056	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endosulfan II	0.056	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endosulfan sulfato	0.056	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endrin	0.004	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endrin Aldeído	0.004	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endrin Cetona	0.004	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Heptacloro	0.01	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Heptacloro hepóxio	0.01	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorobenzeno	0.0065	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (alfa)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (beta)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (delta)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (épsilon)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (gama)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Isodrin	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Metolacloro	10.0	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Metoxicloro	0.03	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Oxy-Chlodarne	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Organofosforados								
Clorpirifos	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Clorpirifos Metil	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Coumafos (Asuntol)	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Demeton	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Demeton-O	0.1	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Demeton-S	0.1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Diazinon	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Diclorvos (DDVP)	--	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Disulfoton	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ethion	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Fention	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Folithion (Fenitrotrion)	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Guthion	0.005	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Malation	0.1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Metasystox (Demeton-S-metil)	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Metil Paration	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Paration (Paration etil)	0.04	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

< Valores com sinal estão abaixo dos limites de detecção do método de análise.

Tabela 5: Análise da concentração dos organoclorados e organofosforados das amostras de água coletadas nos reservatórios de Billings ao longo do trabalho.

Variável	CONAMA	2012				2013		2014
		Verão	Outono	Inverno	Primavera	Inverno	Primavera	Verão
Organoclorados								
Alacloro	20.0	<0,005	<0,005	<0,005	<0,05	<0,005	<0,005	<0,005
Aldrin	0.005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Clodarno (alfa)	0.04	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Clordano (gama)	0.04	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDD (o,p')	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDD (p,p')	0.02	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDE (o,p')	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDE (p,p')	0.02	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDT (o,p')	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
DDT (p,p')	0.02	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Dieldrin	0.005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Dodecacloro Pentaciclodecano (Mirex	0.01	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endosulfan I	0.056	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endosulfan II	0.056	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endosulfan sulfato	0.056	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endrin	0.004	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endrin Aldeído	0.004	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Endrin Cetona	0.004	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Heptacloro	0.01	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Heptacloro hepóxio	0.01	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorobenzeno	0.0065	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (alfa)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (beta)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (delta)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (épsilon)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Hexaclorociclohexano (gama)	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Isodrin	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Metolacloro	10.0	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Metoxicloro	0.03	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Oxy-Chlodarne	--	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Organofosforados								
Clorpirifos	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Clorpirifos Metil	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Coumafos (Asuntol)	--	<0,1	310*	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Demeton	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Demeton-O	0.1	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Demeton-S	0.1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Diazinon	--	<0,1	230*	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Diclorvos (DDVP)	--	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Disulfoton	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ethion	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Fention	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Folithion (Fenitrotrion)	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Guthion	0.005	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Malation	0.1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Metasystox (Demeton-S-metil)	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Metil Paration	--	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Paration (Paration etil)	0.04	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

< Valores com sinal estão abaixo dos limites de detecção do método de análise.

Os resultados das análises de metais no sedimento, nos reservatórios Ponte Nova e Billings são apresentados nas tabelas 6 e 7, respectivamente. Na Ponte Nova, foram observados valores mais elevados aos regulamentados pela resolução CONAMA/357 apenas para cromo total no inverno do primeiro ano e para o cádmio e mercúrio totais no inverno e primavera, respectivamente do segundo ano. Na Billings, foram observados valores mais elevados em quase todas as coletas, com exceção do outono do primeiro ano para as concentrações de cádmio, chumbo, cobre, cromo, zinco, no inverno e verão do segundo ano. O mercúrio total ficou abaixo ao estabelecido pela resolução assim como o cádmio na primavera e verão do segundo ano.

Tabela 6: Quantificação de compostos químicos no sedimento ao longo do trabalho no Reservatório da Ponte Nova.

Variável	CONAMA	2012				2013		2014
		Verão	Outono	Inverno	Primavera	Inverno	Primavera	Verão
Cádmio total (mg/Kg)	0,6	0,25	0,25	0,25	1,17	0,86*	0,25	0,25
Chumbo total (mg/ Kg)	35	0,15	0,5	29,1	29,2	20,3	4,30	3,96
Cobre total (mg/ Kg)	35,5	0,25	2,5	11,1	9,33	2,5	2,5	2,5
Cromo total (mg/ Kg)	37,5	0,25	2,5	39,9*	9,40	7,75	2,5	2,5
Mercúrio total (mg/ Kg)	0,17	0,025	0,025	0,025	0,054	0,05	0,34*	0,025
Níquel total (mg/ Kg)	*	2,5	2,5	0,25	6,19	2,5	2,5	2,5
Zinco total (mg/ Kg)	123	6,88	11,7	44,5	51,4	8,96	2,5	2,5

*Valores acima do limite estabelecido pela resolução CONAMA/357. Os resultados abaixo do limite de detecção do método foram divididos por 2.

Tabela 7: Quantificação de compostos químicos no sedimento ao longo do trabalho no Reservatório Billings.

Variável	CONAMA	2012				2013		2014
		Verão	Outono	Inverno	Primavera	Inverno	Primavera	Verão
Cádmio total (mg/ Kg)	0,6	5,65*	0,25	0,71*	5,13*	10,7*	0,25	0,25
Chumbo total (mg/ Kg)	35	85,1*	13,4	101*	99,2*	118*	84,2*	90*
Cobre total (mg/ Kg)	35,5	184*	29,5	271*	184*	224*	184*	173*
Cromo total (mg/ Kg)	37,5	85,1*	10,7	272*	76,2*	345*	94,5*	130*
Mercúrio total (mg/ Kg)	0,17	0,93*	0,62*	0,24*	0,69*	0,025	0,25*	0,025
Níquel total (mg/ Kg)	*	90,5	15,6	136	87,6	129	83,4	103
Zinco total (mg/ Kg)	123	381*	77,5	600*	445*	612*	461*	438*

*Valores acima do limite estabelecido pela resolução CONAMA/357. O resultados abaixo do limite de detecção do método foram divididos por 2.

4.2.1 Coeficiente de risco

A análise de evidência (Tabelas 8, 9 e 10) mostrou que a água do reservatório Billings apresentou-se com um alto coeficiente de risco durante todo o período de coletas com exceção do verão e outono do primeiro ano que teve um risco médio e na primavera e verão do segundo ano com risco baixo. Já na Ponte Nova foi observado um risco elevado em relação à concentração dos metais apenas no inverno do segundo ano.

Para os compostos orgânicos, no reservatório Billings, observa-se também um alto risco durante todo o período. Ainda para estes compostos, mas no reservatório de Ponte Nova, foi observado um alto risco (em relação ao fósforo total) no verão do primeiro e segundo ano.

Tabela 8: Valores dos conjuntos de referência (resolução CONAMA/357) e das variáveis (metais e compostos orgânicos) analisadas no estudo.

PN									BIL						
Variáveis	CONAMA	Ver/12	Inv/12	Pri/12	Out/13	Inv/13	Pri/13	Ver/14	Ver/12	Inv/12	Pri/12	Out/13	Inv/13	Pri/13	Ver/14
Metais															
Cádmio	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,002	0,005	0,02	0,002	0,002	0,002	0,005
Chumbo	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,05	0,005	0,005	0,05	0,06	0,05	0,05	0,01	0,005	0,01
Cobre	0,005	0,0002	0,005	0,005	0,005	0,002	0,0002	0,0002	0,002	0,01	0,05	0,005	0,002	0,002	0,005
Cromo	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,16	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Mercúrio	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,55	0,00002	0,0001	0,0001	0,0002	0,27	0,002	0,005	0,005	0,0002
Níquel	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,01	0,11	0,005	0,002	0,0002	0,01
Zinco	0,02	0,03	0,02	0,01	0,04	0,1	0,01	0,034	0,03	0,02	0,2	0,04	0,2	0,02	0,034
Compostos Orgânicos															
Clorofila-a	10	5	5	5	5	5	5	5	25,6	28,7	17,5	34,4	10,2	32	36,2
Cf	1000	100,2	0,6	0,9	0,9	3,5	0,05	9	200	500	200	200	16000	0,6	100,1
Fósforo	0,01	0,12	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,37	0,48	0,1	0,25	0,15	0,07	0,25	0,14
Nitrato	10	0,05	0,015	0,015	0,16	0,05	0,78	0,015	0,05	0,07	0,24	0,17	0,19	0,12	0,45
Nitrito	1	0,005	0,002	0,002	0,002	0,005	0,002	0,002	0,02	0,24	0,002	0,17	0,005	0,002	0,002

PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Ver/12 – Verão 2012; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014; Cf – coliformes fecais; CR – Coeficiente de Risco (total de pontos/número de variáveis).

Tabela 9: Razão entre os valores referência da resolução CONAMA/357 e os obtidos no estudo para as variáveis (metais e compostos orgânicos) analisadas, valor da somatória dos pontos (total de pontos) e o coeficiente de risco (CR) dos metais e compostos orgânicos.

PN								BIL						
Variáveis	Ver/12	Out/12	Inv/12	Pri/12	Inv/13	Pri/13	Ver/14	Ver/12	Out/12	Inv/12	Pri/12	Inv/13	Pri/13	Ver/14
Metais														
Cádmio	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	2	2	20	2	2	2	2
Chumbo	0,5	0,5	0,5	0,5	5	0,5	0,5	0,5	6	5	5	1	0,5	1
Cobre	0,02	0,56	0,56	0,56	0,22	0,02	0,02	0,56	1,11	5,56	0,56	0,22	0,22	0,22
Cromo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mercurio	0,5	0,5	0,5	0,5	2750	0,1	0,5	0,5	1	25	10	25	1	1
Níquel	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	4,4	0,2	0,08	0,008	0,4
Zinco	0,17	0,11	0,06	0,22	0,56	0,06	0,19	0,17	0,11	1,11	0,22	0,11	0,11	0,23
Total de Pontos	1,59	2,07	2,01	2,18	2756,18	1,08	1,61	3,92	10,62	61,07	17,98	28,41	3,84	4,85
CR	0,23	0,30	0,29	0,31	393,74*	0,15	0,23	0,56	1,52*	8,72*	2,57*	4,06*	0,55	0,69
Compostos Orgânicos														
Clorofila-a	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,56	2,87	1,75	3,44	1,02	3,2	3,62
Coliformes fecais	0,1002	0,0006	0,0009	0,0009	0,0035	0,00005	0,009	0,2	0,5	0,2	0,2	16	0,0006	0,1001
Fósforo solúvel	12	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	37	48	10	25	15	7	25	14
Nitrato (mg/L)	0,005	0,0025	0,0025	0,0025	0,005	0,0025	0,0025	0,02	0,24	0,0025	0,17	0,019	0,0025	0,045
Nitrito	0,005	0,0025	0,0025	0,0025	0,005	0,0025	0,0025	0,02	0,24	0,0025	0,17	0,005	0,0025	0,0025
Total de Pontos	12,61	3,00	3,00	3,00	3,01	3,00	37,51	50,80	13,85	26,95	18,98	24,04	28,20	17,76
CR	2,52*	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	7,50*	10,16*	2,77*	5,39*	3,79*	4,80*	5,64*	3,55*

* Valores que indicam alto grau de risco (valor encontrado acima de 2). PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Ver/12 – Verão 2012; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014; CR – Coeficiente de Risco (total de pontos/número de variáveis).

Tabela 10: Abordagem de evidência de peso baseada no coeficiente de risco e os principais compostos que influenciaram no coeficiente alto.

PN								BIL						
Conj. de Variáveis	Ver/12	Out/12	Inv/12	Pri/12	Inv/13	Pri/13	Ver/14	Ver/12	Out/12	Inv/12	Pri/12	Inv/13	Pri/13	Ver/14
Metais	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo	Médio	Médio	Alto	Alto	Alto	Baixo	Baixo
Compostos Orgânicos	Alto	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto

Valores encontrados no coeficiente de risco (Tabela 7) entre 0-1 foi classificado como baixo, entre 1-2 médio e acima de 2 alto. PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Ver/13 – Verão 2013; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014; Com. Org. – Compostos Orgânicos.

4.1- Massa e Comprimento corpóreo

Os resultados de massa e comprimento corpóreo das fêmeas durante os dois anos de coleta são apresentados na tabela 11. Foi observada diferença estatística significativa na massa corpórea das fêmeas da Ponte Nova ao longo das estações, com valores mais elevados nos animais do outono/2012 e verão/2014 em relação às demais estações do ano ($P < 0,001$). Já no reservatório Billings, não houve variação da massa corpórea ao longo das estações ($P = 0,262$). No entanto, na comparação entre os reservatórios, as fêmeas da Billings apresentaram-se com maior massa no inverno e primavera do primeiro ano enquanto que no outono do primeiro ano e verão do segundo observou-se o contrário ($P < 0,001$). Com relação ao comprimento total foi observada diferença estatística apenas para as fêmeas do reservatório Ponte Nova, no qual os animais no verão do segundo ano foram maiores que os coletados no inverno do segundo ano e verão, primavera e inverno do primeiro ano ($P < 0,001$). Além disso, no outono do primeiro ano as fêmeas foram maiores que as do inverno, verão e primavera do mesmo ano. Por fim, os animais capturados na primavera do primeiro ano são menores que as do segundo ano, na mesma estação ($P < 0,001$). Foi também observada diferença na comparação entre os reservatórios, uma vez que as fêmeas coletadas na Billings foram maiores na primavera do primeiro ano e as da Ponte Nova tiveram valores superiores no outono do primeiro ano e primavera e verão do segundo ano ($P < 0,001$). Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada nos machos ($P > 0,05$).

Tabela 11 – Massa corpórea (g), comprimento total (cm) das fêmeas e machos de *A. fasciatus* nos reservatórios de Ponte Nova e Billings (Média ± EPM).

	MC(g) PN	MC(g) Bil	CT(cm) PN	CT(cm) Bil
Fêmeas				
Ver/12	14,1±0,89 ^b	14,4±0,43	10,3±0,22 ^c	10,1±0,09
Out/12	17,8±0,61 ^{a*}	13,5±0,59	10,6±0,11 ^{ab*}	9,7±0,11
Inv/12	12,8±1,00 ^b	15,0±0,83 [*]	9,9±0,22 ^c	10,3±0,21
Pri/12	9,7±0,13 ^b	10,2±0,15 [*]	9,7±0,13 ^c	13,7±0,52 [*]
Inv/13	13,1±0,36 ^b	13,5±0,60	10,2±0,12 ^c	9,8±0,12
Pri/13	14,4±0,37 ^b	14,0±0,68	10,5±0,16 ^{ab*}	9,6±0,22
Ver/14	18,3±0,70 ^{a*}	14,0±0,76	11,0±0,16 ^{a*}	10,0±0,25
Machos				
Inv/13	10,9±0,57	14,7±0,87	9,2±0,12	10,8±0,25
Pri/13	12,2±0,71	11,1±0,8	10,0±0,12	9,4±0,29
Ver/14	12,9±0,43	13,8±1,44	10,5±0,16	10,1±0,46

^{abc} Letras representam diferenças estatísticas entre as fêmeas do mesmo reservatório ao longo das estações do ano. ^{*} Símbolo representa diferenças estatísticas entre as fêmeas dos reservatórios estudados dentro de uma mesma estação do ano. ^{*} Símbolo representa diferenças estatísticas entre as fêmeas nos reservatórios em uma mesma estação; PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Ver/12 – Verão 2012; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014; MC- Massa corpórea; CT. Comprimento Total.

4.3 Dot blot, Concentração Plasmática de Estradiol, Absorbância da VTG e Expressão Gênica de VTG e ER

4.3.1 Análises de Dot blot

Não foi possível observar uma ligação entre os anticorpos primários testados e a molécula de VTG de *A. fasciatus* nas análises de *Dot blot* (Figs. 11-13), já que as amostras de fêmeas vitelogênicas do lambari utilizadas e as amostras de controle negativo (omissão) não apresentaram coloração. Adicionalmente, ocorreu uma imunomarcação positiva para o plasma de *C. dimerus* (controle positivo de *Dot blot*). Dentre os dados destaca-se a presença de coloração nos machos do reservatório Billings utilizando anticorpo de perca, no entanto não houve marcação no controle positivo. Isso demonstra que a marcação não é de VTG.

Figura 11: Análise de *dot blot* no plasma de *A. fasciatus* utilizando anticorpo de anti-carpa VTG. Numeração 1, 2, 3 e 4 correspondem: 1 - controle negativo (sem anticorpo primário), fêmea de *A. fasciatus* coletada no reservatório de Ponte Nova, 2 - fêmea de *A. fasciatus* coletada no reservatório de Ponte Nova, 3 - controle positivo (amostra de plasma de macho injetado com estradiol de *C. dimerus*); 4 - macho de *A. fasciatus* coletado no reservatório Billings .

Figura 12: Análise de *dot blot* no plasma de *A. fasciatus* utilizando anticorpo de anti-salmão VTG. Numeração 1, 2, 3 e 4 correspondem: 1 - controle negativo (sem anticorpo primário), fêmea de *A. fasciatus* coletada no reservatório de Ponte Nova, 2 - fêmea de *A. fasciatus* coletada no reservatório de Ponte Nova, 3 - controle positivo (amostra de plasma de macho injetado com estradiol de *C. dimerus*); 4 - macho de *A. fasciatus* coletado no reservatório Billings.

Figura 13: Análise de *dot blot* no plasma de *A. fasciatus* utilizando anticorpo de anti-perca VTG. Numeração 1, 2, 3 e 4 correspondem: 1 - controle negativo (sem anticorpo primário), fêmea de *A. fasciatus* coletada no reservatório de Ponte Nova, 2 - fêmea de *A. fasciatus* coletada no reservatório de Ponte Nova, 3 - controle positivo (amostra de plasma de fêmea *C. dimerus*); 4 - macho de *A. fasciatus* coletado no reservatório Billings.

4.3.2 Concentração Plasmática de Estradiol

A concentração de estradiol plasmático não se alterou nas fêmeas (Fig.14), tanto na comparação dos animais ao longo das estações na Ponte Nova ($P= 0,173$) e Billings ($P= 0,357$), quanto na comparação dos animais entre os reservatórios ($P= 0,134$). No entanto, é imprescindível destacar o alto valor encontrado para esse hormônio na primavera do segundo ano nas fêmeas da Billings. Neste mesmo período, os machos (Fig. 15) do reservatório Billings apresentaram uma maior concentração de estradiol plasmático quando comparados ao longo das estações ($P< 0,001$) e em relação aos animais da Ponte Nova ($P< 0,001$).

Figura 14: Concentração plasmática de estradiol (Média $\pm$ EPM) em fêmeas de *A. fasciatus* nos reservatórios de Ponte Nova e Billings coletadas ao longo das estações do ano. PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Ver/13 – Verão 2013; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014.

Figura 15 Concentração plasmática de estradiol (Média $\pm$ EPM) dos machos de *A. fasciatus* dos reservatórios de Ponte Nova e Billings coletados ao longo das estações do ano. *Símbolo representa diferenças estatísticas entre os machos dos reservatórios estudados dentro de uma estação do ano. ^{ab}Letras representam diferenças estatísticas para os machos coletados no mesmo reservatório ao longo das estações. PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Ver/13 – Verão 2013; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014.

4.3.3 Absorbância da VTG

A VTG plasmática não apresentou diferença na absorbância em fêmeas do reservatório de Ponte Nova ($P = 0,054$) e Billings ($P = 0,067$) ao longo do tempo e também entre as estações ($P = 0,080$) ano (Fig. 16). Nos machos (Fig. 17) esta variável também não apresentou diferença estatística entre os ambientes e estações ($P = 0,142$).

Figura 16: Absorbância da VTG plasmática (Média $\pm$ EPM) nas fêmeas de *A. fasciatus* dos reservatórios de Ponte Nova e Billings ao longo das estações do ano. ^{ab}Letras representam diferenças estatísticas entre fêmeas viventes no mesmo reservatório ao longo do tempo. PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Ver/13 – Verão 2013; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014.

Figura 17: Absorbância da VTG plasmática (Média $\pm$ EPM) em machos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings estudados durante o experimento. PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Ver/13 – Verão 2013; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014.

4.3.4 Expressão Gênica da VTG e ER

Devido aos diversos testes realizados durante o processo de análise da expressão gênica e à quantidade limitada de fígado, são apresentados os resultados das análises de expressão do RNAm de VTG e ER das fêmeas de acordo com as seguintes estações: outono e inverno de 2012; primavera de 2012 (correspondentes ao primeiro ano), inverno de 2013, primavera de 2013 e verão de 2014 (correspondendo ao segundo ano). Para os machos, como dito anteriormente, só estão sendo apresentados os resultados referentes ao segundo ano. A tabela 12 apresenta os resultados de VTG e ER de fêmeas e machos em ambos os ambientes. Os resultados de expressão de RNAm da VTG mostraram que houve uma significativa elevação durante o verão de 2014 nas fêmeas do reservatório Billings em relação às demais estações e comparando-se com os animais da Ponte Nova ($P < 0,001$), contudo essa diferença não ocorreu na expressão de ER. Nos machos também não houve diferença estatística na expressão de VTG ($P = 0,258$) e ER ($P = 0,933$), contudo é importante ressaltar que alguns animais do reservatório Billings apresentaram uma expressão de VTG muito elevada no inverno, que não foi significativa devido a grande variabilidade individual.

Tabela 12: Expressão gênica (relativa ao controle) hepática da vitelogenina (VTG) e do receptor de estradiol (ER) de fêmeas e machos de *Astyanax fasciatus* coletados nos reservatórios de Ponte Nova e Billings ao longo das estações do ano. (Média $\pm$ EPM).

	<i>n</i>	<i>n</i>	VTG	VTG	ER	ER
	PN	Bil	PN	Bil	PN	Bil
Fêmeas						
Out/Inv12	4	4	1,4 $\pm$ 0,45	0,6 $\pm$ 0,36 ^b	1,1 $\pm$ 0,29	0,8 $\pm$ 0,32
Pri/12	2	6	1 $\pm$ 0,10	0,7 $\pm$ 0,17 ^b	1,0 $\pm$ 0,17	0,2 $\pm$ 0,05
Inv/13	6	4	1,3 $\pm$ 0,36	1,0 $\pm$ 0,35 ^b	1,5 $\pm$ 0,54	1,3 $\pm$ 0,28
Pri/13	5	6	3,0 $\pm$ 1,98	0,5 $\pm$ 0,30 ^b	1,9 $\pm$ 0,88	0,04 $\pm$ 0,01
Ver/14	5	7	1,2 $\pm$ 0,75	255,9 $\pm$ 96,48 ^{a*}	1,2 $\pm$ 0,33	1,4 $\pm$ 0,32
Machos						
Inv/13	4	4	6,0 $\pm$ 5,64	911,6 $\pm$ 706,2	1,1 $\pm$ 0,24	1,4 $\pm$ 0,37
Pri/13	5	4	6,2 $\pm$ 5,30	5,4 $\pm$ 2,61	1,2 $\pm$ 0,30	0,7 $\pm$ 0,40
Ver/14	6	3	1,5 $\pm$ 1,41	0,7 $\pm$ 0,30	1,4 $\pm$ 0,50	3,2 $\pm$ 0,60

^{ab} Letras referem-se a diferenças estatísticas encontradas entre os grupos analisados ao longo das estações do ano. * Símbolo refere-se às diferenças estatísticas entre os animais de diferentes reservatórios em uma estação. Out/Inv12 - Coletas realizadas nas estações de outono e inverno de 2012, sendo estas consideradas como um mesmo período; Out/Inv/12 – Outono e Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Ver/13 – Verão 2013; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014. . *n* - Números de animais analisados em cada estação.

4.4 IGS e IHS

Os valores de IGS nas fêmeas coletadas na Ponte Nova foram mais elevados na primavera do primeiro ano em relação ao outono e inverno do primeiro ano, assim como verão e inverno do segundo ano. Estes valores também foram mais elevados, ainda na Ponte Nova, no verão do primeiro ano quando comparados ao outono e inverno do primeiro ano e inverno do segundo ano ($P < 0,001$). Não houve diferença estatística para as fêmeas no reservatório Billings ao longo das estações ($P = 0,115$). Na comparação entre os ambientes foram observados valores mais elevados de IGS nas fêmeas da Billings no inverno do primeiro e segundo ano, assim como no verão do segundo ano ($P < 0,001$). Nenhuma diferença estatística significativa foi observada para os valores de IHS entre os ambientes e ao longo das estações ($P = 0,397$). Os valores são apresentados na tabela 13.

Tabela 13: Índices gonadossomático (IGS, %) e hepatossomático (IHS, %) das fêmeas de *A. fasciatus* coletadas nos reservatórios de Ponte Nova e Billings ao longo das estações do ano (Média ± EPM).

	IGS (%) PN	IGS (%) Bil	IHS (%) PN	IHS (%) Bil
Ver/12	11,0±0,89 ^{ab}	11,1±0,85	1,2±0,24	0,7±0,04
Out/12	6,9±0,53 ^c	8,8±0,66	1,1±0,05	1,1±0,14
Inv/12	6,1±0,63 ^c	10,3±0,21 [*]	1,7±0,58	10,7±0,85
Pri/12	13,3±0,82 ^a	10,7±0,91	1,0±0,14	0,7±0,05
Inv/13	6,4±0,63 ^c	9,5±0,96 [*]	1,3±0,22	1,0±0,10
Pri/13	11,3±0,70 ^{ab}	9,4±1,19	0,9±0,11	0,9±0,16
Ver/14	7,6±0,93 ^b	11,7±2,69 [*]	0,9±0,14	0,8±0,07

^{abc}Letras representam diferenças estatísticas entre fêmeas viventes no mesmo reservatório ao longo do tempo. ^{*}Símbolo representa diferenças estatísticas entre as fêmeas dos reservatórios estudados dentro de uma estação do ano. PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Ver/13 – Verão 2013; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014;.

4.5 Análise histológica dos ovários, Fecundidade Absoluta e Relativa

4.5.1 Histologia do Ovário

Do ponto de vista macroscópico, não foi observada variação morfológica dos ovários ao longo do período de coleta, assim como nas análises histológicas, nas quais se evidenciaram o predomínio de oócitos vitelogênicos em todas as estações do ano, tanto para as fêmeas da Ponte Nova quanto da Billings (Figs. 18 e 19, respectivamente), permitindo classificar as fêmeas de *A. fasciatus* em estágio de maturação avançada ao longo das estações do ano em ambos os reservatórios.

Figura 18: Análises macroscópicas (A, C, E, G) e microscópicas (B, D, F, H) dos ovários de fêmeas de *A. fasciatus* coletadas no reservatório Ponte Nova nas estações de verão e inverno do primeiro ano de coleta (A - D) e segundo ano (E - H). B e F) Presença de muitos oócitos vitelogênicos, com poucos oócitos perinucleolares, caracterizando o estágio de maturação avançada das fêmeas coletadas no verão e inverno do primeiro ano, respectivamente. D e H) Presença de muitos oócitos vitelogênicos, com poucos oócitos perinucleolares, caracterizando o estágio de maturação avançada das fêmeas coletadas no verão e inverno do segundo ano, respectivamente. Hematoxilina e eosina. Barras: 400µm.

Figura 19: Análises macroscópicas (A, C, E, G) e microscópicas (B, D, F, H) dos ovários de fêmeas de *A. fasciatus* coletadas no reservatório de Billings nas estações de verão e inverno do primeiro ano de coleta (A - D) e segundo ano (E - H). B e F) Presença de muitos oócitos vitelogênicos, com poucos oócitos perinucleolares, caracterizando o estágio de maturação avançada das fêmeas coletados no verão e inverno do primeiro ano, respectivamente. D e H) Presença de muitos oócitos vitelogênicos, com poucos oócitos perinucleolares, caracterizando o estágio de maturação avançada das fêmeas coletados no verão e inverno do segundo ano, respectivamente. Hematoxilina e eosina. Barras: 300µm.

Mesmo com o predomínio de oócitos vitelogênicos foi possível observar a presença de oogônias (Fig. 20A), oócitos cortical alveolares (Fig. 20B), oócitos perinucleolares (Fig. 20C), vitelogênicos com a presença do núcleo na região central (Fig. 20D) ou no polo do oócito (Fig. 20E) e oócitos atrésicos (Fig. 20F).

Figura 20: Estádios de maturação oocitária de fêmeas de *Astyanax fasciatus* analisadas durante os dois anos de coleta. A) oogônias (cabeça das setas), células pequenas que se desenvolvem em ninhos (delimitadas pelas cabeças de setas); B) Oócito perinucleolar (setas), sendo possível observar diversos nucléolos (cabeça de seta); C) Oócito cortical alveolar; D) Oócito vitelogênico com a presença do núcleo no meio da célula (cabeça da seta); E) Oócito vitelogênico com a presença do núcleo no polo da célula (cabeça da seta); F) Oócito atrésico demarcado apresentando uma desorganização (delimitado pelas setas). Hematoxilina e eosina. Barra: 100 μ m (D, E); 50 μ m (C); 25 μ m (B, F), 10 μ m (A).

A classificação dos ovários ao longo das coletas mostrou uma homogeneidade nas fêmeas, tanto durante as estações do ano como entre os reservatórios. A predominância

foi de oócitos vitelogênicos, seguido com oócitos perinucleolares frequentes e a presença de oócitos cortical alveolares. Foram observados apenas oócitos atresícos nas primaveras do primeiro e segundo ano das fêmeas da Ponte Nova e no verão do primeiro ano nos animais da Billings (Tabela 14).

Tabela 14: Classificação do estágio de maturação dos ovários baseado na fase do desenvolvimento dos oócitos das fêmeas de *A. fasciatus* coletadas nos reservatórios de Ponte Nova e Billings ao longo dos dois anos.

	PN					Bil					Maturation Stage
	PNO	COA	VO	AO	POF	PNO	COA	VO	AO	POF	
<i>Fêmeas</i>											
Ver/12	++	+	+++	---	---	++	+	+++	---	+	Maduro
Out/12	++	+	+++	---	---	++	+	+++	---	---	Maduro
Inv/12	++	+	+++	---	---	++	+	+++	---	---	Maduro
Pri/12	++	+	+++	+	---	++	+	+++	---	---	Maduro
Inv13	++	+	+++	---	---	++	+	+++	---	---	Maduro
Pri/13	++	+	+++	+	---	++	+	+++	---	---	Maduro

OPN: Oócito perinucleolar; OCA: Oócito cortical alveolar; VO: Oócito vitelogênico; AO: Oócito atresíco; PF: Folículo pós-ovulatório. + presente; ++ frequente; +++ predominante; --- ausente.

4.5.1 Fecundidade Absoluta e Relativa

Os valores de fecundidade absoluta e relativa, lotes vitelogênicos e residuais são apresentados na tabela 15. As fêmeas coletadas na Billings, na primavera do segundo ano apresentaram maior FA em relação às demais estações, com exceção do inverno do segundo ano ($P=0,030$). Na Ponte Nova não foram encontradas diferenças na FA ao longo das estações ($P=0,379$). Comparando-se os ambientes, as fêmeas da Billings exibiram valores de FA maiores durante a primavera e o inverno do segundo ano do que as fêmeas coletadas no reservatório de Ponte Nova nas mesmas estações ($P=0,050$ para ambas as diferenças). A FR apresentou as mesmas diferenças da FA tanto para as fêmeas da Billings ao longo das estações ($P=0,010$), quanto na comparação dos animais entre os ambientes ($P=0,050$ para ambas as diferenças). A porcentagem de oócitos em diâmetros do lote residual (DR) não apresentou diferenças nem entre os ambientes ($P=0,963$) nem ao longo do tempo no reservatório Billings ($P=0,235$) e Ponte Nova ($P>0,05$). O mesmo ocorreu para o DV, com os valores de $P=0,388$ na comparação dos animais dos diferentes reservatórios; $P=0,060$ para as fêmeas da Ponte Nova e $P=0,563$ para as fêmeas da Billings.

Tabela 15: Fecundidade absoluta (FA), fecundidade relativa (FR), porcentagem de oócitos do lote residual (DR) e vitelogênicos (DV) das fêmeas de *A. fasciatus* coletadas nos reservatórios de Ponte Nova (PN) e Billings (Bil) ao longo das estações do ano (Média $\pm$ EPM).

	FA PN	FA Bil	FR PN	FR Bil	DR PN	DR BIL	DV PN	DV Bil
<i>Fêmeas</i>								
Ver/12	8056,5 $\pm$ 1113,74	12988,9 $\pm$ 2189,30 ^b	4272,9 $\pm$ 294,84	6098,1 $\pm$ 893,91 ^b	79,2 $\pm$ 2,41	79,2 $\pm$ 5,11	20,7 $\pm$ 2,85	22,1 $\pm$ 5,74
Out/12	8289,4 $\pm$ 1395,6	11153,6 $\pm$ 1890,45 ^b	4601,2 $\pm$ 456,30	9094,8 $\pm$ 3472,03 ^b	83,1 $\pm$ 7,28	83,1 $\pm$ 13,23	12,3 $\pm$ 1,80	12,0 $\pm$ 3,23
Inv/12	1443,6 $\pm$ 375,30	3097,2 $\pm$ 780,47 ^b	2330,2 $\pm$ 473,07	2269,7 $\pm$ 402,04 ^b	89,4 $\pm$ 6,09	89,4 $\pm$ 1,20	9,0 $\pm$ 0,41	8,8 $\pm$ 2,00
Pri/12	7542,0 $\pm$ 1391,11	4867,8 $\pm$ 1073,99 ^b	3798,2 $\pm$ 505,03	3104,0 $\pm$ 431,78 ^b	77,1 $\pm$ 9,30	77,1 $\pm$ 3,23	23,0 $\pm$ 5,75	11,0 $\pm$ 3,23
Inv/13	2823,5 $\pm$ 1731,59	25385,7 $\pm$ 8226,28 ^{ab*}	3678,6 $\pm$ 910,86	18043,3 $\pm$ 7818,92 ^{ab*}	84,6 $\pm$ 3,77	83,7 $\pm$ 2,66	17,2 $\pm$ 4,81	16,0 $\pm$ 2,25
Pri/13	6630,9 $\pm$ 1731,59	61322,3 $\pm$ 16873,90 ^{a*}	3762,2 $\pm$ 287,11	43322,8 $\pm$ 10176,49 ^{a*}	81,2 $\pm$ 2,43	77,4 $\pm$ 4,41	19,5 $\pm$ 2,26	22,7 $\pm$ 4,47
Ver/14	5347,2 $\pm$ 966,86	1972 $\pm$ 787,48 ^b	3847,8 $\pm$ 910,86	1166,9 $\pm$ 393,81 ^b	85,6 $\pm$ 1,13	83,8 $\pm$ 8,10	14,9 $\pm$ 1,01	16,2 $\pm$ 8,10

^{abc} Letras representam diferenças estatísticas entre fêmeas no mesmo reservatório ao longo das estações do ano. ^{*} Símbolo representa diferenças estatísticas entre as fêmeas dos reservatórios estudados dentro de uma mesma estação do ano. PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Out/12 – Outono de 2012; Inv/12 – Inverno de 2012; Pri/2012 – Primavera de 2012; Ver/13 – Verão 2013; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014; FA – Fecundidade Absoluta, FR – Fecundidade Relativa, DR – porcentagem de oócitos com diâmetro residual, DV – porcentagem de oócitos com diâmetro vitelogênico.

Foi possível identificar dois picos de distribuição da frequência do diâmetro oocitário ao longo dos dois anos de coleta em ambos os ambientes, sendo um pico maior (maior porcentagem) correspondente ao lote residual e um pico menor, correspondente ao lote vitelogênico (Figs. 21 e 22). A frequência de distribuição do diâmetro, principalmente nos lotes vitelogênicos, variou ao longo do ano, como pode ser ilustrado nas figuras 21 e 22.

Figura 21: Porcentagem da frequência do diâmetro oocitário das fêmeas de *Astyanax fasciatus* coletadas no primeiro ano nos reservatórios Billings e Ponte Nova. A, E) Fêmeas coletadas no verão de primeiro ano nos reservatórios de Ponte Nova e Billings, respectivamente. B, F) Fêmeas coletadas no outono de 2012 nos reservatórios de Ponte Nova e Billings, respectivamente. C, G) Fêmeas coletadas no inverno de 2012 nos reservatórios de Ponte Nova e Billings, respectivamente. D, H) Fêmeas coletadas na primavera de 2012 nos reservatórios de Ponte Nova e Billings, respectivamente. PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Ver/1 – Verão 2012; Out/1 – Outono de 2012; Inv/1 – Inverno de 2012; Pri/1– Primavera de 2012.

Figura 22: Porcentagem da frequência do diâmetro oocitário das fêmeas de *Astyanax fasciatus* coletadas no segundo ano nos reservatórios Billings e Ponte Nova. A, D) Fêmeas coletadas no inverno de segundo experimento nos reservatórios de Ponte Nova e Billings, respectivamente; B, E) Fêmeas coletadas na primavera de 2013 nos reservatórios de Ponte Nova e Billings, respectivamente; C, F) Fêmeas coletadas no verão de 2014 nos reservatórios de Ponte Nova e Billings, respectivamente. PN – Ponte Nova; Bil, Billings; Inv/13 – Inverno de 2013; Pri/2013 – Primavera de 2013; Ver/14 – Verão 2014.

5- Weight-of-Evidence (WoE)

Com relação aos dados de WoE, os valores das variáveis biológicas e ambientais mostraram que no reservatório Billings há uma evidência de risco para os lambaris, sobretudo devido à presença dos metais, que podem ter alterado alguns aspectos fisiológicos, incluindo processos de expressão gênica em *A. fasciatus*. No entanto, de forma geral essas substâncias parecem não estar ameaçando o processo de reprodução, mas na Billings há um possível risco prejudicial à espécie (Tabela 16).

Tabela 16: Caracterização do WoE de acordo com os dados analisados no presente estudo.

		Ponte Nova	Billings
Químicos presentes	Metais	-	++
Variáveis Fisiológicas	Estradiol	-	+ (Primavera/2013- valor médio elevado)
	VTG	-	-
Desregulação endócrina	Expressão da VTG em machos	-	+ (alta variabilidade individual)
	Disfunção na Reprodução	-	-
Geral	Efeitos adversos significativos previstos devido à: química elevada	Sem efeitos adversos significativos	Possível efeito devido à: Elevados valores de metais na água;
	duas ou mais mudanças no biomarcador		Mudança no estradiol plasmático
	significativa / potencial de desregulação endócrina em pelo menos uma espécie		Alteração da expressão do receptor estradiol em fêmeas e elevados valores para machos

Concentração de Efeito Provável – acima dos efeitos prejudiciais são prováveis de serem observados; VTG: Vitelogenina; ++ Simboliza alto risco para a espécie; + Simboliza um risco à espécie; - Sem risco à espécie.

5- Discussão

Os resultados de trabalhos realizados em ambiente natural devem ser cautelosamente interpretados, sendo necessário avaliar muitos fatores. Deste ponto de vista, os dados observados devem levar em consideração o que foi proposto por Elliott (2003), que menciona que antes de elaborar um modelo conceitual da relação do contaminante com o ambiente e fatores da história de vida dos animais, é necessário observar que o tipo de resposta de um organismo, frente a um poluente, dependerá do tipo de contaminante e sua ação singular ou combinada a outros. Além disso, este modelo irá depender também de outros fatores, tais como a temperatura, a salinidade e a concentração de oxigênio dissolvido. Finalmente, dependerá do estágio de desenvolvimento e saúde dos organismos quando estes estão em contato com o(s) poluente(s).

Como mencionado, os represamentos das áreas utilizadas neste estudo foram realizados pelo menos há 40 anos. A represa Billings foi represada em 1927 para estabelecer o nível de água do Rio das Pedras e assegurar um fluxo contínuo de água para as plantações nas cidades próximas (Mariani *et al.*, 2006). Já o reservatório de Ponte Nova foi construído em 1972, com o objetivo de controlar as enchentes e possibilitar condições de navegabilidade ao Rio Tietê, além de permitir a recuperação de várzeas e o abastecimento de água, ainda utilizado hoje (Schroeder- Araújo, 1980).

De maneira geral, o barramento de um rio ocasiona diversas alterações no ambiente, como a transformação de um ambiente lótico em lêntico, que por sua vez altera diversas condições físicas e químicas da água e do solo e leva ao surgimento de novos habitats e à perda de outros (Agostinho *et al.*, 2007). Estas alterações são tão profundas que Baxter (1977) já considerava que o represamento de um rio equivale a uma criação de um novo ecossistema, principalmente pelas mudanças tróficas na base da produção primária e na ciclagem de nutrientes. Diante disso, os níveis de impacto de um ecossistema podem ser caracterizados em três tipos: de primeira ordem, que englobam alterações físicas, químicas e geomorfológicas decorrentes do bloqueio do rio e das alterações na movimentação da massa de água; de segunda ordem, que correspondem às alterações na produtividade primária e na estrutura do canal; e de terceira ordem, incluindo modificações nas assembleias de invertebrados e peixes decorrentes dos impactos de primeira ordem (WCD, 2000).

De modo geral, em um reservatório são observados processos de acúmulo, exportação e ciclagem de material em suspensão e nutrientes (Cao *et al.*, 2011). Isso, juntamente com o que foi mencionado no parágrafo anterior, principalmente no impacto de terceira ordem, interfere na diversidade das espécies ícticas. Além disso, a sobrevivência das espécies dependerá da sua capacidade de ajuste fisiológico, sendo que as espécies generalistas tendem a ser mais bem sucedidas, devido a sua vasta capacidade de ajuste, principalmente em relação a sua alimentação e reprodução (Agostinho, *et al.*, 2007). Este é o caso do *A. fasciatus*, considerada por muitos autores como uma espécie bioindicadora, por apresentar um tamanho pequeno, estar presente em ambientes impactados e não impactados, possuir um hábito alimentar onívoro e por exibir uma gama de táticas reprodutivas que, dependendo do ambiente, pode apresentar inclusive múltiplas desovas durante o ano ou mesmo em um período específico (Schulz e Martins-Júnior, 2001; Alberto *et al.*, 2005; Carrasco-Letelier *et al.*, 2006).

5.1- Análise de sedimento e água e suas influências nos peixes

5.1.1 Análise de Sedimento e suas influências nos peixes

A qualidade e característica do sedimento podem afetar a integridade física, química e biológica de todos os ambientes aquáticos (Waters, 1995; Caux *et al.*, 1997; Wood e Armitage, 1997). Neste estudo, foram observadas elevadas concentrações de metais no sedimento do reservatório Billings, corroborando os dados já encontrados por Moschini-Carlos *et al.* (2010). Além disso, o reservatório Billings apresenta uma profundidade média de 10 metros (Lamparelli *et al.*, 2014) e um tempo de retenção da água de 720 dias (Rodrigues *et al.*, 2010), características que influenciam diretamente na concentração de metais na água (Martin, 2000) e consequentemente no sedimento. As propriedades mencionadas deste reservatório auxiliam a entender porque os valores de metais no sedimento, assim como na água, estão bem acima do permitido pela Resolução CONAMA/357. No entanto, para avaliar a real influência destes metais e de outros compostos sobre a reprodução seria necessário realizar mais experimentos, tanto em bioensaio como também *in loco* com outras espécies, com níveis tróficos distintos e/ou diferentes nichos ecológicos, por exemplo, utilizando um critério de análise química e de sedimento contaminado que já possui sua própria metodologia (USEPA, 2008).

5.1.2 Análise de água e suas influências nos peixes

Os organoclorados e fosforados não serão discutidos neste trabalho, já que seus valores ficaram abaixo do limite de detecção na maioria das análises, considerando o método utilizado, não representando, a partir dos dados aqui encontrados, nenhuma ameaça à vida aquática, quando comparado à resolução CONAMA/357.

Os compostos orgânicos, no reservatório Billings, como a clorofila-*a* e concentração de fósforo total e solúvel mostraram-se acima do estabelecido na resolução CONAMA/357 (CETESB, 2013). O reservatório Billings é caracterizado pelas constantes florações de cianobactérias, o que por sua vez, explica os valores de clorofila-*a* (CETESB, 2013). Isso pode ocorrer devido à elevação da matéria orgânica resultando também em diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (Cormier *et al.*, 2008). Esse processo pode ter ocorrido, já que foram encontrados valores elevados de nitrogênio e fósforo no reservatório Billings, mas os níveis de oxigênio dissolvido permaneceram adequados (acima de 4,0 mg/L). Adicionalmente, sabe-se que as cianobactérias e algas verdes produzem toxinas potencialmente danosas à fauna, pois podem comprometer a homeostase, ou mesmo causar a morte de animais (Repavich *et al.*, 1989). Dentre os fatores que podem fazer com que as cianobactérias liberem suas toxinas na água está a exposição aos metais (Koelmans, 1995). Algas verdes, por exemplo, quando expostas ao cádmio apresentam um aumento da sua toxicidade, (Carmichael, 1992) e, além disso, as variações no pH podem elevar a liberação de toxinas dessas algas. Isso poderia ter ocorrido no verão do primeiro ano, quando o pH da água apresentou-se básico. No entanto, os resultados aqui apresentados não permitem afirmar que os compostos orgânicos tiveram influência direta nas diferenças encontradas nos biomarcadores de *A. fasciatus* no reservatório Billings.

O reservatório Billings apresentou também valores elevados de diferentes metais nas amostras de água ao longo do primeiro ano. Segundo a CETESB (2013), tanto a Represa de Ponte Nova quanto a Billings são consideradas águas pertencentes à Classe II dos corpos hídricos, porém a presença de altos teores de metais dissolvidos, principalmente no reservatório Billings, está acima daquilo que a categorização de classe menciona. No entanto, é importante mencionar que a classificação da qualidade de água de um reservatório foi estabelecida pela resolução CONAMA/357 e alterada pela Resolução CONAMA/430 de 2011 que a complementou. Para cada um dos usos e

Classes de qualidade são estabelecidas condições de qualidade por meio de variáveis (1) descritivas, tais como materiais flutuantes não naturais, óleos e graxas, substâncias que propiciam gosto ou odor, corantes provenientes de fontes antrópicas, resíduos sólidos objetáveis e toxicidade e; (2) quantitativas, tais como pH, DBO, OD, substâncias orgânicas, metais totais e dissolvidos, densidade de cianobactérias, teor de clorofila, entre outras, onde existem faixas de concentração permitidas (CETESB, 2015). Para cada classe de qualidade são associados usos preponderantes atuais ou futuros, fixando-se ou adotando-se padrões de qualidade (padrões) e os valores limites dos parâmetros de qualidade estabelecidos em legislação (critérios). Desta forma é importante ressaltar que os critérios levam em consideração as análises científicas e os padrões focam tanto nas análises científicas, como em fatores políticos, econômicos e sociais do país, além de aspectos relativos ao uso e manejo das águas (Zagatto e Bertoletti, 2006), o que demonstra que apenas as análises de metais e dos outros compostos aqui analisados não podem sugerir a alteração de Classe do reservatório Billings.

Um estudo prévio no reservatório Billings avaliou a concentração de metais em 7 pontos do reservatório e em 4 espécies de peixes: *Geophagus brasiliensis*, *Hoplias malabaricus*, *Tilapia rendalli* e *Astyanax* ssp. Os níveis de Cr (assim como de Cd) não atenderam ao limite estabelecido pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) em cerca de 60% dos *Geophagus brasiliensis*, 98% dos *Astyanax* ssp, 67% dos *Hoplias malabaricus* e 100% das *Tilapia rendalli*. Os níveis de Cu e Hg em todas as amostras atenderam aos limites estabelecidos pela legislação nacional (Oliveira, 2012). Tais dados, juntamente com os valores de metais encontrados na água também por Oliveira (2012) fortalecem a hipótese que os metais analisados em concentração total também apresentam uma fração solúvel e que por sua vez, podem ser um potencial agente na indução de respostas biológicas nos animais.

Estudos mostraram a influência de diferentes metais nos organismos, inclusive na reprodução, como por exemplo, na fecundidade, sobrevivência do embrião (Penglase *et al.*, 2014) e desova, receptor de estradiol, expressão da vitelogenina e concentração de estradiol (Correia *et al.*, 2010; Driessnack *et al.*, 2016) e função testicular (Kida *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016). No presente estudo, não foi objetivo estabelecer o papel de cada composto, como os metais nas respostas de *A. fasciatus*, o que não seria possível devido a grande variedade de metais presentes na água do reservatório Billings e as complexas interações que podem ocorrer entre eles. Contaminantes com similar ou diferentes

modos de ação (MoA) podem influenciar a toxicidade de outro agente, resultando em um ilimitado número de possibilidades de combinações, tais como aditiva, sinérgica ou antagônicas (Beyer *et al.*, 2014). A combinação dos agentes tóxicos exerce seu efeito ao longo de duas vias principais, nomeadas pela concentração de adição (CA) ou pela ação independente (IA) (Greco *et al.*, 1995; Altenburger *et al.*, 1996; Suhnel, 1998; Goldoni e Johansson, 2007). A CA ocorre quando dois ou mais químicos com similar MoA afetam um biomarcador, enquanto o IA ocorre quando dois ou mais químicos afetam o mesmo biomarcador mas por diferentes MoA (Beyer *et al.*, 2014).

Neste estudo, fica clara a necessidade de realizar trabalhos futuros com o objetivo de avaliar os MoA dos diferentes metais presentes no reservatório Billings e, em quais biomarcadores ocorrem possíveis modificações na fisiologia, como os relacionados acima. Além disso, os conceitos mencionados no parágrafo acima (CA e IA) devem ser levados em consideração para a consolidação da metodologia. Adicionalmente, deve-se observar que a literatura disponível para o reservatório Billings aponta a presença de elevadas concentrações de outros compostos na água como ibuprofeno, diclofenaco e cafeína (Almeida, 2003), que podem estar contribuindo para o desencadeamento das respostas observadas neste trabalho.

5.2 *Dot blot*, Concentração Plasmática de Estradiol, Absorbância da VTG, Expressão Gênica de VTG e ER e Fecundidade

5.2.1 *Dot blot*

Nas análises de *Dot blot* os anticorpos primários não se ligaram às moléculas de vitelogenina. Entretanto, é possível sugerir a realização de novos testes utilizando o anticorpo primário de Carpa Anti-Vitelogenina LS-C76832 ou LS-C76835 (LifeSpan BioSciences®), já que nas análise de *Western blot* houve a ligação entre o anticorpo e a molécula de VTG.

5.3.2 Concentração Plasmática de Estradiol, Expressão VTG e ER e Absorbância da VTG

O aumento da concentração do estradiol encontrado nos machos da Billings na primavera do segundo ano em relação aos animais da Ponte Nova não foi encontrado nas fêmeas. No entanto, a análise dos dados mostrou que nesta mesma estação, as fêmeas da Billings apresentaram uma alta variabilidade individual na concentração de estradiol plasmático, resultando em um pico médio de concentração que sugerem valores mais elevados do que as fêmeas da Ponte Nova. Esses dados sugerem que esta diferença foi ocasionada pela ação de algum agente externo, como por exemplo, metais ou outros compostos analisados ou não neste estudo.

Oliveira (2012) encontrou elevadas concentrações de metais nos tecidos de *A. fasciatus* coletados na Billings, como o Cd, que estava acima da resolução CONAMA/357 na região do Bororé, local próximo onde foi coletados os peixes deste trabalho. O cádmio é um antagonista de cálcio (Ca^{2+}) e é conhecido por causar efeitos tóxicos na homeostase do Ca^{2+} em experimentos agudos (Niyogi e Wood, 2004). Seus efeitos também foram observados em testes crônicos diminuindo o crescimento e a sobrevivência (Hansen *et al.*, 2002; Mebane *et al.*, 2008), causando desregulação da homeostases dos ions sódio (Na^+) e Ca^{2+} (McGeer *et al.*, 2000; Reynders *et al.*, 2006), alterações da função imunológica (Zelikoff *et al.*, 1995), estresse oxidativo (Cao *et al.*, 2010), dano em tecido e esqueleto (Wangsongsak *et al.*, 2007; Benaduce *et al.*, 2008), além da sua atuação como desregulador endócrino (Foran *et al.*, 2002; Lizardo-Daudt *et al.*, 2008). Na reprodução, estudos com teste crônico mostraram que o cádmio alterou a frequência de desova e fecundidade em *Pimephales promelas* (Sellin e Kolok, 2006; Wang *et al.*, 2014) e, em experimentos agudos com concentração de 6 $\mu\text{g/L}$ teve efeito na abundância de ER- β transcrita no fígado, mas não houve alteração na transcrição de ER- α e VTG no fígado e na concentração de estradiol no plasma em *Pimephales promelas* (Driessnack *et al.*, 2016). Diante deste contexto, os resultados da concentração de estradiol encontrados em machos e fêmeas no reservatório Billings durante a primavera do segundo ano, sugerem que o ambiente impactado teve influência no processo de síntese e liberação de estradiol no plasma, podendo ser resultado da presença de metais e/ou outros compostos, que não foram avaliados neste estudo.

Não foram observadas alterações nas análises da absorbância de vitelogenina no plasma e também na expressão gênica da VTG e ER α no fígado. Como já mencionado,

o cádmio não alterou a expressão da ER α e da VTG em um bioensaio *Pimephales promelas* (Driessnack *et al.*, 2016). Este resultado corrobora com o observado neste estudo, mas não é possível realizar uma relação direta dos dois resultados, já que o MoA de ação nos dois casos são distintos, principalmente porque o experimento citado foi realizado em laboratório e o presente estudo ocorreu em ambiente natural (que possui uma imensidade de outros compostos). No entanto, podemos sugerir que é possível que haja a influência deste metal, que pode agir em combinação com outros agentes, nos mecanismos fisiológicos e bioquímicos do processo de esteroidogênese, sobretudo nas gônadas. A forma de sua influência ainda não pode ser comprovada ou sugerida para *A. fasciatus*, devido a não definição do seu MoA, já que em um experimento em linhagem de células *in vitro* evidenciou que o cádmio atua como um desregulador endócrino com efeito é estrogênico (Stoica *et al.* 2000), elevando a expressão do ER α enquanto que em outro trabalho, também *in vitro* mas utilizando uma análise *E-screen* foi observado que sua ação foi antiestrogênica (Silva *et al.* 2007).

No presente estudo, as condições do reservatório Billings desencadearam uma ação estrogênica em *A. fasciatus*, principalmente nos machos e em fêmeas durante a primavera do segundo ano. No entanto, é necessário avaliar em bioensaios o real MoA dos compostos que se encontram em concentrações acima do limite estabelecido pela resolução CONAMA/357, ou até mesmo algum composto que desencadeie esta ação estrogênica, mas que não foi abordado nas análises de água e sedimento neste estudo. As fêmeas coletadas no reservatório Billings apresentaram também uma maior expressão de VTG durante o verão do segundo ano, sendo o mesmo observado nos machos no inverno do mesmo ano. O fato dos animais apresentarem respostas em momentos diferentes pode ser devido a dois principais motivos: ao diferente MoA das substâncias em cada situação e à variação individual. Fatores correspondentes ao organismo alvo como idade, sexo, estado nutricional, saúde do organismo e tipo de tecido podem ter influência na resposta biológica (Sumpter e Jobling, 1995; Tyler *et al.*, 1998). Diante disso, o valor médio encontrado para os machos, mesmo não havendo uma diferença estatística e com grande variação individual, indica que a condição ambiental influenciou o resultado encontrado no inverno do segundo ano.

Na comparação entre os ambientes, os maiores valores de fecundidade (FA e FR) foram encontrados nas fêmeas da Billings, no inverno e primavera. Estes dados, juntamente com os resultados de expressão de VTG nos machos no inverno e os valores

de estradiol plasmáticos em ambos os sexos, reforçam ainda mais que esteja ocorrendo uma possível influência dos poluentes presentes no reservatório Billings no processo reprodutivo.

A influência do ambiente poluído na fecundidade já fora observada em outros estudos com teleósteos, tanto de ensaios crônicos como agudos (Pane *et al.*, 2004a, b; Penglase *et al.*, 2014; Smylie *et al.*, 2016). Podemos sugerir que a concentração de estradiol no plasma, sobretudo na primavera do segundo ano, influenciou os valores de FA e FR por uma ação direta de compostos de ação estrogênica presentes na Billings. É importante mencionar também que os resultados aqui discutidos para as fêmeas do reservatório Billings, em sua maioria, não se repetiram entre um ano e outro, sendo que as maiores alterações foram vistas durante o inverno e a primavera do segundo ano. Por outro lado, as fêmeas coletadas na Ponte Nova não apresentaram diferenças nestas variáveis entre as estações de cada ano. Isso enfraquece a hipótese de que as variações encontradas entre os ambientes sejam decorrentes de alguma alteração sazonal intrínseca da população.

Os resultados encontrados fortalecem a hipótese levantada neste trabalho, apontando para a necessidade da realização de experimentos em laboratório com o objetivo de identificar o real papel dos agentes químicos com efeitos tóxicos na fauna íctica do reservatório Billings. De forma geral, experimentos desta natureza poderiam ser derivados de duas estratégias metodológicas, a Análise de Efeito Direcionado (EDA) e a Avaliação e Identificação de Toxicidade (TIE) (Beyer *et al.*, 2014). A EDA consiste em um uso combinado de fracionamento químico, bioensaio sequencial e análise química subsequente, que é construída sobre a suposição de que a toxicidade pode ser avaliada de forma separada pelas classes dos químicos (Brack e Schirmer, 2003; Brack *et al.*, 2007; Burgess *et al.*, 2013; Hecker e Hollert, 2009). A TIE foi desenvolvida pela USEPA, e seu método contém três fases: fase 1 – Caracterização; fase 2 – Identificação e fase 3 – Confirmação (Monteiro *et al.*, 2013). Seu conceito é remover os grupos de componentes por suas propriedades como, compostos orgânicos, metais iônicos e não iônicos da matriz de teste até que a toxicidade desapareça (fase 1); em seguida os químicos suspeitos são identificados pela química analítica (fase 2) e posteriormente sua toxicidade é confirmada por meio dos mesmos bioensaios utilizados na fase inicial de caracterização (fase 3) (Hecker e Giesy, 2011).

Dentro deste contexto do EDA e TIE e propondo as análises dos seus efeitos em *A. fasciatus*, é sugerido o uso da EDA, já que este método trabalha sobre o conceito de avaliação combinada dos químicos identificados, uma vez que o reservatório Billings apresenta diversos compostos que podem interagir entre si e apresentar um potencial tóxico. Além disso, é muito importante também realizar ensaios de toxicidade aguda como LD₅₀ e LOEL, além de testes crônicos e sub-crônicos.

5.3 IGS e IHS, análise histológica das gônadas e reprodução de *A. fasciatus*;

5.3.1 IGS e IHS

Os dados de IGS mostraram uma repetição de valores nos dois anos, em ambos os reservatórios. Prado *et al.* (2011), estudando também *A. fasciatus* em cinco reservatórios distintos na região sudeste do Brasil (um deles considerado limpo e os demais poluídos) mostraram que em julho houve uma queda no IGS das fêmeas em todos os reservatórios estudados, com uma elevação no período de outubro. Além disso, estes mesmos autores observaram que no mês de julho dois dos quatro locais poluídos apresentaram valores maiores de IGS em relação ao ambiente não poluído. Tais meses, apresentados acima, representariam no presente trabalho, as estações de inverno (julho) e primavera (outubro). Ainda neste trabalho, o IGS calculado mostrou valores médios que variaram de 3 até 10%, diferente do que encontramos no presente estudo, principalmente para os animais da Ponte Nova, nos quais o IGS variou de 6,6% a 13,2%. Em outro estudo, desenvolvido também com fêmeas de *A. fasciatus* coletadas em dois pontos do rio Camanducaia (São Paulo), sendo um local poluído e outro não poluído, o IGS das fêmeas foi maior no ambiente com maior influência antrópica, com valores médios de 10,8%, porém não foi realizada a análise ao longo do ano (Alberto *et al.*, 2005).

De modo geral, os peixes exibem histórias de vida flexíveis com diferentes estratégias, sendo elas largamente determinadas pelas condições ambientais (Tamate e Maekawa, 2000). Estudos feitos com *Geophagus brasiliensis* demonstraram que populações viventes em ambientes distintos apresentaram estratégias reprodutivas diferentes, por exemplo, em populações localizadas no rio a reprodução ocorreu ao longo do ano, já na população localizada no lago, o processo reprodutivo foi restrito aos

períodos de primavera e verão (Mazzoni e Iglesias-Rios, 2002). Essas modificações podem ser mais ou menos plásticas dependendo da espécie e, representam uma resposta homeostática para minimizar os custos das flutuações ambientais (Agostinho *et al.*, 2007). Esse parece ser o caso do gênero *Astyanax*, pois muitos estudos têm demonstrado a alta plasticidade reprodutiva desta espécie, alterando as táticas reprodutivas de acordo com as características do ambiente, sendo que as fêmeas em ambientes represados e/ou poluídos parecem exibir desova do tipo parcelada (Giamas *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2011).

Além das análises do IGS, foram analisados os valores de IHS nos animais deste estudo, pois o fígado é um órgão que possui um papel crucial na reprodução, devido a sua característica de armazenamento de lipídeos e glicogênio, além de ser o local onde a molécula de vitelogenina é sintetizada. Diante destes fatos, considera-se que os valores de IHS podem auxiliar no entendimento dos processos de formação e mobilização dos substratos energéticos para a vitelogênese. Ao contrário do IGS, os valores de IHS não se alteraram, diferente também do encontrado na literatura. No mesmo estudo de Prado *et al.*, (2011) já mencionado, as fêmeas de *A. fasciatus* coletadas nos ambientes poluídos apresentaram valores mais elevados de IHS em comparação aos animais do ambiente não poluído. Além disso, estes animais apresentaram valores médios deste índice $\leq 1\%$, enquanto as fêmeas utilizadas no presente trabalho apresentaram valores em sua maior parte acima de 1%. Diferentes trabalhos apontam que o IGS e o IHS são indicadores de saúde dos peixes (Hinck *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2011). Hinck *et al.*, (2007) mencionam que os valores normais de IHS em peixes estão entre 1 e 2%. Em um trabalho com carpa comum, Hinck *et al.* (2007) encontraram valores menores que os mencionados nos animais localizados no rio poluído, sendo isso atribuído à uma grande quantidade de parasitas.

Diante destas informações para os dois índices, os resultados obtidos não dão uma sustentação para sugerir que as diferenças encontradas no IGS entre os dois ambientes estão relacionadas à presença de poluentes na Billings e sim, possivelmente, pela diferença das populações, suas histórias de vida e características e tempo de cada reservatório. Isso pode ser corroborado com o que foi observado nas análises dos ovários, nas quais a predominância de oócitos maduros durante todo o ano, seguido de perinucleolar e de oócitos atresícos e ausência folículos pós-ovulatórios nas fêmeas de ambos os reservatórios, demonstram que essas populações apresentam uma alta taxa de produção de oócitos maduros o ano inteiro, independente do ambiente estudado.

5.3.2 Reprodução do lambari no presente contexto

As táticas reprodutivas dependem da interação entre o ambiente e as respostas genéticas, fisiológicas, comportamentais e ecológicas de cada indivíduo para manifestar a sua estratégia reprodutiva (Potts e Wootton, 1984). *A. fasciatus* é conhecido, em ambiente natural, por apresentar desovas múltiplas em um período reprodutivo definido (Barbieri *et al.*, 1982; Mora-Jamett *et al.*, 1997; Gurgel, 2004; Hirt *et al.*, 2011). No entanto, muitos estudos têm demonstrado a alta plasticidade reprodutiva do lambari, alterando as táticas reprodutivas de acordo com as características do ambiente, sendo que as fêmeas em ambientes represados e/ou poluídos parecem exibir desova do tipo parcelada (Silva *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2011). No presente estudo, os dados da histologia e fecundidade não suportaram a hipótese que essas populações apresentam esse tipo de desova, independente do ambiente, mas sim o desenvolvimento oocitário em dois grupos como descrito a seguir.

Vazzoler (1996) define quatro tipos de desenvolvimento oocitário para determinar o tipo de desova. Aqui são apresentados três tipos: Sincrônico em grupo: no período de reprodução observa-se um lote de oócitos que irão maturar sincronicamente e serão eliminados no período de desova e oócitos de reserva; Sincrônico em dois grupos: a cada período de reprodução evidenciam-se dois lotes de oócitos nos ovários, os oócitos de reserva e aqueles que irão maturar sincronicamente e serem eliminados no período de desova; Sincrônico em mais de dois grupos: neste, ao lado do lote de oócitos do estoque de reserva, evidenciam-se lotes oocitários em distintas fases de desenvolvimento, sendo que os oócitos que compõem cada lote se desenvolvem sincronicamente e, à medida que aqueles do lote mais desenvolvido atingem a maturação completa, são eliminados. No presente estudo, as figuras 21 e 22 apresentaram as porcentagens de frequência dos diâmetros dos oócitos que apontam para um desenvolvimento oocitário do tipo sincrônico em grupo.

5.3 Análise de WoE

A WoE foi desenvolvida para disponibilizar uma caracterização multidisciplinar que combine diferentes estudos e linhas de evidências (LOEs), entre eles as análises químicas tradicionais que são integradas com estudos de laboratório e de ambiente natural afim de avaliar os poluentes biodisponíveis, a(s) espécie(s) escolhida(s) e o início dos efeitos adversos de um nível molecular à organismal e deste para a comunidade (Chapman *et al.*, 2002; Chapman e Hollert, 2006; Chapman, 2007; Dagnino *et al.*, 2008; Benedetti *et al.*, 2012). A avaliação de biomarcadores a serem utilizados no LOE, como por exemplo, o etoxiresorufina O-desetilase (EROD), metalotioneína (MT), metabólitos aromáticos na bile, acetil-CoA oxidase (AOX), acetilcolinesterase (AChE); as enzimas antioxidantes como catalase, glutathione peroxidases (GPx) e superóxido desmutase (SOD), são utilizados regularmente em trabalhos que visam avaliar o WoE. No presente trabalho, essas análises não foram feitas, pois seria difícil realizar uma comparação entre as duas populações em ambiente natural e mencionar que possíveis diferenças seriam devido à influência do ambiente. No entanto, estudos em laboratório podem ser utilizados para verificar se os agentes químicos observados no reservatório Billings interferem realmente nos processos de ajustes homeostáticos de *A. fasciatus*. Piva *et al.* (2011) elaboraram um modelo de risco para sedimento, no qual os LOEs foram separados em 4 grupos: Linha de evidência 1: química do sedimento; Linha de evidência 2: biodisponibilidade; Linha de evidência 3: biomarcadores; Linha de evidência 4: análise de laboratório. Pelos resultados obtidos através das quatro LOE foi feito um cálculo afim de integrar as linhas e realizar a análise do WoE. Seus dados mostraram que a biodisponibilidade dos compostos tem mais peso que a presença do composto no sedimento. Da mesma forma, os autores concluíram que os dados dos efeitos biológicos agudos (bioensaio) tiveram um maior peso em relação aos dados moleculares (biomarcadores).

No presente trabalho não foi possível realizar tal cálculo, pois, sendo um estudo precursor dos efeitos da poluição do reservatório Billings na reprodução de *A. fasciatus*, só foram realizadas análises no ambiente natural, o que impossibilita a realização dos grupos de LOE desenvolvidos por Piva *et al.* (2011). No entanto, é possível verificar pelo sistema lógico de determinação que os metais apresentaram o alto índice de risco, no entanto como já mencionado anteriormente deve-se levar em consideração a

biodisponibilidade desses compostos, como observado por Piva *et al.* (2011). Quanto às variáveis fisiológicas é possível que haja um risco, devido à presença dos metais e de outros componentes presentes na água do reservatório Billings, no entanto esse risco não é alto para prejudicar o desempenho reprodutivo envolvido com o processo de síntese de VTG e a vitelogenese. Os dados de concentração plasmática de estradiol, expressão gênica hepática da vitelogenina em machos e fêmeas, assim como a fecundidade nas fêmeas de *A. fasciatus* apontam que pequenas modificações nas concentrações e biodisponibilidade de alguns compostos, ou ainda no MoA dos poluentes presentes no reservatório, possam comprometer o processo reprodutivo da população.

6- Considerações Finais

Em trabalhos realizados apenas em ambiente natural é impossível avaliar todas as variáveis presentes, desta forma, as conclusões que os resultados encontrados nos permitem, não podem ser consideradas como definitivas. No entanto, é por meio deste tipo de estudo que se pode conhecer com mais profundidade o ambiente e assim elaborar e realizar planos de ensaios em laboratório, e também em campo, para avaliar melhor o que ocorre no local. Diante do exposto e considerando os dados aqui analisados, conclui-se que no reservatório Billings vários compostos estão acima da especificação da resolução CONAMA/357 em algumas estações do ano, mas este fato parece não estar prejudicando os processos fisiológicos associados à maturação oocitária de *A. fasciatus*. No entanto, é necessário ressaltar que estes compostos, juntos ou separados, ou ainda, as condições ambientais encontradas na Billings, nas diferentes estações do ano, alteraram alguns biomarcadores relacionados ao processo de síntese de VTG e da formação do oócito. Esta informação pode ser muito importante para a formulação de uma análise de risco, pois pode auxiliar a evitar possíveis problemas futuros com esta espécie e outras presentes no reservatório, além de permitir o entendimento dos mecanismos adotados por espécies plásticas que garantem a sua sobrevivência em um ambiente poluído.

Não foi possível avaliar os mecanismos que levaram aos resultados aqui encontrados, ou saber quais compostos desencadearam estas respostas, ou ainda como se dá seu modo de ação. Na verdade, a obtenção destas respostas não eram objetivo

deste trabalho. Para responder à estas questões, sugere-se a elaboração de experimentos que utilizem as informações aqui obtidas e a partir daí sejam conduzidas análises laboratoriais (bioensaios) para avaliar efeito das substâncias presentes na água, seu possível modo de ação, toxicidade e uma investigação dos seus mecanismos partindo do nível molecular para o nível de espécie e daí para a comunidade. Desta maneira, será possível conduzir políticas que visem à atenuação ou a prevenção de risco aos ambientes. Além disso, esse trabalho levanta possibilidades para que as agências reguladoras brasileiras incentivem ainda mais estudos ecotoxicológicos com diferentes espécies, presentes nos diferentes nichos ecológicos e em vários níveis tróficos, visando entender e realizar com mais profundidade resoluções mais específicas para ecossistemas, regiões e sistemas como é o caso do complexo Billings.

7 - Referências Bibliográficas

- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Pelicice, F.M. 2007. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. UEM, Maringá.
- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Pelicice, F.M. 2007. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. UEM, Maringá.
- Agostinho, C.A., 1982. Ciclo reprodutivo de machos do lambari *A. bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Osteichthyes – Characidae) no rio Ivá, do estado do Paraná. In: Reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Campinas Anais. Campinas: SBPC, 3-566.
- Alberto, A., Camargo, A.F.M., Verani, J.R., Costa, O.F.T., Fernandes, M.N., 2005. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, 247–255.
- Almeida, G.A. 2003. Identificação de Poluentes Orgânicos na Represa Billings – São Paulo. Dissertação de doutorado. Instituto de Química Pesquisa, Universidade de São Paulo, São Paulo, 98.
- Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Grimme, L.H., 1996. Regulations for combined effects of pollutants: consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 1155-1157.
- Ankley, G., Mihaich, E., Stahil, R., Tlitt, D., Coloborn, T., McMaster, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Dickerson, R., Folmar, L., Fry, M., Giesy, J., Gray, L.E., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., LeBlanc, G., Mayes, M., Nimrod, A., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., Kraak, G.V.D., Zacharewski, T. 1998. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicological and Chemistry*, 17, 68-87.
- Baird, D.J., Maltby, L., Greig-Smith, P.W., Douben, P.E.T. (Eds.). 1996. *ECOTOXICOLOGY: Ecological Dimensions*. Chapman and Hall, London.
- Barbieiri, G.; Hartz, S.; Verani, J.R. 1996. O fator de condição e índice hepatossomático como indicadores do período de desova de *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819, da

- Represa do Lobo, São Paulo (Osteichthyes, Characidae). Iheringia: Serie Zoologia, 81, 97-100.
- Barbieri, G., Santos, M.V., Santos, J.M. 1982. Época de reprodução e peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). Pesquisa Agropecuária Brasileira, 7, 1057 – 1062.
- Barbieri, G.; Barbieri, M.C. 1988. Curva de maturação, tamanho de primeira maturação gonadal e fecundidade de *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 e *Astyanax fasciatus*, Cuvier, 1819, da Represa do Lobo, Estado de São Paulo (Osteichthyes, Characidae). Revista Ceres, Viçosa, 35, 64-77.
- Baxter, R. M., 1977. Environmental effects of dams and impoundments. Annual Review in Ecology and Systematics, 8, 255-283.
- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART – São Paulo Livraria Editora, Editora da Universidade de São Paulo. 241p.
- Benaduce APS, Kochhann D, Flores EMM, Dressler VL, Baldisserotto B. 2008. Toxicity of cadmium for silver catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) embryos and larvae at different alkalinities. Archives Environmental Contamination Toxicology. 54:274–282.
- Benedetti, M., Ciapriani, F., Piva, Francesco, Onorati, F., Fattorini, D., Notti, A., Ausili, A., Regoli, F. 2012. A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. Environment International, 38, 17–28.
- Beyer, J., Petersen, Karina, Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T., Tollefsen, K.E. 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. Marine Environmental Research, 96, 81-91.
- Brack, W., Klammer, H.J.C., de Ada, M.L., Barcelo, D., 2007. Effect-directed analysis of key toxicants in European river basins e a review. Environmental Science and Pollution Research, 14, 30-38.

- Brack, W., Schirmer, K., 2003. Effect-directed identification of oxygen and sulfur heterocycles as major polycyclic aromatic cytochrome P450A-Inducers in a contaminated sediment. *Environmental Science & Technology*, 37, 3062-3070.
- Burgess, R.M., Ho, K.T., Brack, W., Lamoree, M., 2013. Effects-directed analysis (EDA) and toxicity identification evaluation (TIE): complementary but different approaches for diagnosing causes of environmental toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 1935-1945.
- Burton, G.A., Batley, G.E., Chapman, P.M., Forbes, V.E., Smith E.P., Reynoldson, T., Schlekot, C.E., den Besten, P.J., Bailer, J.A. 2002. A Weight-of-Evidence Framework for Assessing Sediment (Or Other) Contamination: Improving Certainty in the Decision-Making Process. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8, 1675-1699.
- Caldwell, D.J., Mastrocco, F., Anderson, P.D., Länge, R., Sumpter, J.P. 2012. Predicted-No-Effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -Estradiol, Estriol e 17 α Ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 1396-1406.
- Cao L, Huang W, Liu J, Yin X, Dou S. 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry Physiology C*. 151:386–392
- Cao, Z., Zhang, X., Al, N. 2011. Effect of sediment on concentration of dissolved phosphorus in the Three Gorges Reservoir. *International Journal of Sediment Research*, 26, 87-95.
- Carmichael, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. *The Journal of Applied Bacteriology*. 72, 445-459.
- Carrasco-Letelier, L., Eguren, G., Mello, F.T., Groves, P.A., 2006. Preliminary field study of hepatic prophyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define anthropogenic pollution. *Chemosphere*, 62, 1245-1252.
- Caux, P.Y., Moore, D.R.J., MacDonald, D. 1997. Ambient water quality guidelines (criteria) for turbidity, suspended and benthic sediments: Technical appendix. Prepared for BC Ministry of Environmental, Land and Parks (now called Ministry of Water, Land Air Protection).

- CETESB, 2013. (<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes-/relatorios>). Relatório de Resultados dos parâmetros e indicadores de qualidade da água, Reservatório Billings. Acessado em 11/08/2013.
- CETESB, 2015. (<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/32/2013/11/agua-doce-partel-corrigido.pdf>). Relatório de Resultados dos parâmetros e indicadores de qualidade da água, Reservatório Billings. Acessado em 24/05/2016.
- Chapman PM, Hollert H. 2006. Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad? *Journal of Soils and Sediments*, 6, 4–8.
- Chapman PM. 2007. Determining when contamination is pollution—weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International*, 33, 492–501.
- Chapman, P.M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 7–15.
- Chapman, P.M., McDonald, B.G. & Lawrence, G.S. 2002. Weight-of-evidence issues and frameworks for sediment quality (and other) assessments. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8, 1489–1515.
- Cormier, S.M., Paul, J.F., Spehar, R., Shaw-Allen, P., Berry, W.J., Suter, G.W. 2008. Using Field Data and Weight of Evidence to Develop Water Quality Criteria. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4, 490-504.
- Correia, T.G., Narcizo, A.M., Moreira, R.G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 151, 461-466.
- Dagnino A., Sforzini S., Dondero F., Fenoglio S., Bona E., Jensen J. 2008. A “Weight-of Evidence” approach for the integration of environmental “Triad” data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4, 314–26.
- Davis, L.K., Hiramatsu, N., Hiramatsu, K., Reading, B.J., Matsubara, T., Hara, A., Sullivan, C.V., Pierce, A.L., Hirano, T., Grau, E.G., 2007. Induction of three vitellogenins by 17-beta-estradiol with concurrent inhibition of the growth

- hormone-insulin-like growth factor-I axis in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Biology of Reproduction*, 77, 614–625.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C. 1994. The role of biomarkers in environmental assesement (2). *Invertebrates. Ecotoxicology*, 3, 161-172.
- Dias, J.F.E., Peres-Rio, P.T.C., Chaves, C.L.D.B., Wonctschowski, R. 1998. Análise Macroscópica dos Ovários de Teleósteos: Problemas de Classificação e Recomendações de Procedimentos. *Revista Brasileira de Biologia*, 58, 55–59.
- Driessnack, M.K., Matthews, AL., Raine, J.C., Niyogi, S. 2016. Interactive effects of chronic waterborne copper and cadmium exposure on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 179 165–173.
- Elliott, M. 2003. Introduction and Conceptual Model. *In*: Lawrence, A.J., Hemingway, K.L. *Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses*. Blackwell, Bodmin, Cornwall, 376p.
- Finn, R.N., 2007. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins. *Biology of Reproduction*, 76, 926-935.
- Foran, C.M., Peterson, B.N., Benson, W.H., 2002. Influence of parental and developmental cadmium exposure on endocrine and reproductive function in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 345–354.
- Géry, J. 1977. *Characoids of the world*. Neptune city, T.F.H. Publications Inc, 672p.
- Giamas, M.T.D.; Campos, E.C.; Câmara, J.J.C.; Vermulm Jr., H.; Barbieri, G. 2004. A ictiofauna da represa de Ponte Nova, Salesópolis (São Paulo) – Bacia do Alto Tietê. *Boletim do Instituto de Pesca*, 30, 25-34.
- Godoy, M.P. 1959. Age, growth, sexual maturity, behavior, migration, tagging and transplantaion of curimbatá (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881) of Mogi Guassú river, São Paulo State, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, São Paulo, 31, 447-477.

- Goldoni, M., Johansson, C., 2007. A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicology in Vitro*, 21, 759-769.
- Gomes, A.D., Tolussi, C.E., Boëchat, I.G., Pompêo, M.L.M., Cortez, M.P.T., Honji, R.M., Moreira, R.G. 2016. Fatty Acid Composition of Tropical Fish Depends on Reservoir Trophic Status and Fish Feeding Habit. *Lipids*, doi: 10.100, p. 10.1007/s11745.
- Gomes, A.O., Honji, R.M., Tolussi, C.E., Ribeiro, C.S., Moreira, R.G. 2015. The role of ovarian steroids in reproductive plasticity in *Hoplias malabaricus* (Teleostei: Characiformes: Erythrinidae) in tropical reservoirs with different degrees of pollution. *General and Comparative Endocrinology*, 222, 1-10.
- Greco, W.R., Bravo, G., Parsons, J.C. 1995. The search for synergy e a critical-review from a response-surface perspective. *Pharmacological Reviews*, 47, 331-385.
- Gurgel, H.C.B. 2004. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Curvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21, 131-135.
- Hanmer, R.W., e Newton, B.J. 1984. Utility of effluent toxicity tests from the U.S. Regualtory perspective. *In: Proceedings of the International Workshop on Biological Testing of Effluents*. OECD, Duluth (USA), 367p.
- Hansen, J.A.,Welsh, P.G., Lipton, J., Suedkamp,M.J., 2002. The effects of long-term cadmium exposure on the growth and survival of juvenile bull trout (*Salvelinus confluentus*). *Aquatic Toxicology*, 58, 165–174.
- Hecker, M., Giesy, J.P. 2011. Effect-directed analysis of Ah-receptor mediated toxicants, mutagens, and endocrine disruptors in sediments and biota. *In: Brack, W. (Ed.), Effect-directed Analysis of Complex Environmental Contamination. The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, Berlin Heidelberg. 285, 313.
- Hecker, M., Hollert, H. 2009. Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 607-613.

- Hinck, J. E., Blazer, V.S., Denslow, N. D., Echols, K. R., Gross, T. S., May, T. W., Anderson, P. J., Coyle, J. J., Tillitt, D.E. 2007. Chemical Contaminants, health Indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries. *Science of the Total Environment*, 378, 376-402.
- Hirt, L.M.; Araya, P.R.; Flores, S.A. 2011. Population structure, reproductive biology and feeding of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) in an Upper Paraná River tributary, Misiones, Argentina. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 23, 1-12.
- Honji, R.M., Vaz dos Santos, A.M., Rossi-Wongtschowski, C.L.D.B., 2006. Identification of the stages of ovarian maturation of the Argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. *Neotrop. Ichthyol.* 4, 329–337.
- Jalabert, B. 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutritional Development*, 45, 261–279.
- Kida, B.M.S., Abdalla, R.P., Moreira, R.G.M. 2016. Effects of acidic water, aluminum, and manganese on testicular steroidogenesis in *Astyanax altiparanae*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 1347-1356.
- Koelmans, A. A., Gillissen, F., Lijklema, L. 1995. Influence of Salinity and Mineralization on Trace Metal Sorption to Cyanobacteria in Natural Waters. *Water Research*, 30, 853-864.
- Lamparelli, M.C., Tucci, A., Sant’Anna, C.L., Pires, D.A., Lerche, L.H.M., Carvalho, M.C., Rosal, C. 2014. Atlas de Cianobactérias da Bacia do Alto Tietê.
- Lim, E.H., Teo, B.Y., Lam T.J., Ding J.L., 2001. Sequence analysis of a fish vitellogenin cDNA with a large phosphatidyl domain. *Gene*, 277, 175–186.
- Lizardo-Daudt, H.M., Bains, O.S., Singh, C.R., Kennedy, C.J., 2008. Cadmium chloride induced disruption of testicular steroidogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 103–110.
- Lubzens E., Young G., Bode, J., Cerdà, J. 2009. Oogenesis in teleosts: How fish are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 367-389
- Marceniuk, A.P.; Hilsdorf, A.W.S. 2010. Peixes das cabeceiras do Rio Tietê e Parque das Neblinas. Ócsso Design, São Paulo, 160p.

- Mariani, C.F.; Moschini-Carlos, V.; Brandimarte, A.L.; Nishimura, P.Y.; Tófoli, C.F.; Duran, D.S.; Lourenço, E.M.; Braidotti, J.C.; Almeida, L.P.; Fidalgo, V.H. e Pompêo, M.L.M. 2006. Biota and water quality in the Riacho Grande reservoir, Billings Complex (São Paulo, Brazil). *Acta Limnologica Brasileira*, 18, 267-280.
- Mariani, C.F.; Pômpeo, M.L.M. 2008. Potentially bioavailable metals in sediment from a tropical polymictic environment Rio Grande Reservoir, Brazil. *Journal Soils and Sediment*, 8, 248-288.
- Martin, C.W., 2000. Heavy metal trends in flood plain sediments and valley fill, river Lahn, Germany. *Catena*, 39, 53–68.
- Mazzoni, R.; Iglesias-Rios, R. 2002. Environmentally related life history variations in *Geophagus brasiliensis*. *Journal of Fish Biology*, 61, 1606–1618.
- McEwen, B.S.; Wingfield, J.C., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43, 2–15.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., Gordon McDonald, D., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology*, 50, 245–256.
- Mebane, C.A., Hennessy, D.P., Dillon, F.S., 2008. Developing acute-to-chronic toxicity ratios for lead, cadmium, and zinc using rainbow trout, a mayfly, and a midge. *Water, Air, & Soil Pollution*, 188, 41–66.
- Menge, B.A., 2000. Top–down and bottom–up community regulation in marine rocky intertidal habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 250, 257–289.
- Miller, D.H., Jensen, K.M., Villeneuve, D.L., Kahl, M.D., Makynen, E.A., Durhan, E.J., Ankley, G.T. 2007. Linkage of Biochemical responses to population-level effects: A case study with vitellogenin in the Fathead minnow (*Pimephales Promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 521-527.
- Monteiro, N., Belzunce-Segarra, M.J., Gonzalez, J.L., Garmendia, J.M., Etxebarria, N., Nieto, O., Franco, J. 2013. Application of Toxicity Identification Evaluation (TIE) procedures for the characterization and management of dredged harbor sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 71, 259-268.

- Mora-Jamet, M.; Cabrera, J.; Alvarado, W. 1997. Crecimiento y maduración sexual de *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characidae) en el embalse arenal, Guanacaste, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 45, 855-859.
- Moschini-Carlos, V.M; Freitas, L.G.; Pômpeo, M. 2010. Limnological evaluation of water in the Rio Grande and Taquacetuba branches of the Billings Complex (São Paulo, Brazil) and the management implications. *Ambi-água*, Taubaté, 5, 47-59.
- Nishi, K., Chikae, M., Hatano, Y., Mizukami, H., Yamashita, M., Sakakibara, R., Tamiya, E. 2002. Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 132, 161–169.
- Niyogi, S., Wood, C.M. 2004. Kinetic analyses of waterborne Ca and Cd transport and their interactions in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and yellow perch (*Perca flavescens*), two species differing greatly in acute waterborne Cd sensitivity. *Journal of Comparative Physiology Part B*, 17, 243–253.
- Oliveira, T.A. 2012. Metais presentes na água e em tecidos de peixes da represa Billings: uma avaliação temporal. Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 215p.
- Pane, E.F., Haque, A., Goss G.G., Wood, C.M. 2004b. The physiological consequences of exposure to chronic, sublethal waterborne nickel in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): exercise vs. resting physiology. *Journal of Experimental Biology*, 207, 1249–61.
- Pane, E.F., Haque, A., Wood, C.A. 2004a. Mechanistic analysis of acute, Ni-induced respiratory toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an exclusively branchial phenomenon. *Aquatic Toxicology*, 69, 11–24.
- Penglasea, S., Hamrea, K., Ellingsena, S. 2014. Selenium and mercury have a synergistic negative effect on fish reproduction. *Aquatic Toxicology*, 149, 16–24.
- Piva F., Ciaprini F., Onorati F., Benedetti M., Fattorini D., Ausili A. 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: a practical model to elaborate data from sediment chemistry,

- bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere*, 83, 475–85.
- Potts, G.W.; Wootton, R.J. 1984. *Fish reproduction: Strategies and Tactics*. London, Academic Press, 410p.
- Prado, S. P., Souza, C. C., Bazzoli, N., Rizzo, E. 2011. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1879–1887.
- Quintero-Hunter, I., Grier, H., Muscato, M. 1991. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotechnic & Histochemistry*, 66, 169–172.
- Rand, G.M. 1995. *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment*. Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC, 1125p.
- Repavich, W., Sonzogni, W., Standridge, J. H., Wedephol, R. E., Meisner, L. F., 1989. Cyanobacteria (Blue-Green Algae) in Wisconsin Waters: Acute and Chronic Toxicity, 24, 225-231.
- Reynders, H., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W.M., Blust, R., 2006. Dynamics of cadmium accumulation and effects in common carp (*Cyprinus carpio*) during simultaneous exposure to water and food (*Tubifex tubifex*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1558–1567.
- Rodrigues, L.L., Sant'Anna, C.L., Tucci, A. 2010. Chlorophyceae das Represas Billings (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 33, 247-264.
- SABESP. 2014. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. Complexo metropolitano de distribuição de água. SABESP, São Paulo. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/interna/Default.aspx?secaoId=36>> . Acesso em 16 de março de 2016.
- Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 549-556.

- Schroeder-Araujo, L.T. 1980. Alimentação dos peixes da represa de Ponte Nova, Alto Tietê. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 88p.
- Schulz, U.H., Martins-Júnior, H., 2001. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. Brazilian Journal of Biology, 61, 615-622.
- Sellin, M.K., Kolok, A.S., 2006. Cd exposures in fathead minnows: effects on adult spawning success and reproductive physiology. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51, 594–599.
- SETAC <https://www.setac.org/?page=History>. Acessado dia 29/02/2016
- Silva, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2007. Activity of xenoestrogens at nanomolar concentrations in the E-screen assay. Environmental Health Perspectives, 115, 91–97.
- Silva, J.P.A., Muelbert, A.E., Oliveira, E.C., Fávaro, L.F. 2010. Reproductive tactics used by the lambari *Astyanax aff. fasciatus* in three water supply reservoirs in the same geographic region of the upper Iguaçu River. Neotropical Ichthyology, 8, 885-892.
- Smylie, M.S., McDonough, C.J., Reed, L.A., Shervette, V.R. 2016. Mercury bioaccumulation in an estuarine predator: Biotic factors, abiotic factors, and assessments of fish health. Environmental Pollution, 214, 169-176.
- Stoica, A., Katzenellenbogen, B.S., Martin, M.B., 2000. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. Molecular Endocrinology, 14, 545–553.
- Suhnel, J. 1998. Parallel dose response curves in combination experiments. Bulletin of Mathematical Biology, 60, 197-213.
- Sumpter, J.P., e Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives, 103, 173-178.
- Sun, h., Wu, W., Guo, J., Xiao, R., Jiang, F., Zheng, L., Zhang, G. 2016. Effects of nickel exposure on testicular function, oxidative stress, and male reproductive dysfunction in *Spodoptera litura Fabricius*. Chemosphere, 148, 178 e 187.

- Synkowska, M.I., Pawlaczyk, A. 2014. Este artigo é uma revisão da edição de um artigo prévio de Chris Theodorakis. *Environmental Toxicology*, 2, 210-212.
- Tamate, T., Maekawa, K. 2000. Interpopulation variation in reproductive traits of female masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *OIKOS*, 90, 209-218.
- Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P. 1998. Endocrine Disruption in Wildlife - A Critical Review of the Evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 28, 319-361.
- USEPA, US Environmental Protection Agency. 2008. Contaminated sediment in water. Washington DC: USEPA. <http://epa.gov/waterscience/cs>. Acessado em 24/05/2016.
- USEPA, US Environmental Protection Agency. 2016. <http://www.epa.gov/risk/about-risk-assessment>. Acessado dia 29/02/2016
- Van der Oost, R., Beyer J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57- 149.
- Vázquez, G.R., Meijide, F.J., Da Cuña, R.H., Lo Nostro, F.L., Piazza, Y.G. Babay, P.A. Trudeau, V.L., Maggese, M.C. Guerrero, G.A., 2009. Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 298-306.
- Vazzoler, A.E.A.M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e Prática*. Ed. Nupelia, Maringá-PR, 169p.
- Vilella, F.S., Becker, F.G., Hartz, S.M. 2002. Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in an Atlantic Forest River in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42, 223-232.
- Wang, Y., Ferrari, M.C.O., Hoover, Z., Yousafzai, A.M., Chivers, D.P., Niyogi, S. 2014. The effects of chronic exposure to environmentally relevant levels of waterborne cadmium on reproductive capacity and behavior in fathead minnows. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 181–191.
- Wangsongsak, A., Utarnpongsa, S., Kruatrachue, M., Ponglikitmongkol, M., Pokethitiyook, P., Sumranwanich, T. 2007. Alterations of organ histopathology

and metallothionein mRNA expression in silver barb, *Puntius gonionotus* during subchronic cadmium exposure. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 1341–1348.

Waters, T.F. 1995. Sediment in streams—Sources, biological effects and control. American Fisheries Society Monograph 7. Bethesda (MD): American Fisheries Society. 251p.

WCD, World Commission on Dams, 2000. Dams and development: a new framework for decision-making. The report of the World Commission on Dams. London; Sterling: Earthscan Publishing. 404p.

Wood, P.J., Armitage PD. 1997. Biological effects of fine sediment in the lotic environment. *Environmental Manager*. 2, 203–217.

Yaron, Z., Sivan, B. 2006. Reproduction. *In*: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Ed). *The Physiology of Fishes*. Taylor and Francis. 601p.

Zagatto, P.A. 2006. Ecotoxicologia. *In*: Zagatto, P.A., Bertoletti, E. (Eds) *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMa, 1-2.

Zelikoff, J.T., Bowser, D., Squibb, K.S., Frenkel, K. 1995. Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 45, 235–248.

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 438–455.