MARÍA CARMEN ESCALANTE ROJAS

Fisiologia endócrina de peixes com diferentes estratégias reprodutivas em reservatórios poluídos

Endocrine physiology in fish with different reproductive strategies in polluted reservoirs

São Paulo

2019

MARÍA CARMEN ESCALANTE ROJAS

Fisiologia endócrina de peixes com diferentes estratégias reprodutivas em reservatórios poluídos

Endocrine Physiology in fish with different reproductive strategies in polluted reservoirs

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

São Paulo

2019

Ficha Catalográfica

Escalante Rojas, María Carmen

Efeitos de potenciais desreguladores endócrinos na fisiologia reprodutiva de teleósteos em reservatórios poluídos/ María Carmen Escalante Rojas; Orientadora Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton, São Paulo, 2019.

138 pág.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Desregulação endócrina. 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

Orientadora

Dedico este trabalho:

Ao meu pai Pedro, a minha família e a Deus, que sempre confiaram em mim e me apoiaram durante toda minha vida, com todo o amor e carinho, e não mediram esforços para me incentivar.

E a todos que se dedicaram a realizar parte desse trabalho.

Muito grata.

Science is not only a disciple of reason but, also, one of romance and passion.

A ciência não é apenas um discípulo da razão, mas também um romance e paixão.

Stephen Haking

- Tradução livre –

Agradecimentos

♥ A Deus por sempre atender às minhas preces, me encaminhando para as melhores decisões e por colocar anjos no meu caminho onde quer que eu esteja. Querido Deus, peço de tudo coração que o Senhor Hector, pai do meu querido Arthur e um segundo pai para mim, melhore e saia vitorioso do câncer, porque nossas vidas nunca serão as mesmas sem você; com todo amor agradeço ter conhecido-o e ter compartilhado muitos momentos lindos cheios de amor ao lado da sua família.

♥ A Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton pelo ótimo acolhimento, pela orientação atenciosa e paciente conduzida com grande competência. Pela amizade e preocupação maternais. Por representar um exemplo como profissional e pessoa, não hesitando em compartilhar seus conhecimentos e cedendo ótimas oportunidades para meu crescimento profissional. Por muitas vezes me fazer acreditar em mim mesma, dando crédito ao meu trabalho e opiniões.

♥ Ao Dr. Carlos Eduardo Tolussi, por toda ajuda neste processo como colaborador. Pelas horas de dedicação no laboratório e conhecimento compartilhado. Por todas as revisões, conversas e paciência nestes momentos.

♥ Ao meu amado pai, Vicente Pedro Escalante, pelo amor, conselhos e apoio incondicionais que serviram como alicerces para a minha trajetória e por sempre se fazer presente.

♥ A família Catunda, por todo o amor e por ter me acolhido como uma filha na sua casa. Estarei eternamente grata.

♥ Aos meus amados e fiéis amigos, Shellah Fuentes, Adrian Quintana, Arthur Amorim, Gabriel Teodoro, pelo carinho, conselhos, ensinamentos, companheirismo e mimos. Por me fazerem sentir acolhida, amada e segura longe da minha terra natal.

♥ Aos meus queridos amigos de república: Leonardo, Mona, Yasmin, Lucas, Elias, Benedito, Naty, Juan, Marcos, Abad, Adrian, Guillerme, Camila, Pedro, João e Alberto pelo carinho, por me passar tranquilidade e pela ótima convivência.

♥ Aos amigos Brayan Campos, Ruy Chacón, Carlos Enrique, pela atenção e auxílio incondicionais durante todo o mestrado.

♥ Aos colegas de laboratório LAMEROA, Aline, Fernanda, Natália, Valquíria, Bianca Rangel, Victoria Frachetta, Joseane Silva, Marcela Muñoz, Gabriela Brambila, Giovana Branco, Cecília Bertacini, Ethiene Fernandes, Paulo, Bruno Araujo, Bruno Marotta,

Carlos Tolussi, Filipe Godoi, João Paulo Silva, Renato Honji, Victor Marques, Kainã Fagundes, pelo convívio agradável e apoio.

♥ Aos professores Zulma F. Da Silva, Débora Rejane Fior Chadi, Aline Maria da Silva e aos colegas desses laboratórios por gentilmente compartilharem aparelhos e reagentes.

♥ A querida Layla Farage pela amizade, pelas conversas, aconselhamentos e por me auxiliar em várias análises de expressão gênica no laboratório no IQUSP.

♥ Ao apoio técnico, amizade e grande carinho de Vagner.

♥ Ao CNPq pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho através da bolsa de mestrado (133759/2017-2). Á FAPESP pelos auxílios financeiros (Projeto Temático 2014/16320-7 e Auxílio Regular 2017/11530-1) e à CAPES pela verba PROAP. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia Geral) e ao Instituto de Biociências, pela atenção e presteza.

Muito obrigada!

María

Índice

Lista de abreviações **10**

Lista de ilustrações **12**

Lista de tabelas **15**

Resumo geral **16**

General abstract **18**

Introdução Geral e Objetivos **19**

Introdução geral 19

Objetivo geral 31

Área de estudo 32

Espécies estudadas 35

Referências Bibliográficas 36

Capítulo 1 – Caracterização limnológica de três reservatórios com diferentes graus de trofia

Resumo 47

Abstract..... 48

Introdução 49

Objetivo específico 50

Materiais e Métodos 50

Resultados 53

Discussão 56

Conclusões 58

Referências Bibliográficas 59

Capítulo 2 – Uso integrado de biomarcadores no estudo da fisiologia reprodutiva de machos de *Astyanax fasciatus* em reservatórios poluídos

Resumo 63

Abstract..... 64

Introdução 65

Objetivo específico 67

Materiais e Métodos 67

Resultados 75

Discussão 82

Conclusões 86

Referências Bibliográficas 87

Apêndices 94

Capítulo 3 – Uso integrado de biomarcadores no estudo da fisiologia reprodutiva de machos de *Hoplias malabaricus* em reservatórios poluídos

Resumo 95

Abstract..... 97

Introdução 99

Objetivo específico 100

Materiais e Métodos 101

Resultados 106

Discussão 116

Conclusões 120

Referências Bibliográficas 121

Apêndices 127

Discussão geral

Discussão geral 128

Conclusões e considerações finais 132

Referências bibliográficas 134

Lista de abreviações

11-kt - 11 cetotestosterona

DNA - ácido desoxiribonucleico.

DNase - desoxiribonuclease.

cDNA - DNA complementar.

ANOVA - análise estatística de variância

RNA - ácido ribonucleico.

mRNA - RNA mensageiro.

Bil – Reservatório Billings

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CETESB – Companhia Tecnológica de Saneamento Ambiental

Cl – clorofila – *a*

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

Ct - do inglês *cycle of threshold* (ciclo de início de amplificação exponencial).

dNTP - desoxinucleoídeo.

E - eficiência de reação do PCR em tempo real.

E2 - 17β - estradiol

EF1 - gene codificante para o fator de elongação.

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

***fshb*/FSH** - Gene/proteína para a subunidade beta do hormônio folículo-estimulante

FT - fósforo total

Gua - Reservatório Guarapiranga

IB-USP - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

IET - Índice do Estado Trófico

IGS - índice gonadossomático

IHS - índice hepatossomático

LAMEROA - Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos

M - molar.

NCBI - do inglês *National Center for Biotechnological Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica).

pb - pares de bases.

PCR – do inglês *polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase).

PN - Reservatório de Ponte Nova

RT-PCR - retrotranscrição e amplificação por PCR.

RMSP - Região Metropolitana de São Paulo

SABESP - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

T- testosterona

Taq - enzima polimerase de *Termus aquaticus.*

T m - do inglês *Temperature of melting* (temperatura de disociación)

Valor E - valor estatístico de significância de alinhamento das sequências de bases de dados no GenBank.

vtgA/VTG-A - Gene/proteína para a subunidade A da vitelogenina

Introdução Geral

Figura 1 – Fontes de alguns compostos desreguladores endócrinos no ecossistema aquático. Fonte: (Ismail *et al.*, 2017). 22

Figura 2 – Vias de exposição e efeitos dos desreguladores endócrinos nos organismos. Fonte: Modificado de Ismail *et al*., (2017) 23

Figura 3 – Mapa da Bacia Hidrográfica do Rio Tietê, destacando os reservatórios de (**A**) Ponte Nova, (**B**) Billings e (**C**) Guarapiranga. (Fonte: *google*.com) 32

Figura 4 – Mapa do reservatório Billings, destacando os braços de (**A**) Bororé e (**B**) Taquacetuba. (Fonte: google.com) 33

Figura 5 – Mapa do reservatório Guarapiranga, destacando os braços de (**A**) Embu-Guaçu e (**B**) Barragem. (Fonte: *google*.com) 34

Figura 6 – (**A**) *A. fasciatus*. Fonte: Galvis e Camargo (1997) e (**B**) *H. malabaricus*. Fonte: Sverlij (2002). O comprimento (média ± EPM) durante as coletas foi de 9,49 ± 0,30 cm para *A. fasciatus* e 35,92 ± 0,74 cm para *H. malabaricus*. 35

Capítulo 2

Figura 1 – Machos adultos de *A. fasciatus* coletados nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba) durante as estações de verão e inverno. (**A**) registro da massa total; (**B**) registro do comprimento total (**C**) coleta de sangue. 68

Figura 2 – Índices gonadossomático (**A**), Hepatossomático (**B**) nos machos adultos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno. Os dados estão expressões como média ± erro padrão da média. IGS e IHS não apresentam diferenças estatísticas após o teste de Tukey ($p > 0,05$). 75

Figura 3 – Análise histológica de testículos em *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno. **A**) Verão no reservatório PN; **B**) Verão no reservatório Bil (Bororé); **C**) Verão no reservatório Bil (Taquacetuba). **D**) Inverno no reservatório PN; **E**) Inverno no reservatório Bil (Bororé); **F**) Inverno no reservatório Bil (Taquacetuba). Apto à desova (**A**, **B**, **C** e **E**, **F**) e em regressão (**D**), mostrando redução da espermatogênese e espermatozoides residuais. Interstício (asterisco), espermatócitos (Et), espermatozoides (Ez) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estação. Escala: Barra: 25µm. 77

Figura 4 – Análise histológica dos testículos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova (referência) e impactados Billings. Mostrando a maior aumento o contraste entre as duas estações de inverno e verão. **A**) A fase de desova, verão no reservatório Bil (Taquacetuba); **B**) A fase de Inverno no reservatório PN e C) A fase desova, verão no reservatório PN. Espermatozoides (Ez), espermatozoides residuais (*) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estações. Escala: Barra: 25µm. 78

Figura 5 – Concentração plasmática de T (**A**), 11-kt (**B**) e E_2 (**C**) nos machos adultos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. *Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano (p< 0,05). [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas no mesmo ambiente nas duas estações (p< 0,05). 80

Figura 6 - Expressão relativa dos mRNAs para *fshb* (**A**) e *vtgA* (**B**) nos machos adultos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados no reservatório Ponte Nova (coluna branca). [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas no mesmo ambiente nas duas estações (p< 0,05). 81

Capítulo 3

Figura 1 – Machos adultos de *H. malabaricus* coletados nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba) durante as estações de inverno e verão. (**A**) registro da massa total; (**B**) registro do comprimento total e (**C**) coleta de sangue. 101

Figura 2 – Índices Gonadossomático (**A**), Hepatossomático (**B**) nos machos adultos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de inverno e verão. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. *Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano (p< 0,05). 106

Figura 3 – Análise histológica dos testículos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova (referência) e impactados Billings (Taquacetuba e Bororé) e Guarapiranga (Barragem e Embu-guaçu), durante as estações de inverno e verão. **A**) Inverno no reservatório PN; **B**) Inverno no reservatório Bil (Bororé); **C)** Inverno no reservatório Bil (Taquacetuba); **D**) Inverno no Reservatório Gua (Barragem); **E**) Inverno no Reservatório Gua (Embu-guaçu); **F**) Verão no reservatório PN; **G**) Verão no reservatório Bil (Bororé); **H**) Verão no reservatório Bil (Taquacetuba); **I**) Verão no Reservatório Gua (Barragem); **J**) Verão no Reservatório Gua (Embu-guaçu). A fase de desova (**B-D**, **F**, **G**, **I** e **K**), fase em desova (**A**, **E**, **H** e **J**), mostrando redução da espermatogênese. Interstício (asterisco),

espermatócitos (Et), espermatozoides (Ez) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estações, com excepção de PN (n = 2, no inverno e n = 3, no verão) e Bil (Taquacetuba) (n = 3, no verão). Escala: Barra: 25µm.Apto à desova (**A**, **B**, **C** e **E**, **F**) e em regressão (**D**), mostrando redução da espermatogênese e espermatozoides residuais. Interstício (asterisco), espermatócitos (Et), espermatozoides (Ez) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estação. Escala: Barra: 25µm. 110

Figura 4 – Análise histológica dos testículos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova (referência) e impactado Guarapiranga. Mostrando a maior tamanho o contraste entre as duas estações de inverno e verão. **A**) A fase de desova e fase em regressão no inverno no reservatório Gua (Barraguem); **B**) A fase de desova e fase em regressão no verão no reservatório Gua (Barraguem). Espermatozoides (Ez), espermatozoides residuais (*) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estações. Escala: Barra: 25µm. 111

Figura 5 – Concentração plasmática de T (**A**), 11-kt (**B**) e E_2 (**C**) nos machos adultos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de inverno e verão. Os dados estão expressões como média ± erro padrão da média. *Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano (p< 0,05). ^ab^Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas no mesmo ambiente nas duas estações (p< 0,05). 114

Figura 6 - Expressão relativa do mRNA para *fshb* (**A**) e *vtgA* (**B**), nos machos adultos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de inverno e verão. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados no reservatório Ponte Nova (coluna branca). *Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano (p< 0,05). ^ab^Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas no mesmo ambiente nas duas estações (p< 0,05). 115

Lista de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1 – Protocolos utilizados para análise de nutrientes totais, dissolvidos, sólidos em suspensão e clorofila-*a*. 51

Tabela 2 – Classificação do estado trófico (IET) em reservatórios segundo Lamparelli (2004). 52

Tabela 3 – Variáveis físico-químicas da água no centro dos reservatórios de Ponte Nova, nos pontos Embu-Guaçu (EG) e Barragem (Ba) do reservatório Guarapiranga e dos pontos Taquacetuba (Ta) e Bororé (Bo) do reservatório Billings (verão e inverno de 2017 e verão de 2018). 53

Tabela 4 – Concentração de sólidos totais, nutrientes e clorofila-*a* da água do centro dos reservatórios de Ponte Nova (PN), nos pontos Embu-Guaçu (EG) e Barragem (Ba) do reservatório Guarapiranga e dos pontos Taquacetuba (Ta) e Bororé (Bo) do reservatório Billings (verão e inverno de 2017 e verão de 2018). 54

Tabela 5 – Índice de Estado Trófico (IET) dos reservatórios de Ponte Nova (PN), dos pontos Embu-Guaçu (EG) e Barragem (Ba) do reservatório Guarapiranga e dos pontos Taquacetuba (Ta) e Bororé (Bo) do reservatório Billings (verão e inverno de 2017 e verão de 2018). 55

Capítulo 2

Tabela 1 – Relação dos *primers* para PCR convencional dos genes *fshb* e *vtgA* para *A. fasciatus*. Seja: F, forward e R, reverse. 72

Tabela 2 – Relação dos *primers*, tamanho do amplicon, replicabilidade da reação e eficiência de amplificação de transcritos analisados por RT-qPCR em *A. fasciatus*. Seja: F, *forward* e R, *reverse*. 73

Tabela 3 – Fases reprodutivas dos machos adultos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno. 76

Capítulo 3

Tabela 1 – Relação dos *primers* para PCR convencional dos genes *fshb* e *vtgA* para *H. malabaricus*. Seja: F, forward e R, reverse. 103

Tabela 2 – Relação dos *primers*, tamanho do amplicon, replicabilidade da reação e eficiência de amplificação de transcritos analisados por RT-qPCR em *H. malabaricus*. Seja: F, *forward* e R, *reverse*. 105

Tabela 3 – Fases reprodutivas dos machos adultos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de inverno e verão. 108

Os reservatórios estão permanentemente submetidos a inúmeras pressões ambientais, intensificação das atividades antrópicas e alterações biológicas que ocorrem devido à presença de poluentes, que podem atuar como desreguladores endócrinos (EDCs), alterando a fisiologia reprodutiva de peixes. Nos reservatórios da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) têm sido reportados processos de eutrofização e a presença de poluentes, produtos da antropização, dentre os quais se encontram diferentes tipos de substâncias que podem afetar a via esteroidogênica, atuando como EDCs, alterando a fisiologia reprodutiva de peixes. O objetivo do presente estudo foi utilizar diferentes biomarcadores para avaliar a fisiologia endócrina em machos de duas espécies de teleósteos, *Astyanax fasciatus* e *Hoplias malabaricus*, que apresentam diferentes estratégias reprodutivas, em reservatórios impactados da RMSP, em diferentes estações do ano. Estas espécies foram amostradas em três reservatórios da RMSP (Billings, Bil; Guarapiranga, Gua e Ponte Nova, PN) no inverno (2017) e no verão (2017 e 2018), e as seguintes análises foram realizadas: nutrientes na água, índices biológicos, como índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS), histomorfologia gonadal e biomarcadores fisiológicos, como níveis plasmáticos de testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-KT) e estradiol (E_2), bem como a expressão gênica da vitelogenina hepática (*vtg-A*) e da subunidade β do hormônio folículo estimulante (*fshβ*). A expressão gênica da *vtg-A* é um biomarcador de exposição a contaminantes estrogênicos, motivo pelo qual foram utilizados animais do sexo masculino, e as demais variáveis foram consideradas como biomarcadores de efeito biológico. Os reservatórios foram classificados em um gradiente de eutrofização partindo de mesotrófico (PN), eutrófico, supereutrófico e hipereutrófico (Bil e Gua). No reservatório de PN, considerado como referência, os biomarcadores analisados não diferiram entre as duas estações do ano. O padrão de alteração foi homogêneo nos biomarcadores de efeitos biológicos para ambas as espécies, no entanto, para o biomarcador de exposição (*vtg-A*) os resultados foram mais pronunciados em *H. malabaricus*, e no verão houve maior alteração dos andrógenos. Sugere-se que os EDCs influenciaram na expressão gênica de *fshβ*, principalmente no verão, e nos ambientes mais eutrofizados, aumentando a síntese de andrógenos nos machos de ambas as espécies, esteroides que também foram mais elevados no verão em alguns pontos da Bil e da Gua. De forma geral, as condições da água da Bil e Gua, impactadas pelas ações antrópicas interferiram com os biomarcadores de efeito biológico,

como E_2, e também alteraram o biomarcador de exposição, *vtg-A*, sendo os animais da Bil mais afetados.

Palavras-chave: Biologia reprodutiva, Biomarcadores, Desreguladores endócrinos, Impacto antrópico, Reservatórios.

The reservoirs are permanently subjected to numerous environmental pressures, intensification of anthropic activities and biological changes that occur due to the presence of pollutants, which can act as endocrine disruptors (EDCs), altering the reproductive physiology of fish. In the reservoirs of the Metropolitan Region of São Paulo (RMSP) eutrophication processes have been reported and the presence of pollutants, anthropogenic products, among which are different types of substances that can affect the steroidogenic route, acting as endocrine disrupters (EDCs), altering the reproductive physiology of fish. The objective of the present study was to use different biomarkers to evaluate endocrine physiology in males of two species of teleosts, *Astyanax fasciatus* and *Hoplias malabaricus*, which present different reproductive strategies, in different seasons of the year, in impacted reservoirs of RMSP. These species were sampled in three reservoirs of the RMSP (Billings, Bil, Guarapiranga, Gua and Ponte Nova, PN) in winter (2017) and summer (2017 and 2018), and the following analyses were carried out: nutrients in water, biological indexes, as hepatosomatic index (HSI) and gonadosomatic index (GSI), gonadal histomorphology and physiological biomarkers, such as testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT) and estradiol (E_2) plasma levels, as well as the gene expression of hepatic vitellogenin (*vtgA*) and the β subunit of follicle stimulating hormone (*fshβ*). The gene expression of *vtgA* is a biomarker of exposure to estrogenic contaminants, the reason why we anlayzed males, and the other variables were considered biomarkers of biological effects. The reservoirs were classified in a eutrophication gradient, as mesotrophic (PN), eutrophic, supereutrophic and hypereutrophic (Bil and Gua). In the PN reservoir, considered as a reference, the biomarkers analyzed did not differ between the two seasons. However, for the biomarker of exposure (*vtgA*) the results were more pronounced in *H. malabaricus*, and in the summer there was a greater alteration of androgen levels. It is suggested that EDCs influenced the gene expression of *fshβ*, mainly in the summer and in most eutrophic environments, increasing the androgen synthesis in males of both species, steroids that were also higher in summer in some points of Bil and Gua. In general, water conditions in Bil and Gua, impacted by anthropogenic actions, interfered with biomarkers of biological effects, as E_2, but also altered the exposure biomarker, *vtgA*, and animals from Bil were the most affected.

Key words: Reproductive biology, biomarkers, endocrine disruptors, anthropic impact, reservoirs.

1. Introdução geral

1.1. Efeitos da poluição no ambiente aquático

O aumento das atividades antrópicas no ambiente natural está levando a um intenso processo de degradação e contaminação dos corpos hídricos (Cropper e Griffiths, 2016). Como consequência, houve um aumento exponencial da disponibilidade de agentes químicos, tais como metais, hidrocarbonetos, pesticidas, além de contaminantes emergentes, que são substâncias químicas naturais que não são comumente monitoradas no ambiente, mas que têm o potencial de entrar no ambiente e causar efeitos adversos ecológicos e (ou) humanos, conhecidos ou suspeitos (Geissen *et al*., 2015) (não possuem regulamentação para monitoramento), entre outros, que são potencialmente tóxicos aos diferentes níveis de organização biológica (Shahidul-Islam e Tanaka, 2004; Murray *et al*., 2010; Corcoll *et al*., 2014; Sauvé e Desrosiers, 2014). Esses poluentes são liberados para o ambiente aquático por meio de diversas fontes, como por exemplo, tratamento de águas residuais, escoamento terrestre (atividades industriais, produtos farmacêuticos e lixo doméstico) e lixiviação. Estes poluentes estão contribuindo para a redução da qualidade dos diversos ambientes, bem como comprometendo a saúde dos seres vivos que habitam esses locais (Cajaraville *et al*., 2000). A exposição constante da biota aquática a essas substâncias tóxicas, potenciais desencadeadores de múltiplas alterações, pode desequilibrar a dinâmica das populações, comunidades e até mesmo do ecossistema como um todo, dependendo do grau de contaminação e tempo de exposição (Jesus e Carvalho, 2008).

A ênfase nos ecossistemas aquáticos deve-se principalmente ao fato de que muitos dos produtos químicos que afetam a reprodução são lipossolúveis e bioacumuláveis na cadeia alimentar aquática (Colborn e Clement, 1992; Colborn *et al*., 1993), e podem ter efeitos sobre o crescimento e reprodução dos indivíduos, em cascata, levando a mudanças nos níveis mais elevados de organização biológica, populações e comunidades (Kidd *et al*., 2007) com grande relevância biológica e toxicológica (Van Der Oost, 1998). Os organismos com níveis tróficos superiores geralmente têm frequência reprodutiva menor, sendo mais susceptíveis aos efeitos de poluentes que agem como desreguladores endócrinos, devido a que se encontram no topo da cadeia e apresentam concentrações

mais altas dessas substâncias que os organismos do início da cadeia alimentar (Bila e Dezotti, 2007). Além disso, o sedimento em suspensão se comporta como um vetor de transporte e ponto de entrada para a cadeia alimentar, sendo transportado na cadeia alimentar através dos invertebrados, que posteriormente serão consumidos por peixes ou aves. (Owens *et al*., 1994). Portanto, esse processo cria potenciais rotas ou caminhos para a exposição nos organismos terrestres e aquáticos, podendo inclusive afetar os seres humanos, que são expostos a estes produtos químicos, quando peixes e invertebrados aquáticos são consumidos (Ismail *et al*., 2017).

1.2. Efeito dos desreguladores endócrinos no ambiente aquático

Os compostos introduzidos nos ecossistemas aquáticos podem alterar o sistema endócrino, sendo chamados de desreguladores endócrinos (EDC, do inglês, *Endocrine Disrupting Compounds*), e atingem os animais, por exemplo, por meio da alimentação, e eventualmente sofrem bioacumulação, absorção de substâncias do ambiente ou uma acumulação ao longo do tempo ou a retenção da substância (Meador, 2006). ou até uma biomagnificação, definido como a transferência de substâncias xenobióticas dos alimentos, que podem ser também um organismo ou parte dele, a um organismo em que concentrações mais elevadas em comparação com a concentração da fonte (Zenker *et at*., 2014); podendo chegar aos seres humanos por meio da ingestão de alimentos, consumo de água e contato dérmico (Rice *et al*., 2003).

Nos últimos anos os EDCs têm atraído a atenção pelo fato de possuírem dentre outas coisas, propriedades esteroidogênicas e carcinogênicas (Baird, 2002); podendo atuar através de múltiplos modos de ação, como agonistas e antagonistas, ou ainda com efeitos aditivos, antagônicos e/ou sinérgicos. Devido ao crescente aumento das estações de tratamento de águas residuais e efluentes contendo EDCs, o problema se tornou emergente devido aos possíveis efeitos indesejáveis destes compostos nos ecossistemas e nos organismos, mesmo em baixas concentrações (Barreiros *et al*., 2016; Magos e Di Carro de 2016). Dentre os EDCs destacam-se os compostos estrogênicos, que podem ser os hormônios naturais ou sintéticos presentes no ambiente aquático, provindos dos descartes originados de seres humanos e do gado. Estrona (E1) e17β-estradiol (E2) são naturalmente produzidos nas gônadas, enquanto 17a-ethynyl estradiol (EE2) (derivado de E2) é um hormônio sintético utilizado em contraceptivos femininos (Rodgers Gray *et al*.,

2001; Matozzo *et al*., 2008; Hibberd *et al*., 2009; Aris *et al*., 2014). Ying *et al*. (2002) sugeriram que os excretas dos seres humanos consistem na principal fonte de

resíduos de estrógenos na água. Além disso, Matozzo *et al*. (2008) relataram que a presença de hormônios provindos da agricultura tem visivelmente aumentado. No entanto, no ambiente, os seres humanos e os animais selvagens são expostos a diversas misturas de compostos androgênicos, estrogênicos, antiandrogênicos e antiestrogênicos (Bush *et al*., 1990). Efeitos de antiestrogênicos foram relatados na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), onde 100% da população masculina teve supressão da aromatase do citocromo P450, que converte os andrógenos em estrógenos e é expressa em vários tecidos (cérebro, fígado e gônadas), com dieta tratada com o fármaco fadrozole (FAD) utilizado no câncer de mama (Afonso 2001; Kwon *et al*., 2000). Efeitos androgênicos, como presença ovotestis foram descritos em fêmeas de *Gambusia affinis affinis* em decorrência da 17 beta-trembolona, um esteroide anabolizante, com propriedades androgênicas, que aumentou também o crescimento muscular (Sone *et al*., 2005), redução na síntese de vitelogenina (Vtg) em *Pimephales promelas* (Miracle *et al*., 2006; Dorts *et al*., 2009). Efeitos antiandrogênicos de produtos químicos como o fármaco (flutamida), o inseticida (fenitrotiona), o herbicida (linuron) e o fungicida (vinclozolina), foram capazes de inibir significativamente o efeito estimulador da dihidrotestosterona (DHT) em fêmeas de *Gasterosteus aculeatus* (Jolly *et al*., 2009). A Figura 1 mostra exemplos de algumas fontes dos EDCs nos ecossistemas.

DEs	Fórmula Molecular	Composto	Referências
Estrona (E1)	$C_{18}H_{22}O_2$	Acetona, dioxano, e placenta humana.	(HSDB, 2016)
17β -estradiol (E2)	$C_{18}H_{24}O_2$	Secreto do flúor folicular ovariano, tecido placentário, isolado do ser humano e da gravidez da maré. Síntese do cromossololergergosterol.	(Barreiros *et al*., 2016; HSDB, 2016)
17a-etinil estradiol (EE2)	$C_{20}H_{24}O_2$	Hormônio esteroide sintético usado em pílulas anticoncepcionais.	(Aris *et al*., 2014; Barreiros *et al*., 2016; Scognamiglio *et al*., 2016)
Testosterona	$C_{19}H_{28}O_2$	Isolado da extração de testículos.	(HSDB, 2016)
Progesterona	$C_{21}H_{30}O_2$	Sintetizada nos ovários e isolada de corpus lúteo de porcas grávidas.	(HSDB, 2016)
BisfenolA (BPA)	$C_{15}H_{16}O_2$	Plastificantes tais como plásticos de policarbonato e resinas epoxi.	(Feng *et al*., 2015; Giulivo *et al*., 2016; Wang *et al*., 2016)
4-octilfenol (4OP)	$C_{14}H_{22}O$	Tensoativos não iônicos, detergentes industriais, dispersantes de emulsificantes, agentes solubilizastes, produtos de biodegradação de detergentes de poli cloreto de alquileno.	(Mills e Chichester, 2005; Zhao *et al*., 2009; Gong *et al*., 2011).
4-nonilfenol (4NP)	$C_{15}H_{24}O$	Produzido através de alquilação catalisada por metal com trímero de fenol e propileno, produtos de biodegradação de detergentes de poli cloreto de alquileno.	(Mills e Chichester, 2005; Zhao *et al*., 2009; HSDB, 2016)
Sulfametoxazol	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	Antibióticos encontrados principalmente no meio aquático.	(Daouk *et al*., 2016; K'oreje *et al*., 2016)
Primidona	$C_{12}H_{14}N_2O_2$	Farmacêuticos encontrados em meio aquático que são criados por seres humanos.	(Heberer, 2002)
Dexametasona	$C_{22}H_{29}FO_5$	Corticosteroide suprarrenal sintético.	(HSDB, 2016)
Dioxina	$C_{12}H_4Cl_4O_2$	Subproduto que resultou da queima ou incineração de produtos industrializados clorados.	(HSDB, 2016)

Figura 1 – Fontes de alguns compostos desreguladores endócrinos no ecossistema aquático. Fonte: (Ismail *et al*., 2017).

Os hormônios esteroides agem nos diferentes órgãos-alvo, dentre os principais as próprias gônadas (ação parácrina), a tireoide, o fígado, os rins, o cérebro e o sistema imunológico. Estes são, por tanto órgãos que apresentam receptores para estes hormônios, tornando-se alvos potenciais para os EDCs, que causam uma variedade de efeitos adversos tanto em seres humanos como em animais selvagens (Bila e Dezotti, 2007).

Estes efeitos podem ser alterações estrogênicas que possam gerar efeitos no comportamento reprodutivo; anomalias no sistema reprodutivo por exposição a EE2, presente em águas residuais domésticas (Franke *et al.*, 2016); alterações no desenvolvimento; síntese de vitelogenina (VTG-A), uma lipoproteína com função na vitelogênese ovariana cuja síntese pode ser induzida por contaminantes com ação estrogênica podendo levar à feminilização dos machos (com presença de oócitos testiculares) (Papoulias *et al.*, 2003). De uma forma geral, os EDCs podem ser absorvidos, acumulados e biomagnificados na água, sedimentos e biota (Figura 2).

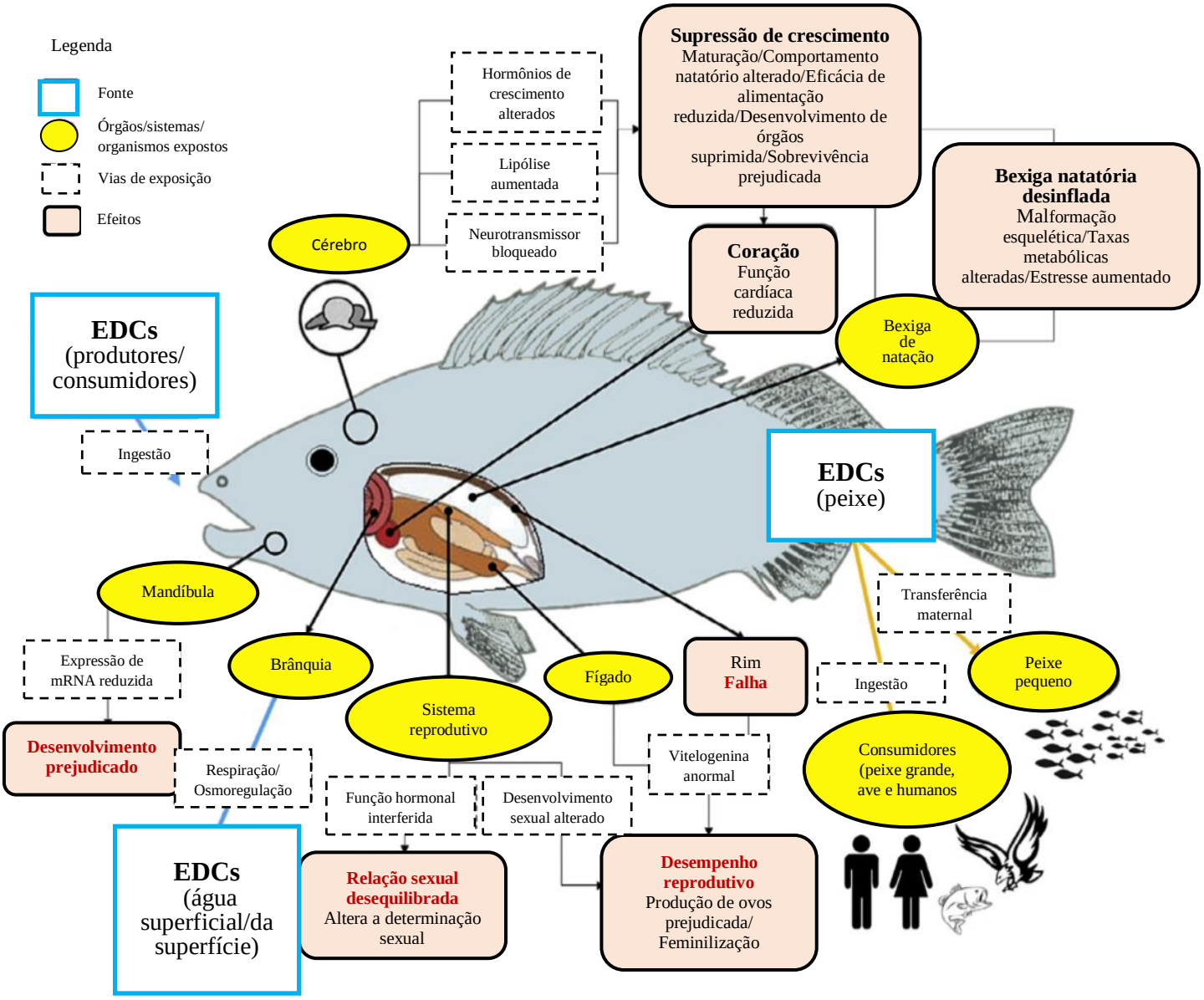


Figura 2 – Vias de exposição e efeitos dos desreguladores endócrinos nos organismos. Fonte: Modificado de Ismail *et al.*, (2017).

1.3. Importância ecotoxicológica dos biomarcadores

A ecotoxicologia é uma ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, entender seus mecanismos de ação e efeitos sobre o conjunto de seres vivos (Ramade, 1977). O principal propósito da ecotoxicologia é a avaliação de risco ecológico, a proteção das comunidades e dos ecossistemas contra os efeitos nocivos causados pelos contaminantes químicos (Amiard-Triquet *et al*., 2013).

Os biomarcadores consistem em importantes ferramentas nos estudos ecotoxicológicos, pois são definidos como mudanças bioquímicas, teciduais, morfológicas, dentre outras, que indiquem alterações fisiológicas em um organismo (Smit *et al*., 2009). Os biomarcadores são utilizados em um sentido amplo para medidas que reflitam uma interação entre um sistema biológico e um perigo potencial, químico, físico ou biológico (WHO, 1993). Eles apresentam relações entre respostas em diferentes níveis de organização biológica, bem como a relevância e escalas de tempo destas respostas (Adams *et al*., 1989). E estas respostas, em cada nível, ajudam a entender e interpretar a relação entre exposição e efeitos (De Zwart, 1995). O biomarcador de exposição pode mostrar uma resposta precoce e específica a uma classe particular de contaminantes, por exemplo, a indução síntese de vitelogenina (VTG-A) por estrógenos presentes no ambiente (Broeg *et al*., 2005). Os biomarcadores de efeito são indicadores de alterações fisiológicas ou bioquímicas como consequência da exposição e são índices de medidas diretas (por exemplo, dano ao DNA, inibição da AChE) ou medidas indiretas, como o impacto sub-celular nos lisossomos (Hook *et al*., 2014). Assim mesmo, um bioindicador aplicado a avaliação da qualidade da água, é definido como: "Espécies (ou agrupamento de espécies) que têm necessidades particulares em relação a um ou a um conjunto de variáveis físicas ou químicas, de modo que mudanças na presença / ausência, número, morfologia ou comportamento dessa espécie em particular indicam que as variáveis físicas ou químicas, estão próximas de seus limites de tolerância"(Rosemberg e Resh, 1993). Ou seja, um bioindicador é aquele cujas respostas biológicas são observadas em face a um distúrbio ecológico e são referidas como organismos ou sistemas biológicos que servem para avaliar variações na qualidade ambiental (Gamboa *et al*., 2008).

Os estudos ecotoxicológicos utilizam biomarcadores para avaliar o efeito dos poluentes por meio de alterações fisiológicas, genotóxicas ou morfológicas (Kellar *et al*., 2014; Colin *et al*., 2016). Entre os principais biomarcadores utilizados nos estudos com

peixes, estão aqueles de respostas ao estresse, respostas enzimáticas ao estresse oxidativo, a desregulação endócrina, efeitos genotóxicos, alterações histopatológicas, dentre outros (Colin *et al*., 2016), sendo um dos principais desafios na área da ecotoxicologia, a escolha dos biomarcadores e definir a importância de suas respostas em relação aos efeitos ecológicos dos poluentes (Suter, 1990). Portanto, é importante o uso de diversos biomarcadores para uma abordagem integrada, tanto para a classificação da qualidade ambiental quanto para a identificação de potenciais riscos ambientais (Van der Oost, 1998). Os biomarcadores são também relevantes para avaliar efeitos de contaminantes específicos, por exemplo, a presença de compostos esteroidogênicos como potenciais desreguladores endócrinos (Hook *et al*., 2014). Para reforçar a utilidade dos biomarcadores é preciso estabelecer uma base de dados históricos (considerando a variabilidade natural) para ajudar a diferenciar entre as respostas estatisticamente detectáveis contra respostas biologicamente significativas (Hutchinson *et al*., 2006).

1.4. Processo reprodutivo dos peixes

A reprodução é um processo essencial para a perpetuação das espécies (Bentley, 1998). Assim como nos demais vertebrados, a reprodução nos peixes teleósteos é internamente regulada por um sistema hierarquizado e orquestrado por diferentes órgãos, tipos celulares, hormônios e seus receptores, os quais em conjunto formam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadas (HPG) (Yaron e Levavi-Sivan, 2011). Nos peixes, assim como nos demais vertebrados, os estímulos ambientais como fotoperíodo, temperatura e aumento da pluviosidade, em conjunto com sinais sociais, são percebidos e convertidos em sinais eletroquímicos, que são transmitidos por neurônios sensoriais até o hipotálamo e estimulam a síntese e liberação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) (Zohar *et al*., 2010). A partir daí é iniciado o controle neuroendócrino do ciclo reprodutivo, que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Yaron e Sivan, 2006).

O GnRH, um decapeptídeo com vários resíduos de aminoácidos conservados entre os vertebrados. Além da sua função hipofisiotrópica, o GnRH também atua como neuromodulador e regulador do comportamento sexual (Zohar *et al*., 2010). Também, é um marcador de estudos evolutivos, pois, embora exista um total de 30 variantes de GnRH identificados em invertebrados e vertebrados, estas formas apresentam um certo grau de conservação em sua estrutura gênica, proteica e funções biológicas (Gomes *et al*., 2013). Os padrões de síntese e secreção de GnRH variam durante o ciclo de vida dos

peixes, e sua regulação está intimamente associada com o ciclo reprodutivo (Zohar *et al*., 2010). Embora o GnRH seja o principal neuropeptídio regulador da síntese e liberação de gonadotropinas, outros neurohormônios e neurotransmissores como o ácido γ-aminobutrírico (GABA), neuropeptídio Y (NPY), hormônio inibidor de gonadotropinas (GnIH), dopamina, e o peptídeo ativador da adenilatociclase (PACAP) também podem modular estas funções in vivo ou in vitro (Zohar *et al*., 2010).

O papel funcional de cada gonadotropina durante o ciclo reprodutivo e durante a diferenciação gonadal dos teleósteos ainda não foi completamente elucidado (Shimizu et al., 2003). Em relação ao ciclo reprodutivo, a maioria dos dados disponíveis é de espécies de salmonídeos (levavi-sivan *et al*., 2009). Nestes, o FSH atua no início dos eventos reprodutivos, como na vitelogênese e espermatogênese, enquanto o LH atua na maturação final dos oócitos e ovulação nas fêmeas, além da espermiação nos machos (Swanson *et al*., 2003). As gonadotropinas, constituem uma família de hormônios adeno-hipofisários glicoprotéicos (Swanson *et al*., 2003). Como nos mamíferos, são formados por duas subunidades distintas, uma alfa e uma beta, ligadas não covalentemente entre si (Kawauchi e Sower, 2006). A subunidade alfa apresenta a mesma sequência de aminoácidos nos dos hormônios. Por outro lado, a subunidade beta (FSHb/LHb) é estruturalmente diferente, sendo responsável pelas funções biológicas específicas de cada hormônio.

Os níveis plasmáticos dos esteroides sexuais sofrem importantes variações durante o ciclo reprodutivo nos machos e fêmeas (Lubzens *et al*., 2010, Schulz *et al*., 2010), indicando ao encéfalo e hipófise o status reprodutivo do animal, de forma a modular a síntese de GnRH e gonadotropinas por meio de um intrincado sistema de retroalimentação positiva e negativa, além de controlarem o comportamento e o período reprodutivo (Zohar *et al*., 2010). As vias metabólicas relacionadas à esteroidogênese gonadal nos peixes são similares às de outros vertebrados, com poucas diferenças. O processo se inicia com o transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna, pela atividade da proteína esteroidogênica regulatória aguda (Star), a qual é influenciada pela estimulação das gonadotropinas. Então, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima P450scc, uma etapa limitante da biossíntese de esteroides. A seguir, ocorrem várias reações catalisadas pelas enzimas P450c17 e 3β-hydroxiesteroide desidrogenase (3β-HSD), que resultarão nos substratos necessários para síntese dos produtos finais (Yaron e Levavi-Sivan, 2013).

Nas fêmeas, o FSH estimula a conversão do colesterol em testosterona (T) nas células da teca, a qual é aromatizada pela enzima aromatase (P450arom) e convertida em 17β-estradiol (E2) na camada granulosa do folículo ovariano. O E2 é o principal esteroide produzido na fase de maturação gonadal nas fêmeas e está associado com a proliferação das oogônias, bem como estimula a produção de vitelogenina pelo fígado. A vitelogenina é transportada pela corrente sanguínea e captada pelos oócitos, mediante ação do FSH (Lubzens *et al*., 2010). O crescimento do oócito se dá pela incorporação de vitelo, o principal substrato metabólico para o desenvolvimento inicial dos peixes. O início da vitelogênese é caracterizada pelo aumento nos níveis plasmáticos de FSH, E2 e na expressão de FSHr (Lubzens *et al*., 2010). 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 qual estimula a síntese de 17α-hidroxiprogesterona nas células tecais. Esta é convertida pela enzima 20β-HSD presente nas células da granulosa em 17α-20β-dihidroxi-4-pregnen-3-one (DHP). O DHP é o esteroide indutor da maturação final (MIS) na maioria dos teleósteos (Yaron e Levavi-Sivan, 2011), mas também promove a entrada das oogônias em meiose durante as fases iniciais do desenvolvimento ovariano (Lubzens *et al*., 2010).

A VTG é produzida pelo intestino de nemátodas, 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. 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). 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).

Nos peixes machos, o FSH é responsável, via células de Sertoli, pela proliferação espermatogonial que representa a primeira fase da espermatogênese. Ao mesmo tempo, o FSH ativa receptores presentes nas células de Leydig (principal célula esteroidogênica do testículo) estimulando a síntese e secreção de andrógenos (Ohta *et al*., 2008; García-Lopes *et al*., 2009). Nessa fase inicial, a testosterona é o principal andrógeno produzido nos testículos dos peixes, e possivelmente auxilia no apoio à fase proliferativa, porém indiretamente, prevenindo a apoptose das células germinativas durante as primeiras divisões celulares (via receptores nas próprias células de Sertoli; Almeida *et al*., 2009). Essa atividade esteroidogênica do FSH é uma particularidade dos peixes e se pronuncia com o avançar da meiose. Próximo à maturação final, com a espermiogênese e liberação dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos, outro andrógeno, ainda mais potente em ativação de receptores, apresenta-se em altos picos plasmáticos, a 11-cetotestosterona. Também nos machos a progesterona desempenha funções durante a maturação final, estimulando a meiose, espermiogênese e hidratação dos espermatozoides. Nessa fase de liberação de sêmen e acasalamento, o LH é a principal gonadotropina circulante e apresenta um feedback positivo com a testosterona e a 11-cetotestosterona. Após desova e encerramento das atividades reprodutivas, tanto o FSH quanto o LH e os esteroides sexuais retornam aos seus níveis basais que, em muitas espécies de peixes, significam valores quase nulos ou indetectáveis (Schulz *et al*., 2010). Embora encontrado em baixas concentrações plasmáticas, o E2 também é importante no processo de espermatogênese. Sob estimulação das gonadotropinas, especialmente o Fsh, o E2 é secretado pelas células de Leydig e, ao ligar-se aos seus receptores presentes nas células de Sertoli, estimula a secreção do fator de renovação das espermatogônias tronco, o qual efetivamente estimulará a proliferação espermatogonial por mitose (Yaron e Levavi-Sivan, 2011).

A presença de desreguladores 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 (Tolussi *et al*., 2016). Estas respostas incluem alterações na concentração de qualquer uns hormônios mencionados acima, que estão envolvidos na reprodução.

1.5. Contaminação aquática nos reservatórios da Região Metropolitana de São Paulo

Além dos corpos de água naturais, as atividades antrópicas são evidentes também quando modificações significativas são implantadas, na maioria das vezes, por interesses econômicos e/ou sociais, como é o caso dos represamentos. A natureza e a intensidade de impactos decorrentes das modificações hidrológicas impostas pelos represamentos dependem das peculiaridades da fauna local, tais como estratégias reprodutivas, padrões de migração, especializações tróficas e grau de pré-adaptações a ambientes lacustres, além das características do reservatório (Agostinho *et al.*, 2007). As mudanças na qualidade da água à jusante dos reservatórios podem afetar os peixes em três caminhos distintos: (i) por exceder os limites de tolerância, (ii) por inibir processos biológicos como reprodução e alimentação, e (iii) por alterar o balanço competitivo e as relações predador-presa (Petts, 1986).

Neste contexto, os reservatórios Billings e Guarapiranga são os mais importantes abastecimentos públicos de água da RMSP, fornecendo água para milhões de pessoas (Alves *et al*., 2010; Fontana *et al*., 2014). No entanto, atualmente, estes reservatórios se encontram contaminados pelo escoamento de resíduos provenientes de atividades domésticas das populações que ocupam de maneira irregular o entorno dos reservatórios, sendo um volume considerável de efluentes provenientes das residências (esgoto doméstico) e efluentes industriais (Alves *et al*., 2010). É provável que tais compostos sejam bioacumulados e disponibilizados para os organismos aquáticos, assim como na água e sedimento (Almeida e Weber, 2005).

Recentes estudos demonstraram alterações hormonais em machos e fêmeas de *Astyanax fasciatus* amostrados no reservatório Billings (Tolussi *et al*., 2018) e também em fêmeas de *Hoplias malabaricus* (Gomes *et al*., 2015) coletadas no mesmo local. Foi observado também que o grau de eutrofização da Billings vem acompanhado de alterações na composição planctônica, o que leva a mudanças na cadeia trófica deste reservatório, avaliadas utilizando-se como ferramenta a transferência de ácidos graxos nesta cadeia (Gomes *et al*., 2016). Devido à intensa ação antrópica em torno deste reservatório, existe uma grande quantidade de efluentes domésticos não tratados e de natureza desconhecida que contribuem para descarga de vários tipos de poluentes. Nesse contexto, o nosso grupo vem realizando estudos nos reservatórios Billings e

Guarapiranga, considerando a importância destes reservatórios para a população na RMSP.

Com base no exposto, o presente trabalho utilizou biomarcadores que demonstram a presença de EDC em diferentes pontos destes reservatórios, para mais especificamente, avaliar a presença de agentes estrogênicos, como inicialmente sugerido por Tolussi *et al*. (2018). As seguintes hipóteses foram testadas: 1) Machos adultos, com diferentes estratégias reprodutivas apresentam respostas de desregulação endócrina relacionadas ao processo reprodutivo nos reservatórios poluídos e 2) As respostas de desregulação endócrina são mais evidentes no período reprodutivo da espécie.

Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi utilizar diferentes biomarcadores para avaliar a fisiologia endócrina em machos de duas espécies de teleósteos, *Astyanax fasciatus* e *Hoplias malabaricus*, que apresentam diferentes estratégias reprodutivas, nos reservatórios impactados da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) e em diferentes estações do ano.

A presente dissertação foi organizada em 3 capítulos, cada um com objetivos, hipóteses e conclusões específicas. O capítulo 1 foi organizado para uma melhor compreensão e caracterização dos ambientes de estudo. Nos capítulos 2 e 3 são apresentadas as análises dos biomarcadores nos diferentes reservatórios, respectivamente em *Astyanax fasciatus* e *Hoplias malabaricus*. Estes capítulos foram apresentados separadamente pois não é objetivo deste estudo comparar as espécies, mas sim considerar se os efeitos da qualidade da água diferem em espécies com diferentes estratégias reprodutivas.

3. Área de estudo

Foram estabelecidos os pontos de coleta e as espécies que poderiam ser utilizadas, principalmente pela necessidade de utilizar as mesmas espécies em áreas de diferentes graus de impacto ambiental. Desta forma, uma coleta piloto foi realizada com sucesso, viabilizando a condução do presente projeto na forma em que está sendo proposto. Mediante autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (protocolo CEUA 294/2017), foram coletados os animais nas áreas de estudo que compreendem três importantes reservatórios da Bacia Hidrográfica do Rio Tietê na RMSP (Figura 3).

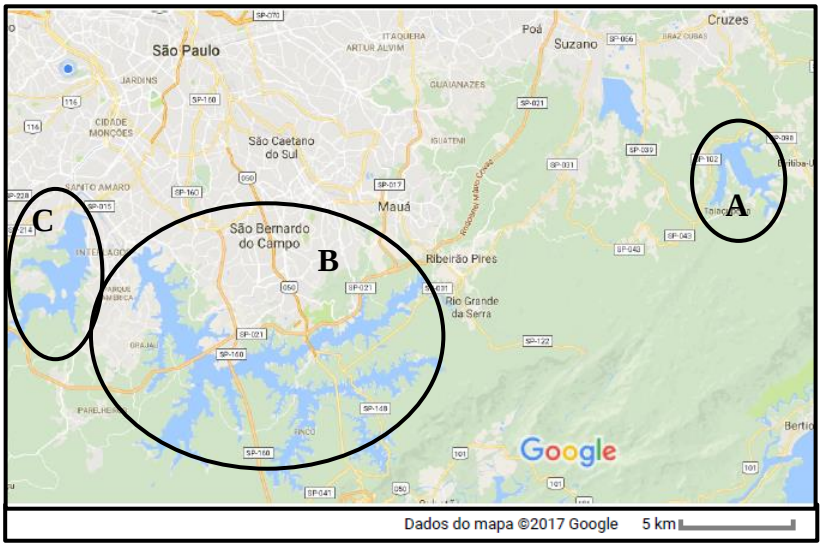


Figura 3 – Mapa da Bacia Hidrográfica do Rio Tietê, destacando os reservatórios de (**A**) Ponte Nova, (**B**) Billings e (**C**) Guarapiranga. (Fonte: google.com).

<u>Reservatório Ponte Nova</u>

O reservatório de Ponte Nova (Figura 3A) está situado no Rio Tietê, sendo seus principais tributários o Rio Tietê e o Rio Claro. Localiza-se entre os municípios de Salesópolis e Biritiba Mirim (23°33′S; 45°50′W), a uma altitude de 765 m, com uma área de drenagem de 320 km^2. Essa região da bacia ainda reúne áreas de mananciais sob proteção ambiental contendo regiões parcialmente preservadas (Marceniuk e Hilsdorf, 2010). Devido a estas características, o reservatório foi escolhido como reservatório referência em relação ao grau de trofia com os demais reservatórios.

Reservatório Billings

O reservatório Billings (Figura 3B) 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 (Mariani *et al*., 2006). É utilizado para a geração de energia elétrica e abastecimento público de água (EMAE, 2002), sendo considerado o segundo maior reservatório de água da RMSP, com uma área de drenagem de 1560 km^2 e um espelho d'água de 106.6 km^2. 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 (Alves *et al*., 2010). As coletas foram realizadas nos Braços Bororé e Braço Taquacetuba, sendo este último localizado na área menos poluída entre as duas escolhidas (Figura 4).

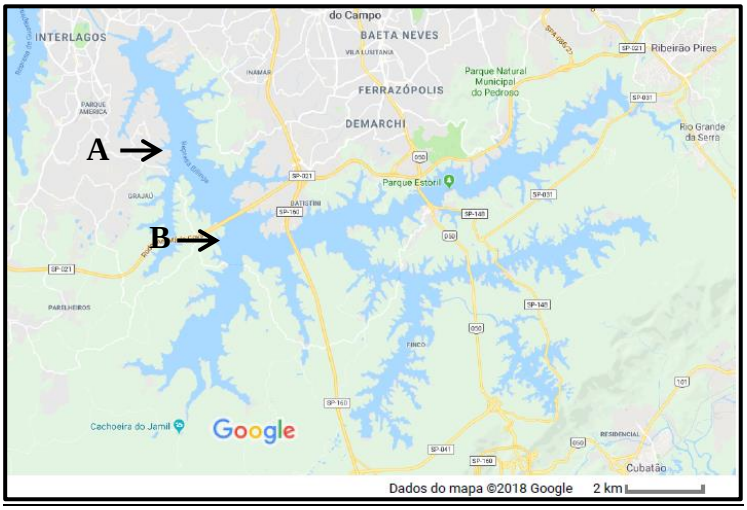


Figura 4 – Mapa do reservatório Billings, destacando os braços de (**A**) Bororé e (**B**) Taquacetuba. (Fonte: google.com)

Reservatório Guarapiranga

O reservatório Guarapiranga, situado no sudeste da cidade de São Paulo (Figura 3C), possui uma área de drenagem de 631 km^2. Foi construído em 1906 para produção de energia elétrica e atualmente é o segundo mais importante reservatório de abastecimento público de água da RMSP, fornecendo água para mais de 2 milhões de pessoas (Fontana *et al*., 2014). O reservatório é constantemente impactado por desmatamento, erosão do solo e por áreas de ocupação irregular que compreendem 16.9% da sua área (Whately e Cunha, 2006). As fontes de poluição são principalmente devido à agricultura, áreas urbanas e industriais e efluentes domésticos e industriais não tratados (Pompêo *et al*., 2013). Assim como no reservatório Billings, dois pontos de amostragem foram

selecionados com a finalidade de abranger dois diferentes graus de poluição: próximo ao tributário Embu-Guaçu, região considerada mais conservada e a área próxima à Barragem, região intensamente urbanizada por favelas, residências e Iate Clubes (Figura 5).

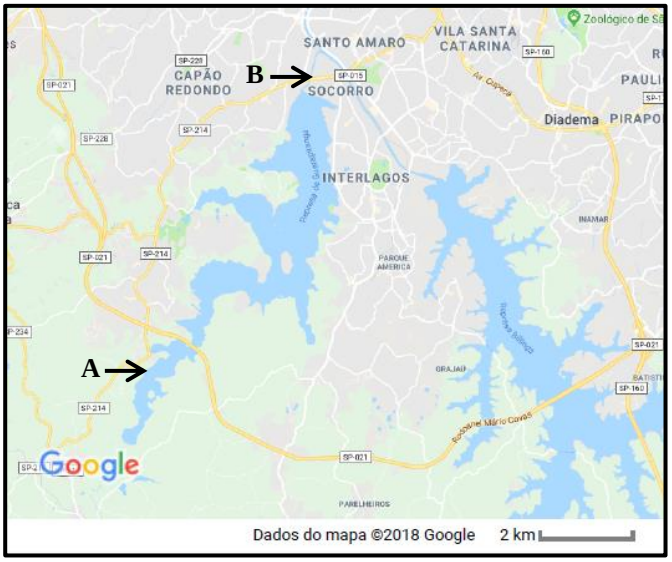


Figura 5 – Mapa do reservatório Guarapiranga, destacando os braços de (**A**) Embu-Guaçu e (**B**) Barragem. (Fonte: google.com)

4. Espécies estudadas

As espécies de peixes utilizadas no presente projeto foram *Astyanax fasciatus*, conhecida popularmente como lambari-do-rabo-vermelho e *Hoplias malabaricus*, conhecida popularmente como traíra. As duas espécies pertencem à ordem Characiformes e foram escolhidas devido a sua grande ocorrência, fácil captura nos reservatórios da Bacia do Rio Tietê e por apresentarem estratégias reprodutivas distintas.

Astyanax fasciatus possui grande importância na cadeia alimentar devido ao seu hábito alimentar onívoro, com tendência insetívora e zooplanctívora, mas também é forrageira de espécies carnívoras (Vilella *et al*., 2002). *A. fasciatus* apresenta desovas múltiplas em um período reprodutivo definido (Gurgel, 2004), mas pode apresentar táticas reprodutivas distintas (sincrônica em grupos ou assincrônica) dependendo do ambiente em que vive (Silva *et al*., 2010). Tolussi *et al*. (2018) encontraram oócitos vitelogênicos nos ovários de fêmeas de *A. fasciatus* coletadas na Billings durante todas as estações do ano.

H. malabaricus é um predador solitário que permanece parado nas águas represadas, vegetação submersa e em outros locais onde pode esconder-se e perseguir suas presas, pois é carnívoro (Castellanos, 2002). Sobrevive em condições de hipóxia (Taphorn, 1992), desenvolvimento gonadal do tipo sincrônico em grupo, com múltiplas desovas, mas o período reprodutivo é limitado à primavera e verão ((Marques *et al*., 2001; Gomes *et al*., 2015).

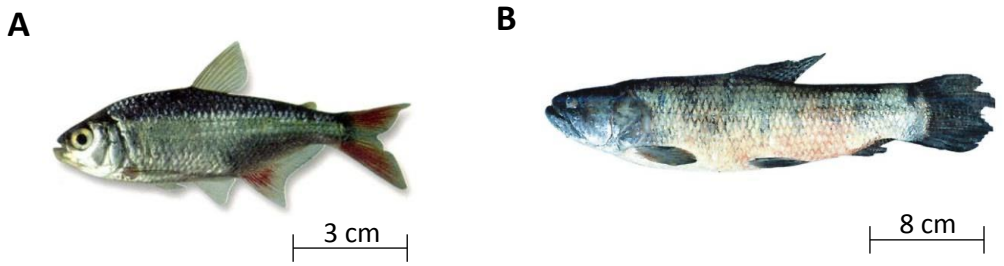


Figura 6 – (**A**) *A. fasciatus*. Fonte: Galvis e Camargo (1997) e (**B**) *H. malabaricus*. Fuente: Sverlij (2002). O comprimento (média ± EPM) durante as coletas foi de 9,49 ± 0,30 cm para *A. fasciatus* e 35,92 ± 0,74 cm para *H. malabaricus*.

Referências bibliográficas

Adams, S.S. 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress in fish. *Marine Environmental Research*, 28: 459-464.

Afonso LOB, Wassermann GJ, De Oliveira RT. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Journal of Experimental Zoology*, 290:177–181.

Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Pelicice, F.M. 2007. Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil. *Eduem - Editora da Universidade Estadual de Maringá*, 501.

Almeida, F.F.L.; Kristoffersen, C.; Taranger, G.L.; Schulz, R.W. 2008. Spermatogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel model of cystic germ cell development. *Biology of Reproduction*, 78: 27-34.

Almeida, G.A.; Weber, R.R. 2005. Fármacos na represa Billings. *Revista Saúde e Ambiente*, 6(2): 7-13.

Alves, B.T.; Saccuti, C.F.; Bueno, D.D.P.O.; Pereira, D.S; Grizzo, G.A,; Garcia, G.L.; Nascimento, L.A.; Oliveira, M.F.; Nascimento, M.M.; Romanelli, M.F.; Araújo, R.E.; Ferreira, R.B.; Saraiva, R.G.; Machado, R.; Dias, R. 2010. Caderno de Educação Ambiental - Edição Especial Mananciais - Billings. *Secretaria de Meio Ambiente de São Paulo*, p. 150.

Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.C.; Rainbow, P.S. 2013. Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects. Chicago: *The University of Chicago Press*, 89: 382-383.

Aris, A.Z.; Shamsuddin, A.S.; Praveena, S.M. 2014. Occurrence of 17a-ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment International*, 69: 104-119.

Baird, C. 2002. Química Ambiental. Porto Alegre: *Bookman*, (2): 622.

Barreiros, L.; Queiroz, J.F.; Magalhães, L.M.; Silva, A.M.; Segundo, M.A. 2016. Analysis of 17-b-estradiol and 17-a-ethinylestradiol in biological and environmental matrices: a review. *Microchemical Journal*, 126: 243-262.

Bentley, P.J. 1998. Comparative vertebrate endocrinology. *United Kingdom: Cambridge*, 3: 236.

Bila, D.M.; Dezotti, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Química Nova*, 30(3): 651–666.

Broeg, K.; Westernhagen, Hv.; Zander, S.; Korting, W.; Koehler, A. 2005. The "bioeffect assessment index" (BAI) A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 50:495-503.

Bush, B; Streeter, R.W; Sloan, R.J. 1990. Polychlorobiphenyl (PCB) congeners in striped bass (*Morone saxatilis*) from marine and estuarine waters of New York State determined by capillary gas chromatography. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19:49–61.

Caldwell, D.J.; Mastrocco, F.; Anderson, P.D.; Länge, R.; Sumpter, J.P. 2012. Predicted-No-Effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17β-Estradiol, Estriol e 17α Ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 1396-1406.

Cajaraville, M.P.; Benianno, J.M.; Blasco, J.; Porte, C.; Saraquete, C.; Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247: 295–311.

Castellanos, C. 2002. Distribución especial de la comunidad de peces en una quebrada de aguas negras amazónicas, Leticia, Colombia. Bogotá: Tesis de pregrado, Biología, Universidad Nacional de Colombia.

Colin, N.; Porte, C.; Fernandes, D.; Barata, C.; Padrós, F.; Carrassón, M.; Monroy, M.; Cano-Rocabayera, O.; De Sosto, A.; Piña, B.; Maceda-Veiga, A. 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of the Total Environment*, 540: 307–323.

Colborn, T.; Clement, C. 1992. Chemically-induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, (21): 403.

Colborn, T.; VomSaal, F.; Soto, A. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspect*, 101 (5): 375-384.

Corcoll, N.; Acuña, V.; Barceló, D.; Casellas, M.; Guasch, H.; Huerta, B.; Petrovic, M.; Ponsatí, L.; Rodríguez-Mozaz, S.; Sabater, S. 2014. Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents. *Chemosphere*,112: 185–193.

Cropper, B.M.; Griffiths, C. 2016. American Economic Association The Interaction of Population Growth and Environmental Quality Author (s): Maureen Cropper and Charles Griffiths Source : *The American Economic Review*, (2): 84.

Daouk, S.; Chevre, N.; Vernaz, N.; Widmer, C.; Daali, Y.; Fleury-Souverain, S. 2016. Dynamics of active pharmaceutical ingredients loads in a Swiss university hospital wastewaters and prediction of the related environmental risk for the aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 547, 244-253.

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.

De Zwart, D., 1995. Monitoring water quality in the future. Biomonitoring. Bilthoven, The Netherlands. *National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM)*, (3): 62.

Dorts, J; Richter, C.A; Wright-Osment, M.K; Ellersieck, M.R; Carter, B.J; Tillitt, D.E. 2009. The genomic transcriptional response of female fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an acute exposure to the androgen, 17beta-trenbolone. *Aquatic Toxicology*, 91(1): 44-53.

Empresa Metropolitana de Água e Energia. – EMAE. 2002. São Paulo, Brasil. *http://www.emae.com.br.* Acesso em 20 de junho de 2018.

Feng, J.; Sun, M.; Bu, Y.; Luo, C. 2015. Development of a functionalized polymeric ionic liquid monolith for solid-phase microextraction of polar endocrine disrupting

chemicals in aqueous samples coupled to high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (23): 7025-7035.

Finn, R.N. 2007. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins. *Biology of Reproduction*, 76: 926-935.

Fontana, L.; Albuquerque, A.L.S.; Brenner, M.; Bonotto, D.M.; Sabaris, T.P.; Pires, M.A.; Cotrim, M.E.B.; Bicudo, D.C. 2014. The eutrophication history of a tropical water supply reservoir in Brazil. *Journal of Paleolimnology*, 51:29–43.

Franke, T.E.; Meyer, M.T.; Kolpin, D.W.; Gillis, A.B.; Alvarez, D.A. 2016. Exposure to the Contraceptive Progestin, Gestodene, Alters Reproductive Behavior, Arrests Egg Deposition, and Masculinizes Development in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology*, 50(11):5991-9.

Galvis, G, J. I. Mojica; M. Camargo. 1997. Peces del Catatumbo. *Ecopetrol-Oxy-Shell-Asociación Cravo Norte*. D'Vinni Edit. Ltda. Bogotá D.C., Colombia, 188.

Gamboa, M.; Reyes, R.; Arrivillaga, J. 2008. Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 48(2): 109-120.

García-López, A.; Bogerd, J.; Granneman, J. C.; Van Dijk, W.; Trant, J. M.; Taranger, G. L.; Schulz, R. W. 2009. Leydig cells express FSH receptors in African catfish. *Endocrinology*, 150: 357-365.

Geissen, V.; Mol, H.; Klumpp, E.; Umlauf, G.; Nadal, M.; van der Ploeg, M.; van de Zee, S.; Ritsema, C. J. 2015. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(1): 57-65.

Giulivo, M.; de Alda, M.L.; Capri, E.; Barcelo, D. 2016. Human exposure to endocrine disrupting compounds: their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental Research*, 151: 251-264.

Gong, J.; Xu, L.; Yang, Y.; Chen, D.Y.; Ran, Y. 2011. Sequential ASE extraction of alkylphenols from sediments: occurrence and environmental implications. *Journal of Hazardous Materials*, 192 (2): 643-650.

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*, 51: 1193-1206.

Gomes, A.D.; Tolussi, C.E.; Ribeiro, C.S.; Honji, R.M.; 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.

Gomes, C.C.; Costa, F.G.; Borella, M.I. 2013. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000). Micron, 52-53: 33-38.

Gurgel, H. 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*, 1(21): 131-135.

Hazardous Substances Data Bank (HSDB) 2016. Retrieved from *http://toxnet.nlm. nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm.* Acesso em 15 de fevereiro de 2019.

Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131 (1): 5-17.

Hibberd, A.; Maskaoui, K.; Zhang, Z.; Zhou, J.L. 2009. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. *Talanta*, 77 (4): 1315-1321.

Hook, S.E.; Gallagher, E.P.; Batley, G.E. 2014. The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10(3): 327–341.

Hutchinson, T.H.; Ankley, G.T.; Segner, H.; Tyler, C.R. 2006. Screening and Testing for Endocrine Disruption in Fish—Biomarkers As “Signposts,” Not “Traffic Lights,” in Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, 114(1): 106-114.

Ismail, N.A.H.; Wee, S.Y.; Aris, A.Z. 2017. Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota. *Chemosphere*, 188: 375-388.

Jesus, T.B.; Carvalho, C.E. 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação da contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliense*, 12(4):680-693.

Jolly, C.; Katsiadaki, I.; Morris, S.; Le Belle, N.; Dufour, S.; Mayer, I.; Pottinger, T.G.; Scott, A.P. 2009. Detection of the antiandrogenic effect of endocrine disrupting environmental contaminants using in vivo and in vitro assays in the three-spined stickleback. *Aquatic Toxicology*, 92(2):228-39.

Kawauchi, H.; Sower, S.A. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *General and Comparative Endocrinology*, 148: 3-14.

Kellar, C.R.; Hassell, K.L.; Long, S.M.; Myers, J.H.; Golding, L.; Rose, G., Kumar, A.; Hoffmann, A.A.; Pettigrove, V. 2014. Ecological evidence links adverse biological effects to pesticide and metal contamination in an urban Australian watershed. *Journal of Applied Ecology*, 51:426-439.

Kidd, K.A.; Blanchfield, P.J.; Mills, K.H.; Palace, V.P.; Evans, R.E.; Lazorchak, J.M.; Flick, R.W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. (D. Swackhamer, Ed.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21).

K'oreje, K.O.; Vergeynst, L.; Ombaka, D.; De Wispelaere, P.; Okoth, M.; Van Langenhove, H. 2016. Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. *Chemosphere* 149, 238-244.

Kwon, J.Y.; Haghpanah, V.; Kogson-Hurtado, L.M.; McAndrew, B.J.; Penman, D.J.; 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *Journal of Experimental Zoology*, 287(1):46–53.

Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E.L.; Gómez, A.; Lareyre, J.J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 65: 34- 89.

Lim, E.H.; Teo, B.Y.; Lam, T.J.; Ding J.L. 2001. Sequence analysis of a fish vitellogenin cDNA with a large phosvitin domain. *Gene*, 277: 175-186.

Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 367-389.

Magi, E.; Di Carro, M. 2016. Marine environment pollution: the contribution of mass spectrometry to the study of seawater. *Mass Spectrometry Reviews*, 37(4):492-512.

Marceniuk, A.P.; Hilsdorf, A.W.S. 2010. Peixes das cabeceiras do rio Tietê e Parque das Neblinas. 1. ed. Bauru, SP, *Editora Canal 6*, 157.

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.; Pompêo, M.L.M. 2006. Biota and water quality in the Riacho Grande reservoir, Billings Complex (São Paulo, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*,.18(3):267-280.

Marques, D.; Gurgel, H.; Lucena, I. 2001. Época de reprodução de *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências*, (3): 61-67.

Matozzo, V.; Gagne, F.; Marin, M.G.; Ricciardi, F.; Blaise, C. 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environment International*, 34 (4): 531-545.

Meador, J. 2006. Rationale and procedures for using the tissue-residue approach for toxicity assessment and determination of tissue, water, and sediment quality guidelines for aquatic organisms. *Human and Ecological Risk Assessment*, 12: 1018-1073.

Mills, L.J.; Chichester, C. 2005. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment*, 343 (1-3): 1-34.

Miracle, A.; Ankley, G.; Lattier, D. 2006. Expression of two vitellogenin genes (vg1 and vg3) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver in response to exposure to steroidal estrogens and androgens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3): 337–42.

Murray, K.E.; Thomas, S.M.; Bodour, A.A. 2010. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158(12): 3462–3471.

Ohta, T.; Miyake, H.; Miura, C.; Kamei, H.; Aida, K.; Miura, T. 2007. Follicle stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biology of Reproduction*, 77: 970-977.

Owens, J.W.; Swanson, S.M.; Birkholz, D.A. 1994. Bioaccumulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran and extractable organic chlorine at a bleached-kraft mill site in a northern Canadian river system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(2): 343-354.

Papoulias, D.; Villalobos, S.; Meadows, J.; Noltie, D.; Giesy, J.; Tillitt, D. 2003. In ovo exposure to o, p-DDE affects sexual development but not sexual differentiation in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives*, 111(1): 29-32.

Petts, G. 1986. Water quality characteristics of regulated rivers. *Progress in Physical Geography*, 10(4): 492-516.

Pompêo, M.L.M.; Padial, P.R.; Mariani, C.F.; Cardoso-Silva, S.; Moschini-Carlos V.; Silva, D.C.V.R.; Paiva, T.C.B.; Brandimarte, A.L. 2013. Biodisponibilidade de metais no sedimento de um reservatório tropical urbano (reservatório Guarapiranga – São Paulo (SP), Brasil): há toxicidade potencial e heterogeneidade espacial? *Geochimica Brasiliensis*, 27(2): 104-119.

Ramade, F. 1977. Ecotoxicologie. Paris: *Editions Masson*, 1: 205.

Rice, E.W.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L.S. 2012. American Public Health Association., American Water Works Association., & Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater. Ed. Washington, DC: *American Public Health Association*, (22).

Rodgers Gray, T.P.; Jobbling, S.; Kelly, C.M.; Brighty, G.; Waldock, M.J.; Sumpter, J.P.; Tyler, C.R. 2001. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environmental Science and Technology*, 35(3): 462-470.

Rosemberg, D.; Resh, V. 1993. Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrate. *Springer*, 420: 330-354.

Sauvé, S.; Desrosiers, M. 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*. 8:15.

Shimizu, A.; Kagawa, H.; Tanaka, H. 2003. Immunocytochemical identification of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in various perciform fishes using antisera raised against synthetic peptides. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 109-110.

Schulz, R.W.; França, L.R.; Lareyre, J.J.; Legac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nobrega, R. H.; Miura, T. 2010 Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3): 390-411.

Scognamiglio, V., Antonacci, A., Patrolecco, L., Lambreva, M.D., Litescu, S.C., Ghuge, S.A.,2016. Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. *Trends in Analytical Chemistry*, 80: 555-567.

Smit, M.G.D.; Bechmann, R.K.; Hendriks, A.J.; Skadsheim, A.; Larsen, B.K.; Baussant, T.; Bamber, S.; Sanni, S. 2009. Relating biomarkers to whole-organism effects using species sensitivity distributions: a pilot study for marine species exposed to oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(5): 1104-1109.

Shahidul-Islam, M.; Tanaka, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48(7-8): 624–649.

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(4): 885-892.

Sone, K.; Hinago, M.; Itamoto, M.; Katsu, Y.; Watanabe, H.; Urushitani, H.; Tooi, O.; Guillette, L.J.; Jr-Iguchi, T. 2005. Effects of an androgenic growth promoter 17beta-trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). *General and Comparative Endocrinology*, 143(2):151-160.

Suter, G. 1990. Use of biomarkers in ecological risk assessment. (J. S. In: McCarthy, Ed.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. 419-428.

Sverlij, S. B. 2002. Fishbase.org. Acesso em 10 de outubro de 2018, disponível em: http://www.fishbase.org/photos/PicturesSummary.php?StartRow=5&ID=4757&what=species&TotRec=13.

Swanson, P.; Dickey, J.T.; Campbell, B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 53-59.

Taphorn, D. 1992. The Characiform fishes of the Apure river drainage. *Biollania*, 4: 537.

Tolussi, C.E. 2016. Influência antrópica do ambiente aquático sobre os processos fisiológicos associados à maturação oocitária em peixes teleósteos. Tese de doutorado. Programa de Fisiologia Geral, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 87.

Tolussi, C.E.; Gomes, A.D.O.; Kumar, A.; Ribeiro, C.S.; Lo Nostro, F.L.; Bain, P.A.; de Souza, G.B.; Cuña, R.D.; Honji, R.M.; Moreira, R.G. 2018. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 926-934.

Van der Oost, R.L. 1998. Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*); use of a bioactivation: detoxication ratio as biotransformation index (BTI). *Marine Environmental Research*, 46: 315-319.

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*, 45(2): 223-232.

Wang, L.; Zhang, D.; Xu, X.; Zhang, L. 2016. Application of ionic liquid-based dispersive liquid phase microextraction for highly sensitive simultaneous determination of three endocrine disrupting compounds in food packaging. *Food Chemistry*, 197:754-760.

Whately, M.; Cunha, P.M. 2006. Guarapiranga 2005: Como e por que São Paulo está perdendo este manancial: resultados do diagnóstico socioambiental participativo da bacia hidrográfica da Guarapiranga. São Paulo: *Instituto Socioambiental*, 48.

WHO, I.P. 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria*, 155.

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

Yaron, Z.; Levavi-Sivan, B. 2011. Endocrine regulation of fish reproduction. In: Farrel, A. P. (Ed.). Encyclopedia of Fish Physiology: From genome to environment. San Diego: *Academic Press*, 2: 1500-1508.

Ying, G.; Zhao, J.; Zhou, L.; Liu, S. 2013. Fate and occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment (Surface Water and Sediment). *Comprehensive Analytical Chemistry*, 62: 453-557.

Zenker, A.; Cicero, M.R.; Prestinaci, F.; Bottoni, P.; Carere, M. 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*, 133: 378-387.

Zhao, R.S.; Wang, X.; Yuan, J.P.; Zhang, L.L. 2009. Solid-phase extraction of bisphenol A, nonylphenol and 4-octylphenol from environmental water samples using microporous bamboo charcoal, and their determination by HPLC. *Microchimica Acta*, 165 (3e4), 443-447.

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

Caracterização limnológica de três reservatórios com diferentes graus de trofia

Resumo

O aumento das atividades humanas impactantes tem levado os ecossistemas aquáticos a níveis cada vez mais altos de poluição, principalmente pelo aumento da disponibilidade de nutrientes e da proliferação de organismos fitoplanctônicos. O objetivo deste estudo foi caracterizar o grau de trofia e a qualidade da água de três reservatórios da Bacia Hidrográfica do Rio Tietê Billings (Bil) e Guarapiranga (Gua), expostos a diferentes pressões antrópicas na região metropolitana de São Paulo. Amostragens de água e sedimento nas estações de verão e inverno foram realizadas em 2017 e 2018 para análise das seguintes variáveis físico – químicas: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, nutrientes e clorofila-*a*. Poucas variáveis excederam os valores estabelecidos pela resolução CONAMA nº 357 no reservatório de Ponte Nova, com exceção dos nutrientes em algumas estações do ano, caracterizando o ambiente como mesotrófico e com água de boa qualidade. Em contraste, altas concentrações de nutrientes foram detectadas nos braços Embu-guaçu (Gua), classificado como eutrófico, Barragem (Gua), Taquacetuba e Bororé (Bil) classificados como supereutrófico, devido ao intenso descarte de esgoto, e com água de péssima qualidade. A condição hipereutrófica foi presente durante meses específicos (Barragem e Bororé, durante o verão; Taquacetuba, nas duas estações de 2017), mostrando a diminuição ainda mais acentuada da qualidade da água nesses reservatórios poluídos. Este fato é relevante porque estes reservatórios são utilizados para o abastecimento público, mas apresentam grande parte de suas áreas ocupadas por atividades antrópicas e assentamentos irregulares e um intenso descarte de esgoto doméstico e industrial.

Palavras-chave: eutrofização, nutrientes, qualidade da água, reservatório.

Abstract

The increase in impacting human activities has led aquatic ecosystems to increasingly high levels of pollution, mainly due to the increased availability of nutrients and the proliferation of phytoplanktonic organisms. The objective of this study was to characterize the trophic degree and the water quality of three reservoirs of the Tietê River Baisin: Billings (Bil) and Guarapiranga (Gua), exposed to different anthropogenic pressures in the metropolitan region of São Paulo. Water and sediment samples in the summer and winter seasons were carried out in 2017 and 2018 to analyze the following physico - chemical variables: temperature, dissolved oxygen, pH, nutrients and chlorophyll a. Few variables exceeded the values established by CONAMA Resolution 357 in the Ponte Nova reservoir, with the exception of nutrients in some seasons, characterizing the environment as mesotrophic and with good quality water. In contrast, high concentrations of nutrients were detected in the Embu-guaçu (Gua), classified as eutrophic, Barra (Gua), Taquacetuba and Bororé (Bil) arms, classified as supereutrophic due to the intense discharge of sewage and water of bad quality. The hypereutrophic condition was present during specific months (Barragem and Bororé, during summer; Taquacetuba, during both seasons of 2017), showing the even more pronounced decrease of water quality in these polluted reservoirs. This fact is relevant because these reservoirs are used for public supply, but they present great part of their areas occupied by anthropic activities and irregular settlements and an intense discard of domestic and industrial sewage.

Key-words: eutrophication, nutrients, reservoirs, water quality.

1. Introdução

Os principais rios, lagos e represas do planeta são importantes reservatórios de água doce, fundamentais para a sobrevivência de todos os organismos, incluindo o homem, e a disponibilidade de água doce é a principal preocupação acerca dos recursos naturais (Tundisi, 2005; Wetzel, 2001). O aumento das atividades antrópicas no ambiente natural está levando a um intenso processo de degradação e contaminação dos corpos hídricos (Cropper e Griffiths, 2016) e têm levado os ecossistemas aquáticos a níveis cada vez mais altos de poluição, principalmente pelo aumento da disponibilidade de nitrogênio e fósforo e da proliferação de organismos fitoplanctônicos, que acarretam intensos processos de eutrofização artificial (Straskraba e Tundisi, 2000; Tundisi e Matsumura- Tundisi, 2008; Moschini-Carlos *et al*., 2010).

Nos reservatórios, esse processo de eutrofização tem resultado em desequilíbrios ecológicos com efeitos negativos para a biota, além da intensa degradação da qualidade da água (Moschini-Carlos *et al*., 2010), tais como diminuição na concentração de oxigênio dissolvido, aumento do fósforo no sedimento, aumento da biomassa de fitoplâncton, zooplâncton, macrófitas e peixes, mudanças nas cadeias alimentares, proliferação de bactérias patogênicas, aumento das florações de cianobactérias, mortalidade dos peixes, produção de odores desagradáveis e consequente elevação dos custos de tratamento de água para o abastecimento (Carmo *et al*., 2002; Tundisi e Matsumura-Tundisi, 2008).

Atualmente, os reservatórios localizados em diferentes regiões metropolitanas do mundo estão submetidos a inúmeras pressões antrópicas. A região metropolitana de São Paulo (RMSP), por exemplo, é composta por 23 reservatórios de abastecimento de água que, além desta função, são utilizados para recreação, pesca, produção de eletricidade e turismo. Esses sistemas estão permanentemente pressionados por impactos como fontes pontuais e difusas de descargas de nutrientes, resíduos sólidos e substâncias tóxicas, degradação das margens e da zona litoral, desmatamento, sedimentação, poluição atmosférica e extensas ocupações urbanas. Além disso, as constantes florações de cianobactérias (como *Microcystis aeruginosa*) aumentam a toxicidade do sistema devido à produção de cianotoxinas (Tundisi e Matsumura-Tundisi, 2008). Todos esses fatores levaram ao quadro de degradação dos mananciais disponíveis ao abastecimento dos mais de 18 milhões de habitantes da RMSP, incluindo o reservatório Billings que juntamente

com o reservatório Guarapiranga forma o segundo maior sistema de água da RMSP, abastecendo 3,7 milhões de pessoas (SABESP, 2014). Devido à intensa ação antrópica em torno destes reservatórios, existe uma grande quantidade de efluentes domésticos não tratados e de natureza desconhecida que contribuem para descarga de vários tipos de poluentes.

Deste modo, informações sobre a caracterização limnológica desses ambientes são imprescindíveis quando se busca estratégias para a conservação de reservatórios ou propor medidas de recuperação relacionadas com a aplicação que se pretende dar a estes ambientes (Rouf *et al*., 2008). O objetivo do presente estudo foi caracterizar a qualidade da água e calcular o encontrar o grau de trofia de dois reservatórios da Bacia do Tietê, de grande importância para o abastecimento de água da RMSP, e que estão sob ação de diferentes atividades antrópicas. Nossa hipótese é que os reservatórios Billings e Guarapiranga devido à localização próxima aos grandes centros urbanos apresentam qualidade de água depreciada e consequentemente um alto grau de trofia, ao contrário do reservatório de Ponte Nova, localizado em uma área preservada da mesma bacia. E, além disso, o grau de trofia varia nas estações, sendo mais elevado na seca (inverno) quando comparado com a estação de chuvas (verão).

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem de água e sedimento

No momento da captura dos animais, a transparência da água foi medida através do disco de Secchi, para fins de cálculo da zona fótica (profundidade do disco de Secchi multiplicada pelo fator 2.709) (Cole, 1979). A concentração de oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), o pH e a temperatura da água (ºC) foram também registrados *in situ* utilizando uma sonda multiparâmetros portátil (YSI *Professional Plus*).

As amostras de água foram coletadas em três profundidades diferentes da zona fótica na coluna de água (superfície, meio e fundo) com auxílio de uma garrafa de Va*n Dorn* com capacidade de 5 litros, e imediatamente despejadas em um recipiente para a mistura das três camadas. As amostras coletadas foram acondicionadas em três diferentes formas: 1) amostras de água acondicionadas em garrafas plásticas de 250 mL, mantidas em gelo até o transporte ao laboratório para análises de nutrientes (após acidificação com 250 µL de ácido nítrico); 2) amostras de água acondicionadas em garrafas plásticas

protegidas da luz, fixadas com lugol acético e mantidas em temperatura ambiente para identificação de organismos do fitoplâncton; 3) amostras de água filtradas com filtros Whatman GF/C, acondicionadas em garrafas plásticas de 500 mL e mantidas em gelo até o transporte ao laboratório para análises de nutrientes dissolvidos e clorofila-*a*. Por fim, amostras de sedimento foram também coletadas com o auxílio de uma draga, acondicionadas em potes plásticos e mantidas em gelo até o transporte ao laboratório.

2.2. Análise de nutrientes e clorofila-*a* na água

As concentrações dos nutrientes totais, dissolvidos, sólidos em suspensão e clorofila-*a* foram analisadas no laboratório de Limnologia do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências da USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Pompêo, seguindo os protocolos abaixo (Tabela 1):

Tabela 1 – Protocolos utilizados para análise de nutrientes totais, dissolvidos, sólidos em suspensão e clorofila-*a*.

Variável	Limite de detecção do método	Unidade	Método	Referência
Nitrogênio total	< 5.0	µg/L	Espectrofotométrico	(Valderrama, 1981)
Fósforo total	< 10.0	µg/L	Espectrofotométrico	(Valderrama, 1981)
Nitrato dissolvido	< 5.0	µg/L	Espectrofotométrico	(Mackereth *et al*., 1978)
Nitrito dissolvido	< 8.0	µg/L	Espectrofotométrico	(Mackereth *et al*., 1978)
Amônio dissolvido	< 4.2	µg/L	Espectrofotométrico	(Koroleff, 1976)
Ortofosfato	< 10.0	µg/L	Espectrofotométrico	(Strickland e Parsons, 1965)
Clorofila-*a*	--	µg/L	Espectrofotométrico	(Wetzel e Likens, 1991)
Sólidos totais	--	mg/L	Gravimétrico	(Wetzel e Likens, 1991)

2.3. Índice de Estado Trófico

Para avaliar o grau de trofia, o Índice do Estado Trófico (IET) foi calculado utilizando os dados de clorofila-*a* e fósforo total, de acordo com a equação de Lamparelli (2004):

$$\textbf{IET(Cla)} = 10\text{x}\left\{6 - \left[0{,}92 - 0{,}34\left(\frac{\ln \text{Cla}}{\ln 2}\right)\right]\right\}$$

$$\textbf{IET (FT)} = 10\text{x}\left\{6 - \left[1{,}77 - 0{,}42\left(\frac{\ln \text{PT}}{\ln 2}\right)\right]\right\}$$

onde:

Cla: concentração de clorofila-*a* medida à superfície da água em ug/L;

FT: concentração de fósforo total medido à superfície da água em ug/L;

Ln: logaritmo natural

Os limites foram definidos de acordo com a ponderação entre as duas fórmulas e estão apresentados na Tabela 2.

$$\mathbf{IET} = \left[\frac{IET(PT) + IET(Cla)}{2}\right]$$

Tabela 2 – Classificação do estado trófico (IET) em reservatórios segundo Lamparelli (2004).

Categoria	**Ponderação**
Ultraoligotrófico	IET ≤ 47
Oligotrófico	47 < IET ≤ 52
Mesotrófico	52 < IET ≤ 59
Eutrófico	59 < IET ≤ 63
Supereutrófico	63 < IET ≤ 67
Hipereutrófico	IET > 67

3. Resultados

3.1. Quantificação de parâmetros físico-químicos

Os reservatórios apresentaram uma variação temporal da temperatura e oxigênio dissolvido (OD), de modo que no verão em ambos os anos, quando a temperatura da água esteve alta, foram observados os menores valores de OD, principalmente nos pontos Embu-Guaçu do reservatório Guarapiranga e Bororé do reservatório Billings. Em alguns casos, os valores de OD estiveram abaixo, inclusive, do estabelecido pela resolução CONAMA nº 357/2005. O pH apresentou pequenas variações ao longo do ano, se mantendo na faixa da neutralidade em todos os ambientes com exceção de Embu-Guaçu no verão de 2017 (Tabela 3).

Tabela 3 – Variáveis físico-químicas da água no centro dos reservatórios de Ponte Nova, nos pontos Embu-Guaçu (EG) e Barragem (Ba) do reservatório Guarapiranga e dos pontos Taquacetuba (Ta) e Bororé (Bo) do reservatório Billings (verão e inverno de 2017 e verão de 2018).

Coleta	Variáveis	CONAMA	Ponte Nova	Guarapiranga		Billings	
				EG	Ba	Ta	Bo
Mar de 2017	**Temperatura (°C)**	NC	25	22,9	25	25,6	26,1
	OD (mg/L)	> 5,0 6	NO	6,5	6,2	7,5	**4,2***
	pH	6,0-9,0	7,3	**5,5***	7,5	7,5	6,7
Jul-Ago de 2017	**Temperatura (°C)**	NC	17,6	16,2	16,7	18,5	18,2
	OD (mg/L)	> 5,0	8,5	6,5	7,1	8,8	6,8
	pH	6,0-9,0	NO	7,7	7,7	7,4	7,2
Jan de 2018	**Temperatura (°C)**	NC	25,7	21,5	24	24,1	24
	OD (mg/L)	> 5,0	7,2	**3,9***	5,4	9	**4,9***
	pH	6,0-9,0	6,7	6,4	7,4	8,7	8,6

*Símbolos representam variáveis em desacordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005 para águas doces de classe 1. NC – Não consta na resolução CONAMA nº 357/2005. NO - Valores não obtidos.

3.2. Quantificação de sólidos totais, nutrientes e clorofila-*a* na água

O reservatório de Ponte Nova apresentou, para a maioria dos nutrientes analisados, valores abaixo do limite de detecção do método nos três períodos amostrados, consequentemente abaixo dos valores estabelecidos pela resolução CONAMA nº 357/2005. O ponto Barragem do reservatório Guarapiranga e os pontos Taquacetuba e

Bororé do reservatório Billings apresentaram concentrações elevadas de todos os nutrientes analisados e também de clorofila-*a*, excedendo os limites estabelecidos pela resolução CONAMA nº 357/2005 em todos os períodos de coleta (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração de sólidos totais, nutrientes e clorofila-*a* da água do centro dos reservatórios de Ponte Nova (PN), nos pontos Embu-Guaçu (EG) e Barragem (Ba) do reservatório Guarapiranga e dos pontos Taquacetuba (Ta) e Bororé (Bo) do reservatório Billings (verão e inverno de 2017 e verão de 2018).

Coleta	Variáveis	CONAMA Valor máximo	Ponte Nova	Guarapiranga		Billings	
				EG	Ba	Ta	Bo
Mar de 2017	**Sólidos dissolvidos totais (mg/L)**	NC (500mg/L)	3,5	4	6,4	8	18
	Nitrito (µg/L)	1,0 mg/L	0,7	**5,1***	**113,5***	**75,3***	**124,6***
	Nitrato (µg/L)	10,0 mg/L	--	**83,7***	**623,2***	**307,2***	**431,0***
	Amônio (µg/L)	NC	--	132,8	69,4	144,2	--
	Fósforo Total (µg/L)	0,02 mg/L-0,10[a]	--	--	**52,3***	**71,4***	**166,3***
	Nitrogênio Total (µg/L)	< 0,025	--	**530,9***	**429,6***	**536,1***	**579,2***
	Cla (µg/L)	10	6,9	**52,3***	**42,4***	**52,4***	**143,5***
Jul-Ago de 2017	**Sólidos dissolvidos totais (mg/L)**	NC	6,6	4,3	9,5	19	9,4
	Nitrito (µg/L)	1	**1,4**	**3,1***	**4,1***	**5,3***	**5,5***
	Nitrato (µg/L)	10	**23,8***	**22,1***	**36,0***	**36,5***	**94,6***
	Amônio (µg/L)	NC	--	--	--	35	63,2
	Fósforo Total (µg/L)	0,02	--	**22,5***	**25,5***	**25,2***	**22,2***
	Nitrogênio Total (µg/L)	< 0,025	**160,7***	**305,5***	**304,1***	**462,6***	**690,0***
	Cla (µg/L)	10	5,33	5,3	**17,4***	**111,7***	**46,5***
Jan de 2018	**Sólidos dissolvidos totais (mg/L)**	NC	5,6	5,6	4,8	7,2	9,2
	Nitrito (µg/L)	1	**1,9***	**2,8***	**7,4***	**5,1***	**5,7***
	Nitrato (µg/L)	10	EA	EA	EA	EA	EA
	Amônio (µg/L)	NC	--	36,5	--	--	--
	Fósforo Total (µg/L)	0,02	--	--	**17,5***	**13***	**16,9***
	Nitrogênio Total (µg/L)	< 0,025	**282,6***	**433,3***	**236,9***	**238,2***	**303,9***
	Cla (µg/L)	10	4,8	**15***	**37,4***	**28,9***	5,3

*Símbolos representam variáveis que estão em desacordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005 para águas doces de classe 1. -- Valores abaixo do limite de detecção do método. NC – Não consta na resolução CONAMA nº 357/2005. EA: em análise; Cla: clorofila-*a*.

3.3. Índice de estado trófico

O reservatório de Ponte Nova apresentou baixa concentração de clorofila-*a*, que associada às baixas concentrações de fósforo total, permitiu classificar este reservatório como mesotrófico (Tabela 5). As concentrações de nitrito, nitrogênio total e clorofila-*a* no ponto Embu-Guaçu do reservatório Guarapiranga, foram as que mais apresentaram alterações em relação à resolução CONAMA nº357/2005 e, de acordo com o IET apresentado nos três períodos de amostragem, foram considerados, no geral, como locais eutróficos (Tabela 5). Os valores de IET durante as duas estações classificam os pontos Barragem (Guarapiranga), Taquacetuba e Bororé (do reservatório Billings) como supereutróficos (Tabela 5). Cabe mencionar que alguns pontos foram hipereutróficos durante estações específicas (Barragem durante o verão; Taquacetuba durante o verão e inverno; e Bororé no verão) (Tabela 5).

Tabela 5 – Índice de Estado Trófico (IET) dos reservatórios de Ponte Nova (PN), dos pontos Embu-Guaçu (EG) e Barragem (Ba) do reservatório Guarapiranga e dos pontos Taquacetuba (Ta) e Bororé (Bo) do reservatório Billings (verão e inverno de 2017 e verão de 2018).

Coleta	Variáveis	Ponte Nova	Guarapiranga		Billings	
			EG	Ba	Ta	Bo
Mar de 2017	IET(FT)	53,6*	53,6*	66,3	68,2	73,3
	IET(Cla)	60,3	70,2	69,2	70,2	75,2
	IET (média)	57,0	61,9	67,7	69,2	74,2
		Mesotrófico	Eutrófico	Hipereutrófico	Hipereutrófico	Hipereutrófico
Jul-Ago de 2017	IET(FT)	53,6*	61,2	61,9	61,9	61,1
	IET(Cla)	59,0	59,0	64,8	73,9	69,6
	IET (média)	56,3	60,1	63,4	67,9	65,4
		Mesotrófico	Eutrófico	Supereutrófico	Hipereutrófico	Supereutrófico
Jan de 2018	IET(FT)	53,6*	53,6*	59,6	57,8	59,4
	IET(Cla)	58,5	64,1	68,6	67,3	59,0
	IET (média)	56,1	58,9	64,1	62,6	59,2
		Mesotrófico	Mesotrófico	Supereutrófico	Eutrófico	Eutrófico

*Símbolos representam valores de IET (FT) onde a variável de fósforo total (µg/L) esteve abaixo do limite de detecção do método (Tabela 4). Para o cálculo do IET considerou-se um valor mínimo de 6,5 µg/L de fósforo total (FT) que pertencem à metade do limite de detecção do método. IET: índice de estado trófico.

4. Discussão

Os reservatórios estudados apresentaram graus de trofia e qualidade da água claramente diferenciada, devido principalmente às concentrações de nutrientes, que foram mais elevadas nos braços Bororé e Taquacetuba do reservatório Billings e, Barragem do reservatório Guarapiranga no verão. Dessa forma, foi possível estabelecer um gradiente de eutrofização partindo de um ponto mesotrófico (reservatório de Ponte Nova), eutrófico (braço Embu-Guaçu, reservatório Guarapiranga), e pontos supereutrófico (braços Barragem: Reservatório Guarapiranga, Taquecetuba e Bororé: Reservatório Bilings); cabe mencionar que alguns pontos foram hipereutróficos durante estações específicas (Barragem e Bororé, verão; Taquacetuba, ambas estações de 2017) (Lamparelli, 2004) quando apresentaram os valores de fósforo total, clorofila-*a* mais elevados. Segundo Pompêo *et al*. (2015) a elevação da carga de nutrientes, principalmente N (Nitrogênio) e P (Fósforo), acarreta no aumento do estado trófico dos corpos de água e como consequência pode haver a diminuição da diversidade biológica, a mortandade dos organismos e a maior floração de algas, em particular cianobactérias potencialmente tóxicas. O processo da eutrofização ocorre pelo enriquecimento das águas por nutrientes e pela contribuição de fatores físicos como a transparência, temperatura e regime hídrico do corpo d'água, resultando no crescimento de seres fotossintetizantes, como as comunidades fitoplanctônicas e as plantas flutuantes. Em níveis baixos, a eutrofização pode ser benéfica, pois aumenta a produtividade dos corpos hídricos. Em níveis excessivos, pode causar interferências estéticas e recreacionais; variações acentuadas do oxigênio dissolvido, provocando a mortandade dos animais, dentre estes os peixes; sedimentação da matéria orgânica em decomposição no fundo dos corpos de água; crescimento extensivo de macrófitas aquáticas (por exemplo, aguapés) que interferem nos diferentes usos da água favorecendo o desenvolvimento de larvas de insetos e parasitas; desenvolvimento de cianobactérias potencialmente tóxicas à saúde humana e animal e que podem causar problemas de tratamento nas Estações de tratamento de água ETAs (CETESB, 2003), isto porque os tratamentos convencionais não removem as moléculas de toxina liberadas pelas cianobactérias (Pompêo *et al*., 2015)

Poucas variáveis físicas e químicas excederam os valores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº357 (Brasil, 2005) no reservatório de Ponte Nova, com exceção dos nutrientes, como nitrito, nitrato e nitrogênio total que apresentaram valores altos em

alguns períodos de coleta. Segundo Toledo *et al.* (1981) e Monteiro-Júnior (2006), a água do reservatório de Ponte Nova é rica em nutrientes e esse enriquecimento pode inclusive desencadear proliferações excessivas de algas em algumas ocasiões. Sant'Anna *et al.* (2007) avaliaram algumas variáveis de qualidade da água em 6 reservatórios da Bacia do Rio Tietê entre 1997 e 2003, e observaram que apenas o reservatório de Ponte Nova apresentou baixas concentrações de fósforo e nitrogênio total em comparação aos reservatórios Billings, Guarapiranga, Taiaçupeba, Pirapora e Jundiaí, sendo Ponte Nova considerado oligotrófico por estes autores. No presente trabalho, essas diferenças entre os reservatórios foram também corroboradas. Em nosso estudo, Ponte Nova classificou-se como mesotrófico, mas as características da água apresentaram baixas concentrações de sólidos totais, nutrientes e clorofila-*a* na água. É importante destacar que o reservatório apresenta condições favoráveis e que esta região da Bacia (Alto Tietê e Cabeceiras) reúne áreas de mananciais sob proteção ambiental com regiões parcialmente preservadas (Marceniuk e Hilsdorf, 2010). Estas características levaram Ponte Nova a ser escolhido como reservatório referência.

De modo geral, o excessivo despejo de esgoto nos reservatórios Billings e Guarapiranga tem resultado em aumento das concentrações de fósforo, compostos nitrogenados e, consequentemente de clorofila-*a* na água, ao longo de todo o ano, o que favorece o crescimento das algas, permitindo um intenso processo de eutrofização artificial (Carpenter, 2005; CETESB, 2015, SEADE, 2015). No presente trabalho, foram encontrados altos valores de compostos nitrogenados, além de fósforo total, que juntamente com os valores de clorofila-*a* confirmaram o intenso processo de eutrofização destes ambientes. Moschini-Carlos *et al.* (2010) avaliaram as condições limnológicas do braço Taquacetuba e encontraram que os valores de clorofila-*a* e fósforo total, principalmente no inverno excederam muitos os limites permitidos pela Resolução CONAMA nº 357 (Brasil, 2005), podendo ser categorizado como água Classe IV. Valores altos de oxigênio dissolvido observados neste reservatório, devem-se ao *bloom* de algas, principalmente cianobactérias, e indicam também o estado de eutrofização do corpo de água, que pode ser favorecido pelas cargas poluidoras afluentes ao reservatório, através do bombeamento das águas do Rio Pinheiros para controle das cheias (CETESB, 2012). O mesmo ocorre com o reservatório Guarapiranga, que apresenta concentrações altas de clorofila-*a* e fósforo total sendo classificado como eutrófico desde 1960, embora nos

últimos anos possa ser classificado como hipereutrófico (Beyruth, 2000; CETESB, 2014-2017; López-Doval *et al.*, 2017).

Nos reservatórios Billings e Guarapiranga os dados mostraram diferenças entre os pontos amostrados, evidenciando uma compartimentalização interna dos reservatórios. No reservatório Billings, o braço Taquacetuba se apresentou com características piores do que o Braço Bororé, principalmente em relação à concentração de nutrientes e IET, sendo maior no Taquacetuba. A existência de diferentes compartimentos em ambos os reservatórios já foi anteriormente descrita (Moschini-Carlos *et al.*,2010; Oliveira, 2012; Pompêo *et al.* 2013, López-Doval *et al.*, 2017; Cardoso-Silva *et al.*, 2018;). Este padrão observado pode ser atribuído à presença de pontos de poluição difusa e a entrada de nutrientes nos reservatórios.

É importante também destacar que o ponto Embu-Guaçu no reservatório Guarapiranga se apresentou menos impactado, com valores de nutrientes como o fósforo total, sólidos dissolvidos totais e clorofila-*a* algumas vezes semelhantes, sobretudo no verão, no reservatório de Ponte Nova, que está localizado em uma área de baixa pressão urbana na RMSP. O braço Embu-Guaçu é influenciado por influxos do rio Embu-Guaçu, o principal tributário do reservatório Guarapiranga, portanto a hidrodinâmica e os processos biológicos refletiram características lóticas.

5. Conclusões

De modo geral, de acordo com as análises físico-químicas e IET, poucas variáveis excederam os valores estabelecidos pela resolução CONAMA nº 357 no reservatório de Ponte Nova, com exceção dos nutrientes em algumas estações do ano, caracterizando o ambiente como mesotrófico e com água de boa qualidade. A hipótese de que os reservatórios Billings e Guarapiranga apresentam diminuição da qualidade da água foi corroborada, pois altas concentrações de nutrientes foram detectadas nos braços Embu-guaçu (Gua), classificado como eutrófico, Barragem (Gua), Taquacetuba e Bororé (Bil) classificados como supereutrófico, devido ao intenso descarte de esgoto doméstico e industrial, e com água de baixa qualidade. A condição hipereutrófica foi presente durante meses específicos (Barragem e Bororé, verão 2017 e Taquacetuba, ambas estações de 2017), evidenciando o depreciar ainda mais acentuado da qualidade da água nesses reservatórios poluídos, mas refutando nossa hipótese inicial de que no período de seca o grau de trofia seria mais elevado nos reservatórios impactados.

Referências Bibliográficas

Brasil. Resolução CONAMA nº 357, de 17 março de 2005. Poder Executivo, Brasília (DF). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 58-63.

Beyruth, Z. 2000. Periodic disturbances, trophic gradient and phytoplankton characteristics related to cyanobacterial growth in Guarapiranga reservoir. São Paulo State. Brazil. *Hydrobiologia*, 424(1–3): 51–65.

Cardoso-Silva, S.; López-Doval, J.; Moschini-Carlos, V.; Pompêo, M. 2018. Metals and limnological variables in an urban reservoir: compartmentalization and identification of potential impacted areas. *Environmental Monitoring and Assessment*,190(1):19.

Carmo, C.E.; Henry, R.; Bicudo, D.C.; Bicudo, C.E.M. 2002. A degradação nos reservatórios do PEFI. *In:* Bicudo, D.C.; Forti, M.C.; Bicudo, C.E.M. (eds). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): uma unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. *Acta Botanica Brasilica*, 21 (1): 273-296.

Carpenter, S.R. 2005. Eutrophication of aquatic ecosystems: stability and soil phosphorus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(29):10002-10005.

CETESB. 2003. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório 2003: Qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. São Paulo: *Companhia Ambiental do Estado de São Paulo*.

CETESB. 2012. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório 2013: Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. São Paulo: *Companhia Ambiental do Estado de São Paulo*.

CETESB. 2014. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório 2013: Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. São Paulo: *Companhia Ambiental do Estado de São Paulo*.

CETESB.2015. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório 2014: Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. São Paulo: *Companhia Ambiental do Estado de São Paulo*.

CETESB. 2016. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório 2015: Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. São Paulo: *Companhia Ambiental do Estado de São Paulo*.

CETESB. 2017. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório 2016: Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. São Paulo: *Companhia Ambiental do Estado de São Paulo*.

COLE, G.A. 1979. Textbook of limnology. St. Louis: *The C.V. Mosby Company*, 426.

Cropper, B.M.; Griffiths, C. 2016. American Economic Association The Interaction of Population Growth and Environmental Quality Author (s): Maureen Cropper and Charles Griffiths Source. *The American Economic Review*, (2): 84.

Koroleff, F. 1976. Determination of nutrients: 1. Phosphorus, in: Grasshoff, K. (Ed.) *Methods of seawater analysis*, 117-126.

Lamparelli, M.C. 2004. Graus de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 235.

López-Doval J.C.; Montagner C.C.; de Alburquerque A.F.; Moschini-Carlos V; Umbuzeiro G.; Pompêo M. 2017. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: spatial distributions and risk assessment. *Science of the Total Environment*, 575:1307–1324.

Mackereth, F.J.H.; Heron, J.; Talling, J.F. 1978. Water Analysis: some revised methods for Limnologists. *Freshwater Biology*, 51: 1131-1148.

Marceniuk, A.P.; Hilsdorf, A.W.S. 2010. Peixes das cabeceiras do rio Tietê e Parque das Neblinas. Bauru, SP: *Editora Canal 6*, (1): 157.

Monteiro-Júnior, A.J. 2006. Caracterização limnológica e compartimentalização do reservatório de Ponte Nova, Alto Tietê, SP – uma contribuição ao seu manejo. São Paulo: Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, 96.

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. Taubaté: *Ambi-água - Revista Ambiente and Água: An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 5(3): 47-59.

Oliveira, T.A. 2012. Metais presentes na água e em tecidos de peixes da represa Billings: uma avaliação temporal. Dissertação de mestrado. São Paulo: Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 215.

Pompêo, M.L.M.; Padial, P.R.; Mariani, C.F.; Cardoso-Silva, S.; Moschini-Carlos V.; Silva, D.C.V.R.; Paiva, T.C.B.; Brandimarte, A.L. 2013. Biodisponibilidade de metais no sedimento de um reservatório tropical urbano (reservatório Guarapiranga – São Paulo (SP), Brasil): há toxicidade potencial e heterogeneidade espacial? *Geochimica Brasiliensis*, 27(2): 104-119.

Pompêo, M.L.M.; Moschini-Carlos, V.; Nishimura, P.Y.; Cardoso-Silva, S.; López-Doval, J.C. 2015. Ecologia de reservatórios e interfaces. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 25: 376-395

Rouf, A.J.M.A.; Ambak, M.A.; Shamsudin, L.; Phang, S.; Ho, S.C, 2008. Temporal changes in the peryphitic algal communities in a drowded tropical forest reservoir in Malaysia: Lake Kenyer. *Lakes and Reservoir*, 13: 271-287.

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 14 de fevereiro de 2019.

Sant'Anna, C.; Melcher, S.S.; Carvalho, M.C.; Gemelgo, M.P.; Azevedo, M.T.P. 2007. Planktic Cyanobacteria from Upper Tietê basin reservoirs, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, 30(1): 1-15.

SEADE, 2015. Portal de Estadísticas do Estado de São Paulo, Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados. Available from http://produtos.seade.gov.br/produtos/msp/index.php?ti*P* = met4&opt=s&tema=SNE&subtema=2. Acesso em 10 de fevereiro de 2019.

Straskraba, M.; Tundisi, J.G. 2000. Gerenciamento da qualidade da água de represas: São Carlos. *Rima*, 9(3): 258.

Strickland, J.D.H.; Parsons, T.R. 1965. A manual of sea water analysis with special reference to the more common micronutrients and to particulate organic material. ed. 2. Ottawa: *Fisheries Research Board of Canada*, 203.

Toledo Jr, A.P.; Chinez, S.J.; Agudo, E.G. 1981. Estudo da eutrofização no reservatório de Ponte Nova. Fortaleza, CE: *XI Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*.

Tundisi, J.G. 2005. Gerenciamento integrado de bacias hidrográficas e reservatórios: estudos de casos e perspectivas. *In:* Nogueira, M.G.; Henry, R.; Jorcin, A. (eds). Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata. São Carlos: *Rima*, 459.

Tundisi, J.G; Matsumura-Tundisi, T. 2008. Limnologia. São Paulo: *Oficina de Textos Editora*, 632.

Valderrama, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10 (2): 109-122.

Wetzel, R.G.; Likens, G.E. 1991. Limnological analysis. New York: *Springer-Verlag*, 1(2): 391.

Wetzel, R.G. 2001. Limnology: lake and river ecosystems. San Diego: *Academic Press*, 1(3): 1006.

Uso integrado de biomarcadores no estudo da fisiologia reprodutiva de machos de *Astyanax fasciatus* em reservatórios poluídos

Resumo

A fisiologia reprodutiva em peixes e demais organismos aquáticos podem ser alterada pela presença de poluentes na água, que podem atuar como desreguladores endócrinos (EDC). O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto do grau de eutrofização da água do reservatório Billings sobre a fisiologia reprodutiva de machos de *A. fasciatus*, utilizando-se biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica. Machos adultos foram coletados em duas estações do ano (verão e inverno) em dois pontos distintos da mesma bacia hidrográfica: o reservatório de Ponte Nova (PN) considerado ponto de referência por sofrer menor influência antrópica e o reservatório Billings (Bil) nos pontos Bororé e Taquacetuba, sujeitos a um grande impacto antropogênico. Índices biológicos, como índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS), histomorfologia gonadal e biomarcadores fisiológicos, como níveis plasmáticos de testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-KT) e estradiol (E_2), bem como expressão gênica hepática de vitelogenina (VTG-A) e hormônio folículo estimulante (FSH), foram analisados. Os machos coletados nos reservatórios não apresentaram uma variação no IGS e no IHS durante as estações coletadas. As condições encontradas na água da Billings interferiram em biomarcadores de efeitos biológicos (concentração plasmática de T, 11-KT e E_2,) em *A. fasciatus*. Já na Ponte Nova (referência), os biomarcadores analisados não diferiram entre as duas estações do ano, o que pode ser considerada mais uma evidência de que estes animais mantêm atividade reprodutiva ao longo das duas estações. O biomarcador de exposição (expressão gênica de VTG-A) sustenta a hipótese de que o elevado grau de eutrofização na Billings desencadeia respostas estrogênicas em machos de *A. fasciatus* e que estas respostas diferem ao longo do ano. Os resultados permitem sugerir que os contaminantes presentes na Billings interferem na atividade esteroidogênica em *A. fasciatus*, mas a plasticidade e a estratégia reprodutiva da espécie permite a reprodução em um ambiente com alto grau de eutrofização.

Palavras-chave: Hormônio folículo-estimulante, esteroides gonadais, testículos, impacto antropogênico, vitelogenina.

Abstract

Reproductive physiology in fish and other aquatic organisms can be altered by the presence of pollutants in the water, which can act as endocrine disrupters (EDC). The objective of the present study was to evaluate the impact of the water eutrophication degree of Billings reservoir on the reproductive physiology of *A. fasciatus* males, using biomarkers at different levels of biological organization. Adult males were collected in two seasons (summer and winter) at two different points in the same basin: the Ponte Nova reservoir (PN) considered a reference point due to lower anthropic influence and the Billings reservoir (Bil) at Bororé and Taquacetuba points, subjected to a great anthropogenic impact. Biological indexes, such as hepatosomatic index (HSI) and gonadosomatic index (GSI), gonadal histomorphology and physiological biomarkers, such as testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT) and estradiol (E_2) plasma levels, as well as hepatic gene expression of vitellogenin (VTG-A) and follicle stimulating hormone (FSH) were analyzed. The males collected in the reservoirs did not present a variation in GSI and HSI during seasons. The conditions found in Billings water interfered with the biomarkers of biological effects (plasma levels of T, 11-KT and E_2) in *A. fasciatus*. At Ponte Nova reservoir (reference), the biomarkers analyzed did not differ between the two seasons of the year, which may be considered an evidence that these animals maintain reproductive activity throughout the two seasons. The exposure biomarker (VTG-A gene expression) supports the hypothesis that the high degree of eutrophication in Billings triggers estrogenic responses in *A. fasciatus* males and that these responses differ throughout the year. The results suggest that contaminants present in Billings interfere with esteroidogenic activity in *A. fasciatus*, but the plasticity and reproductive plasticity of this species allows reproduction in an environment with a high degree of eutrophication.

Keywords: Follicle-stimulating hormone, gonadal steroids, testes, anthropogenic impact, vitellogenin

1. Introdução

A introdução de contaminantes no meio ambiente devido às atividades antropogênicas pode causar efeitos adversos na saúde humana, bem como em populações de animais selvagens (Vázquez *et al*., 2009). Entre os contaminantes que afetam os processos fisiológicos da biota aquática estão os compostos que promovem desregulação endócrina (EDCs), que são definidos como compostos que podem interferir com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturalmente secretados. Um grande número de EDCs presentes em ambientes naturais tem origem no descarte inadequado de esgoto em estações de tratamento de águas residuais (Tan *et al*., 2007; Hassell *et al*., 2016). Os EDCs podem agir em diferentes vias que envolvem muitos processos fisiológicos, como a reprodução, mimetizando os hormônios estrogênicos (Vázquez *et al*., 2009), androgênicos (Sone *et al*., 2005) afetando a diferenciação sexual (Baroiller e Guiguen, 2001), desenvolvimento gonadal (Vested *et al*., 2014) e podendo até mesmo induzir a síntese de vitelogenina em machos (Moncaut *et al*., 2003; Vetillard e Bailhache, 2006; Tolussi *et al*., 2018).

Esses estudos mostraram que os poluentes podem afetar vários processos fisiológicos envolvidos na reprodução em diferentes níveis, levando potencialmente a perdas populacionais. Vários tipos de compostos são capazes de atuar como EDCs e afetar os processos reprodutivos em peixes, como anti-inflamatórios (Fernandes *et al*., 2011; Ji *et al*., 2013) e metais (Correia *et al*., 2010; Vieira *et al*., 2013; Kida *et al*., 2016), que podem exibir atividade semelhante ao estrogênio e interferir com os receptores de estradiol (Orn *et al*., 2006; Xu *et al*., 2008; Flick *et al*., 2014), estimulando a síntese de vitelogenina (VTG-A) (Scholz *et al*., 2004; Muncke e Eggen, 2006; Salierno e Kane, 2009).

O reservatório Billings é caracterizado por intensa atividade antrópica, como presença de esgoto doméstico e efluentes industriais, desmatamento e uso extensivo da terra (Mariani e Pompêo, 2008; Moschini-Carlos *et al*., 2010). Metais como chumbo, cromo, mercúrio e zinco também foram detectados em tecidos de peixes desde a década de 1980 em vários pontos deste reservatório (Rocha *et al*., 1985). Em um estudo anterior, o braço Taquacetuba da Billings, foi considerado supereutrófico, evidenciando a presença de uma grande diversidade de poluentes entre metais e compostos orgânicos (Gomes *et al*., 2016). Esta represa apresenta uma baixa riqueza de espécies, no entanto uma elevada

abundância de teleósteos, com destaque para tilápia (*Oreochromis niloticus*), lambaris (*Astyanax sp*.) e bagres (*Rhamdia sp*.) (Castro *et al*., 2009). No entanto, quando o ecossistema é degradado, como é o caso deste reservatório, é difícil entender se os efeitos observados nos organismos que habitam esta área, são devido à ação de contaminantes ou devido a outros estressores, como hipóxia ou mudanças na cadeia alimentar (Hook *et al*., 2014).

Para avaliar o efeito da poluição ambiental, biomarcadores de efeitos biológicos e de exposição são necessários (Broerg *et al*., 2005; Hook *et al*., 2014). De acordo com Hook *et al*. (2014), biomarcadores de efeitos biológicos são indicadores de alterações fisiológicas ou bioquímicas decorrentes da exposição, como índices de condição ou níveis hormonais circulantes. Já os biomarcadores de exposição são indicadores de contaminantes específicos ou com modos de ação semelhantes, que evidenciam uma resposta precoce aos contaminantes e são específicos de uma classe de contaminantes. Um exemplo de biomarcador de exposição é a detecção e/ou expressão de vitelogenina em machos desencadeada por compostos estrogênicos (Desforges *et al*., 2010)

Entre os Characiformes, *Astyanax* é o gênero mais rico em número de espécies (Lima *et al*., 2003), e com diferentes estratégias reprodutivas, relacionadas à extensão do ciclo reprodutivo e/ou tipo de desova (Carvalho *et al*., 2009; Veloso-Júnior *et al*., 2009; Dala-Corte e Azevedo, 2010; Souza *et al*., 2019). Em geral, as espécies do gênero *Astyanax* são de pequeno porte e se caracterizam por apresentar ovócitos pequenos, rápido desenvolvimento, elevada fecundidade, fertilização externa e ausência de competição, que garantem altas taxas de aumento populacional, permitindo a essas espécies rápida colonização de novos ambientes e amplo predomínio sobre as demais (Agostinho *et al*., 1999). *Astyanax fasciatus*, comumente conhecido como lambari-do-rabo-vermelho é uma das espécies frequentemente encontradas no reservatório Bilings. É um pequeno peixe onívoro considerado importante presa de espécies carnívoras (Vilella *et al*., 2002; Gurgel, 2004). Esta espécie pode apresentar diferentes estratégias reprodutivas, que variam com as condições ambientais, apresentando desenvolvimento assincrônico ou sincrônico em grupos de ovócitos (Silva *et al*., 2010; Souza *et al*., 2019b). Sua distribuição é muito ampla, atingindo toda a América Central e do Sul, sendo encontrada em áreas limpas e poluídas. Estas características contribuíram para a escolha de *A. fasciatus* como espécie para estudos de ensaios ambientais e toxicológicos (Schulz e Martins-Júnior, 2001;

Alberto *et al*., 2005; Carrasco-Letelier *et al*., 2006; Prado *et al*., 2011; Tolussi *et al*., 2018).

Considerando o exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto da poluição do reservatório Billings sobre a fisiologia reprodutiva de machos de *A. fasciatus*, utilizando-se biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica. A hipótese deste estudo é que machos de *A. fasciatus* vivendo em ambiente com elevado impacto antrópico apresentarão respostas estrogênicas, e que estas respostas diferem ao longo das estações do ano.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização da área de estudo

A área de estudo compreendeu os dois reservatórios descritos no capítulo 1, sendo o reservatório de Ponte Nova (PN) considerado como a local referência e o braço Taquacetuba e Bororé no reservatório Billings (Bil), considerados como locais impactados.

2.2. Captura dos animais e coleta de amostras

Machos adultos da espécie *Astyanax fasciatus* foram capturados nos pontos previamente estabelecidos nos reservatórios Ponte Nova (referência) e no braço Taquacetuba e Bororé do reservatório Bil (impactado), descritos no capítulo 1, utilizando-se rede de espera com tamanho da malha número 13. As coletas foram realizadas no verão (2017) e inverno (2017). O número de indivíduos coletados por estação em cada ambiente é apresentado no Apêndice 1 e esse foi o número utilizado em todas as análises realizadas no presente estudo.

Os procedimentos de coleta (Figura 1) dos tecidos foram realizados em campo no mesmo dia da captura dos animais. Primeiramente os animais foram anestesiados com 1 g de benzocaína previamente diluída em 10 mL de etanol, que foram adicionados posteriormente na água. Amostras de sangue foram coletadas através da vasculatura caudal utilizando-se seringas e agulhas heparinizadas, para análise de esteroides plasmáticos. Em seguida, esses animais foram eutanasiados por secção da medula

espinhal na altura do opérculo. Os dados morfométricos e ponderais foram registrados e, após dissecção, testículos e fígado foram pesados para o cálculo dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS), respectivamente, seguindo o cálculo abaixo:

Índice: [(massa do órgão/massa corpórea) x 100]

Amostras de fígado e hipófise foram coletadas e mantidas em freezer –80 ºC até o processamento para análises de expressão gênica da *vtgA* e *fshb*, respectivamente. Para confirmar o estádio e maturação gonadal, amostras do terço médio dos testículos foram fixadas em solução de Bouin acético por 24 horas e então transferidas ao etanol (70º GL), para posterior análise histológica.

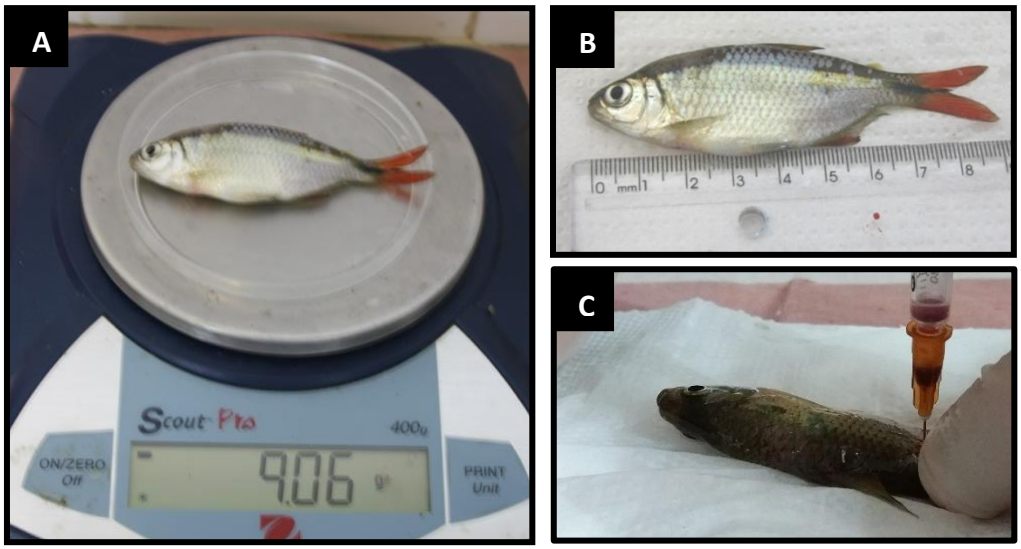


Figura 1 – Machos adultos de *A. fasciatus* coletados nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba) durante as estações de verão e inverno. (**A**) registro da massa total; (**B**) registro do comprimento total (**C**) coleta de sangue.

2.3. Análise histológica dos testículos

Para confirmação do estádio de maturação gonadal, após a coleta e pesagem dos testículos, fragmentos foram devidamente identificados e fixados em solução Bouin por 24h, para depois serem transferidos para etanol 70%. Em seguida, as amostras foram desidratadas por 1 hora em solução de etanol 80%, 1 hora em solução de etanol 95% e depois lavadas durante duas vezes por 1 hora em etanol absoluto. Posteriormente, as peças foram diafanizadas por 2 horas em xilol e em seguida infiltradas em Paraplast® (Erv-Past,

Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda), permanecendo em estufa a 60°C por 5 horas e emblocadas em paraplast. Cortes de 5 µm foram realizados em micrótomo (Leica-RM/2255, equipado com lâminas descartáveis), os quais foram montados em lâminas previamente limpas com etanol 70%, com polilisina (Poly-Lysine Solution – Sigma Diagnostics INS, St. Louis M. O. USA) diluída em 1:3 (em água destilada), para auxiliar a fixação dos cortes nas lâminas. A seguir, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina de acordo com os procedimentos histológicos rotineiros (Behmer *et al*., 1976), desidratados, diafanizados e montados com lamínula e meio de montagem (goma Damar). A análise dos cortes histológicos foi realizada com o uso do Microscópio Leica DM2500 e as fotomicrografias foram obtidas utilizando o software *Leica Application Suite Professional* (LAS V 3.6). A análise foi realizada no Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos aquáticos (LAMEROA), do Departamento de Fisiologia, IBUSP.

A identificação das fases reprodutivas foi realizada de acordo com a nomenclatura proposta por Brown-Peterson *et al*. (2011), na qual o termo fase é usado para indicar o desenvolvimento gonadal, ao passo que o termo estágio indica o estágio de desenvolvimento dos gametas durante a gametogênese. Durante a gametogênese são reconhecidos os seguintes estágios de desenvolvimento: espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides. Nas análises histológicas foram identificadas cinco fases de desenvolvimento gonadal: imaturo, em desenvolvimento, apto à desovar, regressão e regeneração.

2.4. Concentração plasmática dos esteroides gonadais

As concentrações plasmáticas de 17b-estradiol (E_2), 11 cetotestosterona (11-KT) e testosterona (T) foram quantificadas pela técnica de ELISA com o uso de kits comerciais (*Cayman Chemical Company*, Michigan, USA), previamente validados em *A. fasciatus* (Tolussi *et al*., 2018). As amostras de plasma foram analisadas em duplicatas e seguindo as instruções específicas de cada kit. Ao final de cada ensaio, a absorbância das amostras foi analisada em 405 nm com um leitor de microplaca (*Spectra Max 250 Molecular Devices*) e os resultados expressos em pg ml^{-1}.

2.5. Análise da expressão gênica

2.5.1. Extração de RNA total

A extração de RNA total dos fragmentos do fígado de *A. fasciatus*, foi realizada com TRIzol® pelo método de extração por fenol-clorofórmio proposto por Chomczynski e Sacci (1987), homogeneizando o tecido de cada organismo em solução de extração de RNA TRIzol™Reagent (*Invitrogen Life Technologies*) numa proporção 1:20 (tecido / solução de extração). Cada fragmento de tecido foi homogeneizado com 1 ml de TRIzol® e incubado por 5 minutos em -4ºC. A seguir, as amostras foram precipitadas com 200 µL de clorofórmio, incubadas no gelo por 10 min e centrifugadas por 10 minutos a 12000 *g* em 4°C para a separação do RNA total e proteínas. A fase aquosa contendo o RNA total foi transferida para outro tubo. A esta fase foi adicionado 500 µL de isopropanol, seguindo-se incubação por 10 minutos em -4ºC. Após centrifugação por 10 minutos a 12000 *g* em 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado formou um *pellet*. Os *pellets* foram lavados com 1 ml de etanol 75%, agitados e novamente centrifugados por 10 minutos a 7500 *g* em 4°C.

A extração de RNA de hipófises individuais de *A. fasciatus* foi realizada com o Kit RNAaqueous Micro Kit AMBION (AM1931, Ambion, Carlsbad, CA, USA), segundo as especificações do fabricante. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. Ao final, cada *pellet* de RNA foi suspenso em água ultrapura livre de RNAse e em volumes variáveis de acordo com a amostra, sendo 40 ul e 20 ul, respectivamente para o fígado e a hipófise.

Após a extração do RNA, foi realizada a quantificação da concentração e análise da pureza do RNA total de cada amostra por meio de espectrofotômetro, pela medida da absorbância a A_{260nm} e A_{280nm}, por meio da relação A_{260}/A_{280} (considerando-se uma relação 260/280 OD como satisfatória entre os valores de 1,8 e 2) e concentração superior a 20ng/uL. A integridade do RNA total foi avaliada pela análise de eletroforese de gel denaturante de agarose 1%, em algumas amostras aleatórias, tendo em consideração a representatividade em cada grupo de coleta, mediante SyBR Safe DNA Gel staining (10.000x), utilizando o Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, EUA). A seguir, as amostras que cumpriam os critérios acima estabelecidos foram conservadas em -80 ºC até a sua utilização nos diferentes métodos realizados neste trabalho.

2.5.2. Síntese de cDNA

Para a remoção de possíveis DNAs contaminantes, o RNA total extraído de cada amostra foi tratado com DNAse *free* turbo Ambion, segundo as especificações do fabricante. O cDNA de cada amostra de RNA a ser utilizado nas reações de RT-PCR, foi sintetizado por meio da incubação de 1000 ng de RNA total na presença de 250 ng de random *primer*, 10 mM de dNTP's e água ultrapura, em um volume total de 13 µL. Esta solução foi incubada a 65°C por 5 min e em seguida, em gelo por 1 min, para a desnaturação das moléculas de RNA. Em seguida, foram adicionados 4 µL de tampão da enzima 5X, 1 µL de DTT, 1 µL de RNAse *inhibitor*, 1 µL de SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e água ultrapura, finalizando um volume total de 20 µL. Os tubos foram alocados no termociclador, seguindo a seguinte programação no termociclador: 5 minutos em 25°C, 1 h em 55°C e 15 minutos em 70°C. Ao final deste processo, cada amostra de cDNA foi aliquotada e mantida em -20ºC até o uso.

A integridade do cDNA foi avaliada por meio de RT-PCR para amplificação do gene *ef1α* (5´→3`, *Forward* TGGTACCTCTCAGGCTGAC, *Reverse* ACCAAGGGTGAAGGCCAG), que resultou na amplificação de produtos de tamanhos esperados para este gene de 121 pares de bases (pb). A partir de então, os cDNAs sintetizados foram destinados às reações de RT-PCR.

2.5.3. Desenho dos primers *fshb* e VTG-AVTG-A*A*

O *primer* do gene do *fshb* foi desenhado por Jesus *et al*. (2017) e o *primer* da *vtgA* (genbank KJ129623.1) foi desenhado por Tolussi *et al. (*2018) para *A. fasciatus*, os quais foram projetados a partir de regiões altamente conservadas das sequências nucleotídicas de *fshb* e *vtgA*, identificado após múltiplos alinhamentos das sequências disponíveis de *Astyanax mexicanus* e espécies de Cypriniformes e foram sintetizados pela Thermofisher S.A. (Invitrogen). As sequências primárias de pares de primers (Tabela 1) para o PCR convencional foram as seguintes:

Tabela 1 – Relação dos *primers* para PCR convencional dos genes *fshb* e *vtgA* para *A. fasciatus*. Seja: F, forward e R, reverse.

Primer	**Sequência 5´→ 3´**
fshb F1	5'- GTC CTG ATG ATT CTG CTG CT -3'
fshb R1	5'- GCA TTC CTC GCT CTC CAC -3'
vtgA F1	5'- AAA CTC TGA CCC TGC TGG AA -3'
vtgA R1	5'- GCC TCT GCG TTG TTG ATC TT -3'

A seguir foram realizadas reações de PCR convencional para avaliar se os *primers* acima citados amplificariam os produtos de interesse. As condições específicas das reações de amplificação foram padronizadas a partir das condições padrão de enzima Taq DNA polimerase (EP0402, Invitrogen Life Technologies): 5µL de Taq Buffer (10X) com 2,5 µL $MgCl_2$ (25mM), 35,75µL de água, 1 µL de Solução Mix de desoxinucleotídeo (dNTP) com 10 nM para cada dNTP, 1 µL de cada *primer* (0,2 µM) e 0,25 µL de taq DNA (1,25 U) Polimerase (Invitrogen). Para isso, foi utilizado gradiente de temperatura de 95°C por 3 min, seguido de ciclagem de 95°C por 30 seg, temperatura de anelamento de 60°C por 30seg, 72°C por 60 seg e a extensão final de 72°C por 10 min, por 35 ciclos.

Os produtos destas reações de PCR convencional foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo em tampão 1X Tris-borato-EDTA (TBE). O volume de 7ul de cada produto de PCR (50 µL) foi aplicado no gel juntamente com 3 µL de *loading buffer* 6X (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 120 V por 30 min e o gel foi analisado em transiluminador, sob luz ultravioleta.

2.5.4. Análises de expressão gênica - PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os ensaios de PCR quantitativo (qPCR) em tempo real foram realizados no equipamento Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems com SDS Software (*Life Technologies, USA*), pertencente ao Centro de Tecnologias Avançadas em Genômica IQ – USP, coordenado pela Profa. Dra. Aline Maria da Silva. Para a quantificação dos produtos formados durante a reação de qPCR foi utilizado o reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*).

A eficiência de amplificação dos *primers* foi avaliada por RT-qPCR (E) através de um ensaio no qual a concentração de cDNA variou de 3,12 - 100 ng. Estas eficiências foram calculadas após a geração dos interceptos pelo gráfico Ct *versus* log da concentração de cDNA a partir da equação: $E = 10^{[-1/intercepto]}$. Sendo E igual a 2,

correspondente a 100% de eficiência, pois implica que a cada ciclo a quantidade de produto de PCR resultante é o dobro da inicial. Os *primers* utilizados deveriam ter um R^2 (replicabilidade da reação) próximo de 1, e uma eficiência entre 90 e 110%, a qual foi calculada para cada reação de acordo com a curva de diluição do cDNA utilizada pelo *software* LinRegPCR 2014.x (http://LinRegPCR.nl) (Ruijter *et al*., 2013). Todos os *primers* foram considerados adequados para a realização do RT-qPCR e para a análise dos dados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

Valores de eficiência perto de 2 foram obtidos da curva gerada por cDNA diluído 8 vezes, que sugerem que os *primers* estão amplificando com aproximadamente 100% de eficiência. Em paralelo também foi realizada a análise da curva de dissociação (*melting*) para cada par de *primers*, para verificar a homogeneidade dos produtos das reações (amplificação de um único produto em cada reação). Ao final do processo de validação, os *primers* que melhor se enquadraram nos critérios avaliados foram escolhidos (Tabela 2) e utilizados nas reações de qPCR do estudo. Reações de 20 µl [10 µl de *Power SYBR Green Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*), 0,32 µl de cada *primer* (*forward* e *reserve*) a 10 uM, 1 µl de cDNA diluído (1:10) para cada amostra e 8,36 µl de água] foram analisados em duplicata, em placas de 96 poços e com as seguintes condições de ciclagem: uma etapa inicial de desnaturação de 95ºC por 10 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95ºC por 15 segundos e uma etapa combinada de anelamento e elongação de 60ºC por 1 min, seguida pela análise da curva de *melting* ao final de cada reação. Os níveis de transcrição dos genes alvo foram normalizados utilizando o gene endógeno *elf α* (Tabela 2) e calculados pelo método $2^{-(\Delta Ct)}$, uma vez que os *primers* validados apresentavam eficiência maior que 90%.

Tabela 2 – Relação dos *primers*, tamanho do amplicon, replicabilidade da reação e eficiência de amplificação de transcritos analisados por RT-qPCR em *A. fasciatus.* Seja: F, *forward* e R, *reverse*.

Primer	**Sequência 5´→ 3´**	**Amplicon (pb)**	**R^2 (%)**	**Eficiência (E)**
fshb F1	GTC CTG ATG ATT CTG CTG CT	105	0,997	2,008[a]
fshb R1	GCA TTC CTC GCT CTC CAC			
vtgA F1	AAA CTC TGA CCC TGC TGG AA	145	0,999	1,947[a]
vtgA R1	GCC TCT GCG TTG TTG ATC TT			
elfα F	TGG TAC CTC TCA GGC TGA C	121	0,998	1,998[a]
elfα R	ACC AAG GGT GAA GGC CAG			

[a]Eficiência obtida com cDNA diluído 10 vezes, equivalente a 50 ng/ul para *vtgA* e 12,5 ng/ul para *fshb*.

2.5. Análises estatísticas

Os resultados foram comparados e expressos pela média ± erro padrão da média (EPM). As respostas fisiológicas foram analisadas com base em dois fatores: 1) grupos experimentais: reservatórios Billings (pontos Taquacetuba e Bororé) e Ponte Nova; 2) Estações do ano: verão (março de 2017) e inverno (julho-agosto de 2017). Foi aplicado o teste de Análise de Variância (*two way* - ANOVA), seguindo de testes de normalidade e homogeneidade de variância. Quando cumpriam os requerimentos de uma análise paramétrica, os resultados foram comparados com testes de comparações múltiplas post-hoc Student-Newmann-Keuls (SNK). Para os dados que não cumpriram esses requerimentos, o teste Kruskal-Wallis foi aplicado (Zar, 1999). Em todos os casos, o nível de significância de $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. As análises foram realizadas com o software *GraphPad Prism* 8.1 (San Diego, CA, USA).

3. Resultados

3.1. Parâmetros ponderais, morfométricos e índices somáticos

O comprimento total e a massa corpórea dos animais coletados no verão foram mais elevados que no inverno nos pontos Bororé (*P* = 0,003 e *P* = 0,004, respectivamente) e Taquacetuba (*P* < 0,001 para as duas variáveis). Comparando-se os reservatórios em cada estação do ano, os animais coletados no ponto Taquacetuba apresentaram menor comprimento total e massa corpórea em relação aos animais coletados na Ponte Nova (*P* = 0,006 e *P* = 0,0003, respectivamente) e Bororé (*P* = 0,006 e *P* = 0,020, respectivamente), durante o inverno enquanto no verão a massa corpórea dos animais coletadaos em Taquacetuba foi maior do que aquela dos animais coletados na Ponte Nova (*P* = 0,005) (Apêndice 1).

Os índices somáticos IGS e IHS não apresentaram variações durante as duas estações (p<0.05) e comparando-se os dois reservatórios, sugerindo que a reprodução desta espécie ocorre durante as duas estações nos pontos amostrados (Figura 2 A, B).

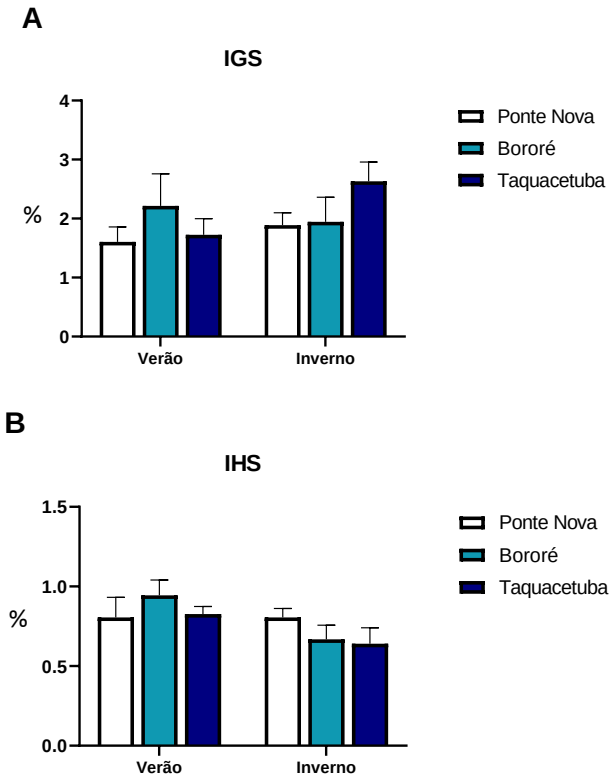


Figura 2 – Índices gonadossomático (**A**), Hepatossomático (**B**) nos machos adultos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno. Os dados estão expressões como média ± erro padrão da média. IGS e IHS não apresentam diferenças estatísticas após o teste de Tukey (p > 0,05).

Em relação à dinâmica testicular, foram observados espermatozoides durante as duas estações estudadas (Figura 3) e, desta forma, os machos foram classificados na fase apto à desovar tanto no inverno quanto no verão (Tabela 3), em todos os ambientes. Já os estágios da espermatogênese: espermátides e espermatozoides, e a presença de espermatócitos ao longo de todo o testículo foram detectados nas duas estações (Figura 3).

No verão (Figura 3) foram encontrados animais que já completaram o desenvolvimento gonadal e fisiologicamente preparado para reproduzir. Os testículos são grandes e firmes, e os espermatozoides são detectados no lúmen dos lóbulos ou nos ductos espermáticos. Todos os estágios da espermatogênese podem ser observados, assim como a presença de cistos ao longo de todo o testículo. Na estação de inverno, alguns animais também se encontravam na fase de regressão (Figura 4B), os testículos são pequenos e flácidos, podem ser detectados espermatozoides residuais no lúmen dos lóbulos e ductos espermáticos. Também são observados cistos muito espalhados próximos à periferia, apresentando espermatócitos secundários, espermátides e espermatozoides. Também ocorre a proliferação das espermatogônias e regeneração do epitélio germinativo na periferia dos testículos (Brown-Peterson *et al*., 2011).

Tabela 3 – Fases reprodutivas dos machos adultos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno.

Ambientes	Estação	*A. fasciatus*						
		n Histologia	Apto a desova	(%)	Regressão	(%)	Regeneração	(%)
Ponte Nova	Verão	4	3	75,00	1	25,00	0	0,00
Bororé (Billings)		5	4	80,00	1	20,00	0	0,00
Taquacetuba (Billings)		5	4	80,00	1	20,00	0	0,00
Ponte Nova	Inverno	6	3	50,00	2	33,33	1	16,67
Bororé (Billings)		6	3	50,00	2	33,33	1	16,67
Taquacetuba (Billings)		6	4	66,67	2	33,33	0	0,00

(%): Porcentagem das fases reprodutivas

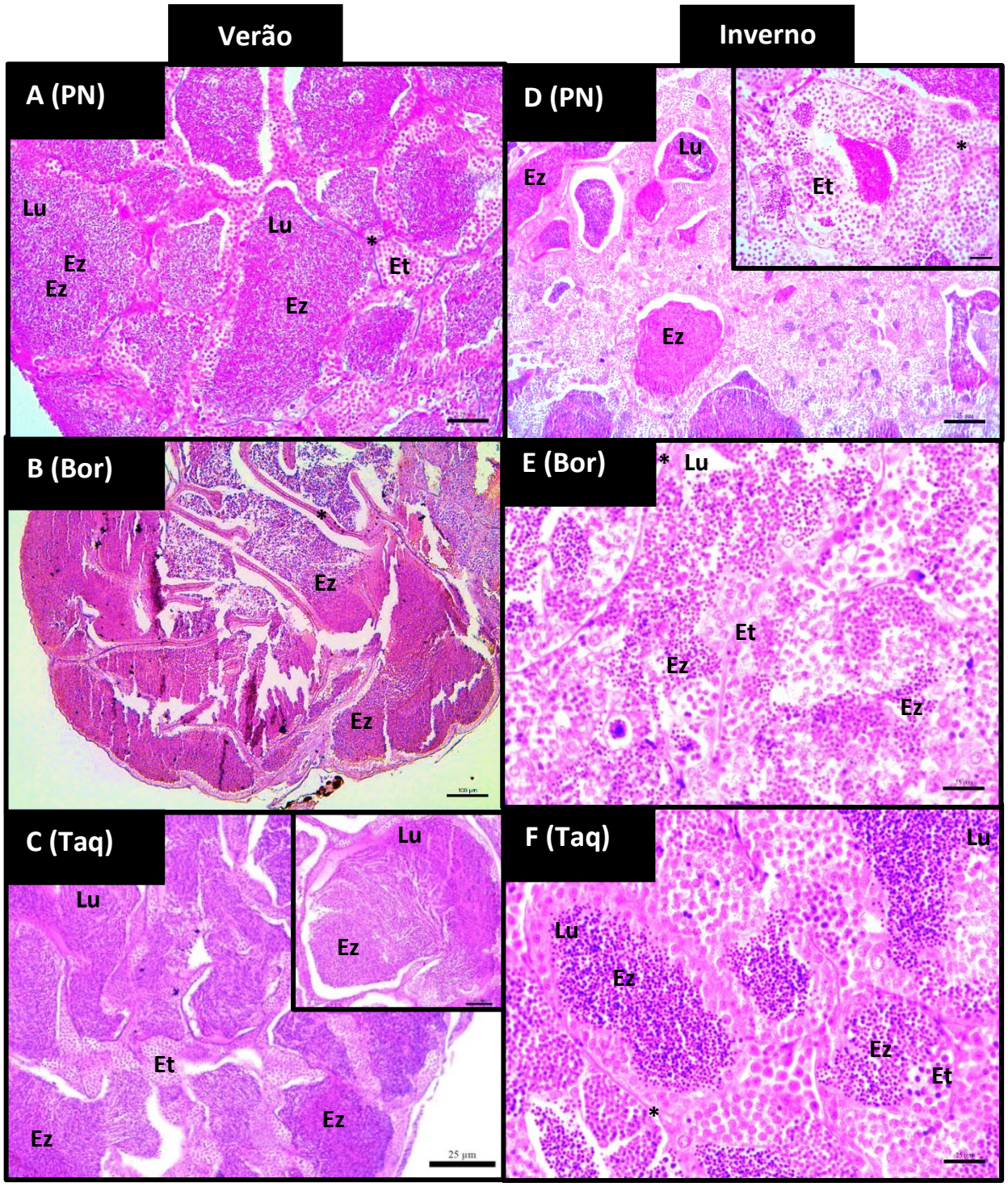


Figura 3 – Análise histológica de testículos em *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno. **A**) Verão no reservatório PN; **B**) Verão no reservatório Bil (Bororé); **C**) Verão no reservatório Bil (Taquacetuba). **D**) Inverno no reservatório PN; **E**) Inverno no reservatório Bil (Bororé); **F**) Inverno no reservatório Bil (Taquacetuba). Apto à desova (**A**, **B**, **C** e **E**, **F**) e em regressão (**D**), mostrando redução da espermatogênese e espermatozoides residuais. Interstício (asterisco), espermatócitos (Et), espermatozoides (Ez) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estação. Escala: Barra: 25µm, (B: 100 µm)

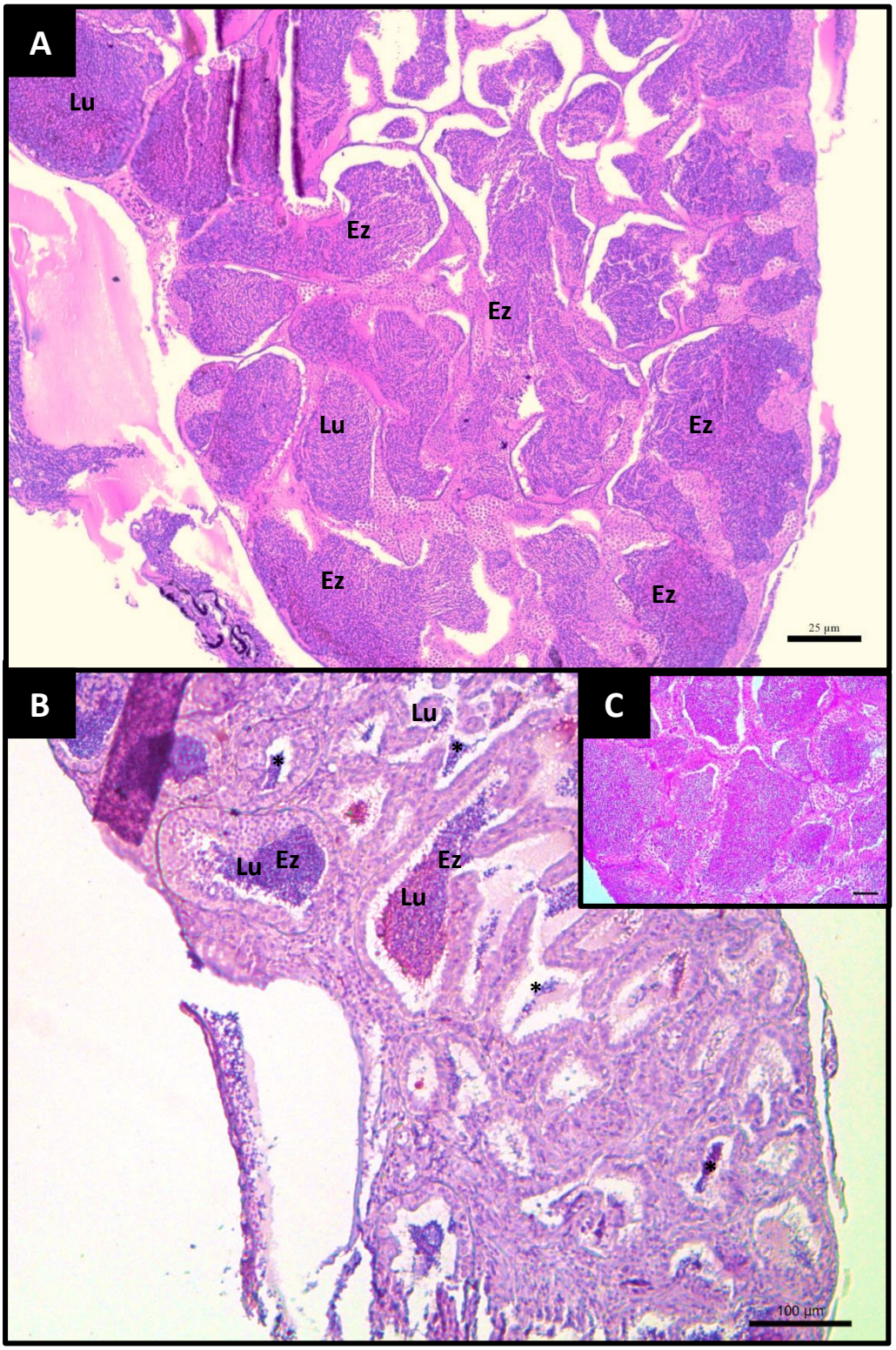


Figura 4 – Análise histológica dos testículos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova (referência) e impactados Billings. Mostrando a maior aumento o contraste entre as duas estações de inverno e verão. **A**) A fase de desova, verão no reservatório Bil (Taquacetuba); **B**) A fase de Inverno no reservatório PN e C) A fase desova, verão no reservatório PN. Espermatozoides (Ez), espermatozoides residuais (*) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estações. Escala: Barra: A-C: 25 µm e B: 100 µm.

3.2. Concentração plasmática de esteroides gonadais

Nos machos de *A. fasciatus* a concentração plasmática de T foi maior nos animais coletados no ponto Taquacetuba no verão quando comparados à estação do inverno (*P* = 0,03). Este mesmo andrógeno foi mais elevado nos animais coletados em Taquecetuba quando comparados com aqueles coletados no ponto Bororé (P = 0,008) e Ponte Nova (*P* = 0,005) no verão (Figura 5A).

A concentração plasmática de 11-KT seguiu um perfil muito semelhante àquele da T, com maior concentração no plasma dos animais coletados no verão em relação ao inverno nos animais de Taquacetuba (*P* = 0,008), enquanto nos animais coletados no ponto Bororé o resultado foi inverso, ou seja, animais coletados no inverno apresentaram maior concentração de 11-KT do que aqueles coletados no verão (*P* = 0,017). Valores mais elevados de 11-KT também foram obtidos no verão nos animais coletados em Taquecetuba quando comparados aos pontos Bororé (*P* = 0,001) e Ponte Nova (*P* = 0,001) (Figura 5B).

Os machos amostrados em Taquacetuba e Bororé apresentaram maior concentração plasmática de E_2 no inverno quando comparados com aqueles coletados no verão (*P* = 0,003 e *P*= 0,030, respectivamente). A concentração de E_2 foi mais elevada nos animais coletados em Taquacetuba do que em Bororé (*P* = 0,002) e Ponte Nova (*P* = 0,003) no inverno (Figura 5C).

3.3. Expressão gênica de *vtgA* e *fshb*

Os níveis expressão de *fshb* em *A. fasciatus* foram maiores nos machos amostrados em Taquacetuba (*P* = 0,003) e Bororé (*P* = 0,050) no verão, quando comparado com o inverno. E durante a estação do verão, os animais coletados em Taquacetuba expressaram mais *fshb* do que os animais coletados na Ponte Nova (*P* = 0,002) e Bororé (*P* = 0,046). Adicionalmente os níveis de expressão do *fshb* nos animais coletados no ponto Bororé foram mais elevados que aquele dos animais da Ponte Nova (*P* = 0,016) (Figura 6A).

Os níveis de expressão de *vtgA* foram maiores nos animais coletados no ponto Bororé no verão em relação ao inverno (*P* = 0,027), mas não variaram nos demais pontos. Também não houve variação nos níveis de expressão de *vtgA* nos animais coletados nos diferentes reservatórios, dentro de cada estação (*P* > 0,05) (Figura 6B).

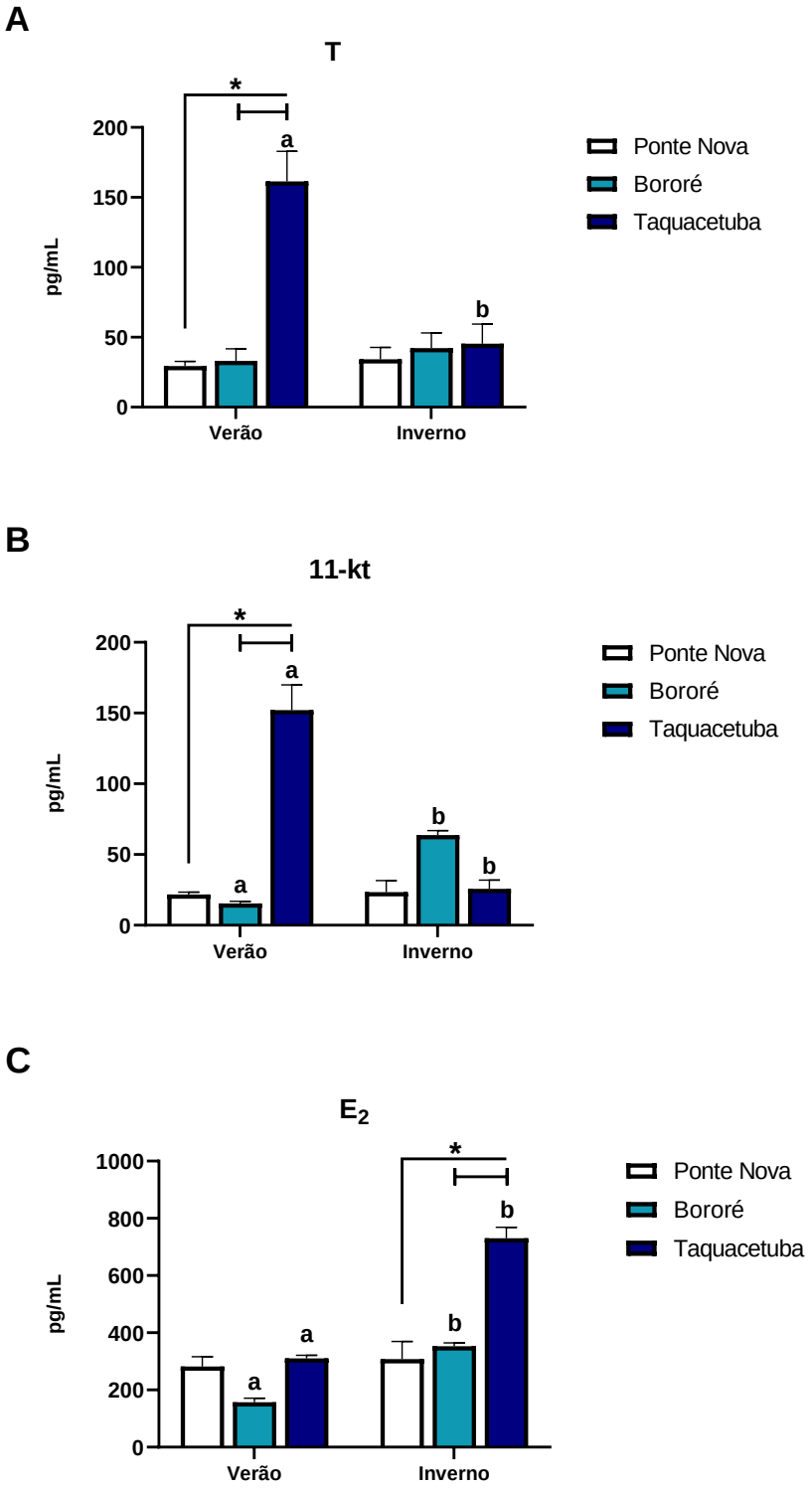


Figura 5 – Concentração plasmática de T (**A**), 11-kt (**B**) e E_2 (**C**) nos machos adultos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. *Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano ($p < 0,05$). [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas no mesmo ambiente nas duas estações ($p < 0,05$).

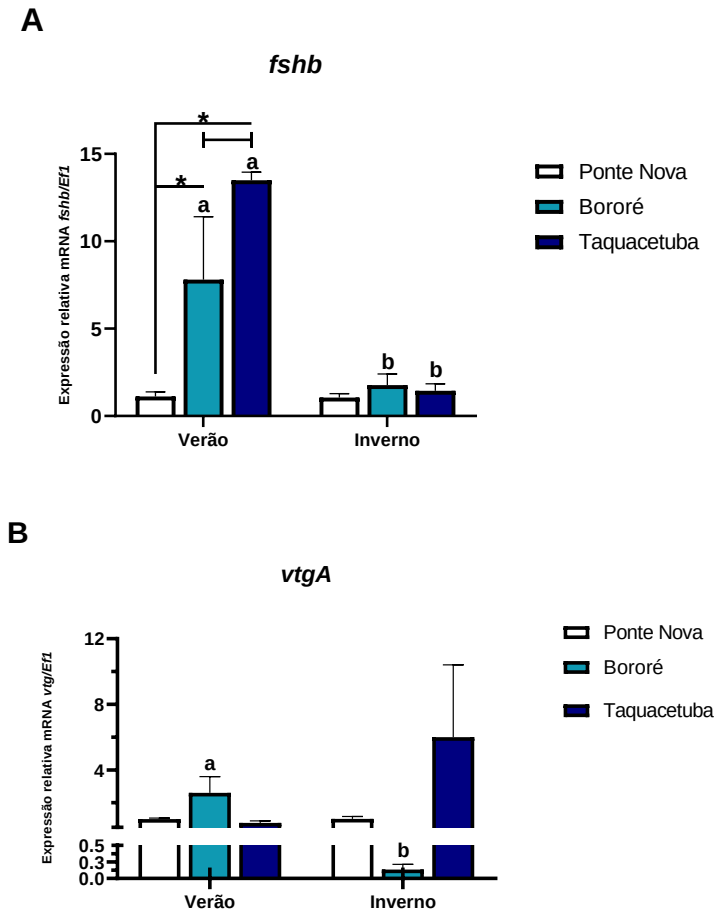


Figura 6 - Expressão relativa dos mRNAs para *fshb* (**A**) e *vtgA* (**B**) nos machos adultos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados no reservatório Ponte Nova (coluna branca). [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas no mesmo ambiente nas duas estações ($p < 0,05$).

4. Discussão

4.1. Parâmetros reprodutivos de *A. fasciatus*

As táticas reprodutivas dependem da interação entre o ambiente e as respostas genéticas, fisiológicas, comportamentais e ecológicas de cada indivíduo para manifestar a estratégia reprodutiva (Potts e Wootton, 1984). *A. fasciatus* é conhecido em seu ambiente natural por apresentar desovas múltiplas em um período reprodutivo definido (Gurgel, 2004; Hirt *et al.*, 2011), contudo no presente estudo os machos em ambos os reservatórios parecem ter uma desova do tipo parcelada, confirmada pela presença predominante de espermatozoides ao longo das estações de coleta. São evidenciadas que diferentes parcelas de espermatozoides são recrutadas no processo de espermatogênese, mas somente esta análise em dois momentos do ano não seria suficiente para classificar a estação reprodutiva, pois seria necessário também o estudo das fêmeas.

Muitos estudos têm demonstrado a plasticidade reprodutiva do lambari, alterando as táticas reprodutivas de acordo com as características do ambiente, sendo que *A. fasciatus* em ambientes represados e/ou poluídos parecem exibir desova do tipo parcelada (Giamas *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2011). Estes resultados são semelhantes ao encontrado nos congêneres de *Astyanax* também em reservatórios (Carvalho *et al.*, 2009) e dentro do mesmo grupo em outros teleósteos como *Moenkhausia intermedia* "lambari-corintiano" (Hojo *et al*., 2004). Chehade *et al*. (2015) e Jesus *et al. (*2017) demonstraram um esvaziamento parcial das gônadas em machos e fêmeas após um episódio de reprodução induzida, sugerindo uma tática reprodutiva assincrônica em cativeiro. A desova parcelada permite vários eventos de desova durante o mesmo ciclo reprodutivo e como consequência, diferentes nichos no espaço e no tempo são ocupados com diferentes classes de tamanho em uma variedade de habitats. Isso leva a competição entre adultos para locais de desova e entre larvas, pelas fontes alimentares disponíveis (Ratton *et al*., 2003). Os peixes podem passar da desova total para a desova parcelada e vice-versa, como consequência de alterações fisiológicas ou ambientais, o que se conhece como tática reprodutiva (Vazzoler, 1996). Este fato pode levar a diferentes tipos de desova em diferentes populações em diferentes períodos de tempo (Carvalho *et al*., 2009).

Os índices somáticos, IGS e IHS podem ser considerados importantes indicadores no processo reprodutivo, estando relacionados ao aporte de substratos energéticos (Sayer *et al*., 1995). Prado *et al*. (2011) estudaram *A. fasciatus* em cinco reservatórios distintos

na região Sudeste do Brasil (um deles considerado não contaminado e os demais contaminados) e mostraram que o IGS em machos apresentou pouca variação em todos os locais, com os maiores valores no verão. Os resultados do presente estudo mostram que outras variáveis além da presença de contaminantes podem influenciar o GSI, como disponibilidade de alimento, perfil genético, abundância de predadores e status ambiental. Além disso, o padrão de mudança sazonal do IGS pode estar relacionado com história de vida da população em um determinado reservatório, levando em consideração a plasticidade reprodutiva já relatada para esta espécie (Silva *et al*., 2010). Estes resultados demostram que apesar de não haver diferenças espaciais e temporais para esses índices no presente estudo, não podemos atribuir suas possíveis variações somente ao processo reprodutivo, mas também à disponibilidade de alimento no ambiente e às características da qualidade da água, que exercem muita influência na utilização das reservas energéticas pelos animais (Gomes, 2016).

4.2. Expressão gênica de *vtgA* e *fshb* e concentração plasmática de esteroides gonadais

No presente estudo, a fisiologia reprodutiva de *A. fasciatus* foi estudada utilizando biomarcadores relacionados ao processo de maturação gonadal, para avaliar os efeitos da diminuição da qualidade da água da Billings neste processo. Biomarcadores moleculares, tais como expressão gênica de *fshb* e *vtgA*, a concentração plasmática de E_2, T e 11-KT, e características morfológicas, como morfologia gonadal, geraram respostas diferentes, mostrando que os peixes possuem várias habilidades regulatórias, mesmo em condições ambientais adversas.

É importante destacar que no reservatório de Ponte Nova, considerado como referência os biomarcadores analisados não diferiram entre as duas estações do ano, o que pode ser considerada mais uma evidência de que estes animais mantêm atividade reprodutiva ao longo das duas estações. Nos dois pontos de coleta da Billings os níveis dos transcritos de *fshb* foram mais elevados no verão, período em que ocorreu um intenso processo de espermatogênese (Schulz *et al*., 2010). Paralelamente ao aumento dos níveis de *fshb*, também observamos que machos de *A. fasciatus* apresentaram níveis elevados de T e 11-KT também no verão, mas apenas no ponto Taquacetuba. É sabido que o FSH é um potente indutor da esteroidogênse gonadal, via ativação do FSHr também expresso

nas células de Leydig (Schulz *et al*., 2010). Nossos dados mostram que o aumento da expressão de *fshb* nos animais coletados no verão em Taquacetuba está acompanhado de um aumento da concentração plasmática de T e 11-KT, mas o experimento realizado não permite estabelecer uma relação da expressão gênica desta gonadotropina e os níveis plasmáticos destes andrógenos. As variações na concentração de andrógenos plasmáticos e expressão de *fshb* em *A. fasciatus* ocorreram principalmente no verão, período no qual a espermatogênese normalmente é mais ativa. Adicionalmente, estas variações foram mais evidentes nos pontos de coleta do reservatório Billings, classificado como hipereutrófico nesta estação.

A expressão gênica da *vtgA*, um biomarcador da exposição a contaminantes de ação estrogênica mostrou alterações em machos em estações distintas, mas se alterou nos animais coletados nos diferentes reservatórios. É importante destacar que machos apresentam o gene que expressa *vtgA*, no entanto esta glicolipofosfoproteína não tem função nestes animais, haja vista que a vitelogênese não é um processo fisiologicamente relevante em machos. Os dados apresentados neste estudo mostram que os níveis de expressão de *vtgA* nos animais coletados na Ponte Nova não se alteraram entre as estações, o que seria esperado. No entanto, no ponto Bororé, na estação do verão, quando este reservatório é considerado hipereutrófico (capítulo 1), os níveis de expressão de VTG-A são mais elevados que no inverno; já em Taquacetuba os animais apresentam níveis mais elevados de expressão de VTG-A, mas sem diferença entre as estações. Sendo assim, em ambos os pontos do reservatório Billings, é sugerida a presença de compostos de ação estrogênica e que poderiam estar desencadeando esta resposta, haja vista que os níveis de E_2 nestes animais são mais baixos no verão em relação ao inverno nos dois pontos da Billings.

É importante destacar também que durante o inverno, os níveis de expressão de *vtgA* em Taquacetuba apresentam uma tendência a ser mais elevada, mas a variabilidade apresentada pelos animais não resultou em valores estatisticamente significativos. No entanto, uma análise conjunta dos dados de *vtgA* com a concentração plasmática de E_2 mostram que este estrógeno se eleva no plasma dos animais da Billings no inverno, fato que não ocorre na Ponte Nova. Tolussi *et al*. (2018) estudando *A. fasciatus* no reservatório Billings mostraram uma relação entre a presença de EDCs e a expressão de *vtgA*. Embora os machos pareçam ajustar seu ciclo a diferentes ambientes da Billings, as evidências de expressão gênica de *vtgA* e altos níveis de E_2 durante o inverno sugerem a presença de

xenobióticos, atuando como estrogênicos neste reservatório que podem estar interferindo nos processos reprodutivos de *A. fasciatus*.

As alterações nas diferentes variáveis nas duas estações de amostragem de *vtgA* podem ser o resultado de uma mistura complexa de contaminantes no meio ambiente. Os contaminantes podem influenciar a toxicidade de outro composto, resultando em efeitos interativos, como aditivos, sinérgicos ou antagônicos (Beyer *et al*., 2014). Uma maneira eficiente de avaliar os efeitos das misturas é a realização de múltiplos estudos, tanto no campo como no laboratório, para entender mais precisamente como esses compostos são capazes de afetar a biota (Sanchez e Porcher, 2009).

É importante reforçar o fato de que os estrógenos, principalmente o E_2 tem uma importante ação na espermatogênese, agindo na proliferação mitótica das espermatogônias (Schulz *et al*., 2010). Desta forma, seria perfeitamente previsível a presença de níveis mais elevados deste estrógeno no período do inverno, quando normalmente a espermatogênese tem início. No entanto, dados coletados de animais na Ponte Nova não demonstram esta variação, que só se mostra evidente no reservatório hipereutrófico.

Neste estudo, nenhuma alteração foi observada na histomorfologia gonadal, mesmo quando foram encontradas alterações em outros biomarcadores de exposição em diferentes níveis de organização, associados a mecanismos fisiológicos e genéticos. Esses resultados apontam para mecanismos regulatórios que minimizam o efeito das alterações observadas nestes biomarcadores em nível histomorfológico. Em conjunto, os resultados encontrados neste estudo sugerem que os EDCs presentes no reservatório de Billings influenciaram principalmente os biomarcadores efeitos biológicos. Segundo Dang (2016), estudos com biomarcadores de exposição e efeito, tais como concentração de vitelogenina, características sexuais secundárias e razão sexual em *P. promelas*, *Oryzias latipes* e *D. rerio*, mencionam que mudanças nos biomarcadores resultam de um efeito multifatorial de EDCs. Estes efeitos são consequências de processos complexos que podem ser influenciados por fatores biológicos, químicos, isolados e outras interações sinérgicas. Esta afirmação pode ser corroborada neste estudo, pois após a coleta de dados durante as estações, os animais exibiram alterações em momentos específicos em biomarcadores de exposição, possivelmente causados por diferentes contaminantes. Como afirmado por Cortes *et al*. (2016), este estudo corrobora e reforça a importância de incluir diferentes biomarcadores para avaliar a análise de risco. Além disso, acreditamos

que a continuação da reavaliação desses riscos deve ser considerada, especialmente em áreas suscetíveis à contaminação ambiental ou antropogênica, como locais próximos aos centros urbanos. Finalmente, os ajustes fisiológicos observados em machos de lambari, nos reservatórios poluídos, podem ser decorrentes das táticas reprodutivas desta espécie que apresenta ampla plasticidade (Giamas *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2011).

5. Conclusões

O uso de diferentes biomarcadores em vários níveis de organização permitiu descrever as alterações nos processos fisiológicos envolvidos na reprodução em *A. fasciatus* e sugerir a presença e os efeitos dos EDCs em um ambiente natural com alto grau de eutrofização. As condições encontradas na água do reservatório de Billings, no verão e no inverno, interferiram em biomarcadores de efeitos biológicos (concentração plasmática de T, 11-kt e E_2) em *A. fasciatus*. Já no reservatório de Ponte Nova, em ambas as estações, considerado como referência, os biomarcadores analisados não diferiram entre as duas estações do ano, o que pode ser considerada mais uma evidência de que estes animais mantêm atividade reprodutiva ao longo das duas estações. A presença de biomarcadores de exposição (expressão gênica de *vtgA* em machos) sustenta a hipótese de que a presença de EDCs no reservatório Billings desencadeia respostas estrogênicas em machos de *A. fasciatus*, corroborando nossa hipótese inicial, e que estas respostas diferem ao longo das estações do ano. Desta forma podemos afirmar que os contaminantes presentes neste corpo de água estão interferindo na atividade esteroidogênica em *A. fasciatus*, mas tanto a plasticidade quanto a estratégia reprodutiva desta espécie permite a reprodução.

Referências Bibliográficas

Alberto, A.; Camargo, A.F.M.; Verani, J.R.; Costa, O.F.T.; Fernandes, M.N. 2005. Health variable sand gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 247-255.

Agostinho, A.A.; Miranda, L.E.; Bini, L.M.; Gomes, L.C.; Thomaz, S.M; Suzuki, H.I. 1999. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. Pp 227-266. In: Tundisi, J.G.; Straškraba, M. (Eds.). Theoretical reservoir ecology and its applications. São Carlos: *International Institute of Ecology*, 585.

Baroiller, J.F.; Guiguen, Y. 2001. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in gonochoristic fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 91: 177-201.

Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Neto, A.G.F. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART. São Paulo: *Livraria Editora Ltda*, 239.

Beyer, J.; Petersen, K.; 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.

Broerg, K.; Westernhagen, H.V.; Zander, S.; Korting, W.; Koehler, A. 2005. The "bioeffect assessement index" (BAI): a concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 495-503.

Brown-Peterson, N.J.; Wyanski, D.M.; Saborido-Rey, F.; Macewicz, B.J.; Lowerre-Barbieri, S.K.A. 2011. standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, 1(3): 52-70.

Carrasco-Letelier, L.; Eguren, G.; Mello, F.T.; Groves, P.A. 2006. Preliminary field study of hepatic porphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to de- fine anthropogenic pollution. *Chemosphere*, 62: 1245-1252.

Carvalho, P.A.; Paschoalini, A.L.; Santos, G.B.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. 2009. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a Reservoir in southeastern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 25: 306-13.

Castro, P.M.G.; Silva, M.E.P.A.; Maruyama, L.S.; Paiva, P. 2009. Produção Pesqueira do reservatório Billings (Alto Tietê – SP) nos anos de 2005, 2006 e 2007. *Instituto de Pesca*, 38: 1-10.

Chehade, C.; Cassel, M.; Borella, M. I. 2015. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. *Neotropical Ichthyology*, 13: 205-212.

Chomczynski, P.; Sacci, N. 1987. Single-step method of total RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159.

Correia, T.G.; Narcizo, A.M.; Bianchini, A.; Moreira, R.G. 2010. Aluminum as na endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology*, 151(4): 461-466.

Cortes, R.; Hughes, S.; Coimbra, A.; Monteiro, S.; Pereira, V.; Lopes, M.; Pereira, S.; Pinto, A.; Sampaio, A.; Santos, C.; Carrola, J.; Jesus, J.; Varanda, S. 2016. A multiple index integrating different levels of organization. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 132: 270-278.

Dala-Corte, R.B.; Azevedo, M.A. 2010. Biologia reprodutiva de *Astyanax henseli* (Teleostei, Characidae) do curso superior do rio dos Sinos, RS, Brasil. *Iheringia–Série Zoologia*, 100: 259-266.

Dang, Z.C., 2016. Interpretation of fish biomarker data for identification, classification, risk assessment and testing of endocrine disrupting chemicals. *Environment International*, 92-93: 422-441.

Desforges, J.P.; Peachey, B.D.; Sanderson, P.M.; White, P.A.; Blais, J.M. 2010. Plasma vitellogenin in male teleost fish from 43 rivers worldwide is correlated with upstream human population size. Environmental Pollution, 158(10): 3279-84.

Fernandes, D.; Schnell, S.; Porte, C. 2011. Can pharmaceuticals interfere with the synthesis of active androgens in male fish? An in vitro study. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 2250-2253.

Flick, R.W.; Bencic, D.C.; See, M.J.; Biales, A.D. 2014. Sensitivity of the vitellogenin assay to diagnose exposure of fathead minnows to 17α-ethynylestradiol. *Aquatic Toxicology*, 152: 353–360.

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.

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*, 51: 1193-1206.

Gurgel, H. 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*, 1(21): 131-135.

Hassell, K.; Pettigrove, V.; Beresford, N.; Jobling, S.; Kumar, A. 2016. No evidence of exposure to environmental estrogens in two feral fish species sampled from the Yarra River, Australia: a comparison with northern hemisphere studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131: 104-117.

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): 1-12.

Hojo, R.E.S.; Santos, G.B.; Bazzoli, N. 2004. Reproductive biology of *Moenkhausia intermedia* (Eigenmann) (Pisces, Characiformes) in Itumbiara Reservoir, Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21: 519-524.

Hook, S.E.; Gallagher, E.P.; Batley, G.E. 2014. The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 10(3): 327–341.

Jesus, L.W.H.; Bogerd, J.; Vieceli, F.M.; Branco, G.S.; Camargo, M.P.; Cassel, M.; Moreira, R.G.;Yan, C.Y.I.; Borella, M.I. 2017. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: Molecular characterization, spatiotemporal expression and their possiblerole on female reproductive dysfunction in captivity. *General and Comparative Endocrinology*, 246: 150-163.

Ji, K.; Liu, X.; Lee, S.; Kceuang, S.; Kho, Y.; Giesy, J.P.; Choi, K. 2013. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonadaxis, and reproduction of zebrafish. *Journal of Hazardous Materials*, 254-255: 242–251.

Kida, B.M.S.; Abdalla, R.P.; Moreira, R.G. 2016. Effects of acidic water, aluminum, and manganese on testicular steroidogenesis in *Astyanax altiparanae*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(5): 1347-1356.

Lima, F.C.T.; Malabarba, L.R.; Buckup, P.A.; Silva, J.F.P.; Vari, R.P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakawa, O.T.; Pavanelli, C.S.; Menezes, N.A.; Lucena, C.A.S.; Malabarba, M.C.S.L.; Lucena, Z.M.S.; Reis, R.E.; Langeani, F.; Cassalti, L.; Bertaco, V.A.; Moreira, C.; Lucinda, P.H.F. 2003. Genera incertae sedis in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (eds): Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: *Livraria EdiPUCRS*, 106-169.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-8.

Mariani, C.F.; Pompêo, M.L.M. 2008. Potentially bioavailable metals in sediment from a tropical polymictic environment Rio Grande Reservoir, Brazil. *Journal of Soils and Sediments*, 8: 248-288.

Moncaut, N.; Lo Nostro, F.; Maggese, M.C. 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17β. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology*, 63: 127-137.

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. Taubaté: *Ambi-água - Revista Ambiente and Água: An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 5(3): 47-59.

Muncke, J.; Eggen, R.I. 2006. Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 2734-2741.

Orn, S.; Yamani, S.; Norrgren, L. 2006. Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17beta-trenbolone. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, 51: 237-243.

Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29- 45.

Potts, G.W.; Wootton, R.J. 1984. Fish reproduction: Strategies and Tactics. London: *Academic Press*, 410.

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.

Ratton, T.F.; Bazzoli, N.; Santos, G.B. 2003: Reproductive biology of *Apareiodon affinis* (Pisces: Parodontidae) in the Furnas Reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 387-390.

Rocha, A.A.; Pereira, D.N.; Pádua, H.B. 1985. Produtos de pesca e contaminantes químicos na água da represa Billings, São Paulo (Brasil). *Revista de Saúde Pública*, 19: 401-410.

Ruijter, J.M.; Pfaffl, M.W.; Zhao, S.; Spiess, A.N.; Boggy, G.; Blom, J.; Rutledge, R.G.; Sisti, D.; Lievens, A.; De Preter, K.; Derveaux, S.; Hellemans, J.; Vandesompele, J. 2013. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*, 59: 32-46.

Salierno, J.D.; Kane, A.S. 2009. 17α-Ethinylestradiol alters reproductive behaviors, circulating hormones, and sexual morphology in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 953-961.

Sanchez, W.; Porcher, J.M. 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the water frame work. Directive of the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, 28: 150-158.

Sayer, M.D.J.; Gibson, R.N.; Atkinson, R.J.B. 1995. Growth, diet and condition of goldsinny on the West coast of Scotland. *Journal of Fish Biology*, 46:317-340.

Scholz, S.; Kordes, C.; Hamann, J.; Gutzeit, H.O. 2004. Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): comparison of gene expression and protein levels. *Marine Environmental Research*, 57: 235-244.

Schulz, R.W.; França, L.R.; Lareyre, J.J.; Legac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nobrega, R. H.; Miura, T. 2010 Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3): 390-411.

Schulz, U.H.; Martins-Júnior, H. 2001. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. Braz. *Journal of Biology*, 61: 615-622.

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.

Sone, K.; Hinago, M.; Itamoto, M.; Katsu, Y.; Watanabe, H.; Urushitani, H.; Tooi, O.; Guillette, L.J.; Jr-Iguchi, T. 2005. Effects of an androgenic growth promoter 17beta-trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). *General and Comparative Endocrinology*, 143(2):151-160.

Souza, G.B.; Mylonas, C.; Mello, P.H.; Kuradomi, R.Y.; Batlouni, S.R.; Tolussi, C.E.; Moreira, R.G. 2019a. Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. *General and Comparative Endocrinology*, 279: 120-128.

Souza, G.B.; Gomes, A.D.; Honji, R.M.; Hilsdorf, A.W.S.; Moreira, R.G. 2019b. Distinctive reproductive strategies between sympatric specimens of *Astyanax aff. fasciatus* in the wild and in captivity. *Environmental Biology of Fishes, in press.*

Tan, B.L.; Hawker, D.W.; Müller, J.F.; Leusch, F.D.; Tremblay, L.A.; Chapman, H.F. 2007. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected waste water treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environment International*, 33: 654-669.

Tolussi, C.E.; Gomes, A.D.O.; Kumar, A.; Ribeiro, C.S.; Lo Nostro, F.L.; Bain, P.A.; de Souza, G.B.; Cuña, R.D.; Honji, R.M.; Moreira, R.G. 2018. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 926-934.

Vazzoler, A.E.A. de M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: *Eduem - Editora da Universidade Estadual de Maringá e SBI - Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 169.

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 water borne 4-

tert octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupt testis morphology in the South American fresh water fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 50: 298-306.

Veloso-Júnior, V.C.; Guimarães-Cruz, R.J.; Barros, M.D.M.; Barata, R.S.L.; Santos, J.E. 2009. Reproduction of the lambari *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces: Characidae) in a small stream in Southeastern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 25: 314-320.

Vested, A.; Giwercman, A.; Bonde, J.P.; Toft, G. 2014. Persistent organic pollutants and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, 16: 71-80.

Vetillard, A.; Bailhache, T. 2006. Effects of 4-n-nonylphenol and tamoxifen on salmon receptor and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicology Sciences*, 92: 523-544.

Vieira, V.A.R.O.; Correia, T.G.; Moreira, R.G. 2013. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 157: 1-8.

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*, 45(2): 223-232.

Xu, H.; Yang, J.; Wang, Y.; Jiang, Q.; Chen, H.; Song, H. 2008. Exposure to 17al-phaethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebra-fish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 88: 1-8.

Zar, J. H. 1999. Biostatistical analysis. Upper Saddle River, NJ: *Prentice-Hall*, 663.

Apêndice 1 – Parâmetros morfométricos e ponderais nos machos adultos de *A. fasciatus* nos reservatórios Ponte Nova e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de verão e inverno (média ± EPM).

Ambientes	Estação	n	*A. fasciatus*			
			Massa corpórea (g)	Comprimento total (cm)	IGS (%)	IHS (%)
Ponte Nova	Verão	5	11,59 ± 0,97[*]	9,90 ± 0,33	1,60 ± 0,25	0,81 ± 0,13
Bororé (Billings)		8	13,95 ± 1,19[a]	10,19 ± 0,32[a]	2,21 ± 0,54	0,94 ± 0,10
Taquacetuba (Billings)		11	15,86 ± 0,62[a*]	11,16 ± 0,25[a]	1,72 ± 0,28	0,83 ± 0,05
Ponte Nova	Inverno	10	9,15 ± 0,43[#]	9,07 ± 0,17[#]	1,89 ± 0,21	0,81 ± 0,06
Bororé (Billings)		7	8,06 ± 1,15[b*]	8,37 ± 0,50[b*]	1,94 ± 0,42	0,67 ± 0,09
Taquacetuba (Billings)		11	4,69 ± 0,30[b*#]	6,81 ± 0,27[b*#]	2,63 ± 0,33	0,64 ± 0,10

[*#]Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano ($p < 0,05$). [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas no mesmo ambiente nas duas estações ($p < 0,05$). IGS: Índice gonadossomático; IHS: Índice hepatossomático.

Uso integrado de biomarcadores no estudo da fisiologia reprodutiva de machos de *Hoplias malabaricus* em reservatórios poluídos

Resumo

Os ambientes aquáticos vêm sendo afetados com a presença de contaminantes e poluentes decorrentes de intensas atividades antrópicas. Muitos destas substâncias podem ser considerados compostos desreguladores endócrinos (EDCs) que têm o potencial de alterar a reprodução dos peixes em vários níveis de organização. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do grau de eutrofização da água dos reservatórios Billings e Guarapiranga sobre a fisiologia reprodutiva de machos de *Hoplias malabaricus*, utilizando-se biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica. Machos adultos foram coletados em diferentes estações do ano em três sítios distintos da mesma bacia hidrográfica: o reservatório de Ponte Nova (PN) considerado ponto de referência pelo estado mais conservado, o reservatório Billings (Bil) nos braços Bororé e Taquacetuba e o reservatório Guarapiranga (Gua) nos braços Embu-guaçu e Barragem, sendos estes sujeitos a um grande impacto antropogênico. Índices biológicos, como índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS), histomorfologia gonadal e biomarcadores, como níveis plasmáticos de testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-KT) e estradiol (E_2), bem como expressão gênica hepática de vitelogenina (*vtgA*) e hormônio folículo estimulante (FSH) hipofisário, foram analisados. A expressão gênica da *vtgA* foi utilizada como biomarcador de exposição a compostos estrogênicos. Os machos apresentaram testículos na fase apto à desova e a morfologia testicular não diferiu entre peixes dos reservatórios. O IGS e IHS foram maiores no ponto Bororé (Bil) durante o inverno. As condições encontradas na água dos reservatórios Bil e Gua, principalmente nos pontos Bororé e Embu-guaçu, respectivamente, interferiram em biomarcadores de efeitos biológicos (concentração plasmática de T, 11-KT e E_2,) em *H. malabaricus*. Já no reservatório de PN, considerado como referência, os biomarcadores analisados não diferiram entre as duas estações do ano, o que pode ser considerado mais uma evidência de que estes animais mantêm a atividade reprodutiva ao longo das duas estações. Além disso, a presença de biomarcadores de exposição (expressão gênica de *vtg-A* em machos) sustenta a hipótese de que o elevado grau de eutrofização nos reservatórios Bil e Gua

pode desencadear respostas estrogênicas em machos de *H. malabaricus* e que estas repostas diferem ao longo das estações do ano, sendo mais acentuadas na Bil. Os dados permitem sugerir que os EDCs presentes neste corpo de água estão interferindo na atividade estrogênica em *H. malabaricus*, mas ajustes na via esteroidogênica permite a reprodução nos ambientes poluídos aqui estudados.

Palavras-chave: Hormônio folículo-estimulante, esteroides gonadais, testículos, impacto antropogênico, vitelogenina.

Abstract

The aquatic environments have been affected by the presence of contaminants and pollutants due to intense anthropogenic activities. Many of these substances can be considered as endocrine disrupting compounds (EDCs) that have the potential to alter the reproduction of fish at various levels of organization. The objective of this study was to evaluate the impact of the degree of water eutrophication of the Billings and Guarapiranga reservoirs on the reproductive physiology of *Hoplias malabaricus* males, using biomarkers at different levels of biological organization. Adult males were collected in different seasons of the year in three different sites of the same basin: the Ponte Nova reservoir (PN) considered the reference point for the most conserved state, the Billings reservoir (Bil) in the Bororé and Taquacetuba arms and the Guarapiranga reservoir (Gua) in the Embu-Guaçu and Barragem arms, both of which are subject to a great anthropogenic impact. Biological indexes, such as hepatosomatic index (HSI) and gonadosomatic index (GSI), gonadal histomorphology and biomarkers, such as plasma levels of testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT) and estradiol (E_2), as well as hepatic vitellogenin (*vtgA*) and pituitary follicle stimulating hormone (FSH) were analyzed. The gene expression of VTG-A was used as a biomarker of exposure to estrogenic compounds. Males showed testicles at the spawning stage and the testicular morphology did not differ among fish from the reservoirs. The GSI and HSI were higher in the Bororé (Bil) point during winter. The conditions found in the water of the Billings and Guarapiranga reservoirs, mainly in the Bororé and Embu-Guaçu points, respectively, interfered in biomarkers of biological effects (plasma concentration of T, 11-KT and E_2) in *H. malabaricus*. In the PN reservoir, considered as a reference, the biomarkers analyzed did not differ between the two seasons of the year, which may be considered as more evidence that these animals maintain reproductive activity throughout the two seasons. In addition, the presence of biomarkers of exposure (gene expression of *vtg-A* in males) supports the hypothesis that the high degree of eutrophication in Bil and Gua reservoirs may trigger estrogenic responses in *H. malabaricus* males and that these responses differ from during the seasons, being more pronounced in Bil. The data allow us to suggest that the EDCs present in this body of water are interfering with estrogenic activity in *H. malabaricus*, but this plasticity in the steroidogenic pathway allows reproduction in the polluted environments studied here.

Key words: Follicle-stimulating hormone, gonadal steroids, testis, anthropogenic impact, vitellogenin.

1. Introdução

Atividades antrópicas, como a industrialização, a agricultura e a urbanização, são fontes importantes de poluição em ecossistemas aquáticos, principalmente devido à grande variedade de compostos químicos que são descartados nos esgotos industrial e doméstico (Goksøyr, 2006). O crescimento e a reprodução são considerados os processos mais suscetíveis aos estressores ambientais (Goede e Barton, 1990) e os peixes são considerados importantes bioindicadores de distúrbios reprodutivos causados pelas ações de vários produtos químicos (Kime, 1999). Entre os contaminantes que afetam os processos fisiológicos da biota aquática estão os compostos de desregulação endócrina (EDCs), que são definidos como compostos que podem interferir com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturalmente secretados. Um grande número de EDCs presentes em ambientes naturais tem origem na eliminação adequada de esgotos em estações de tratamento de águas residuais (Tan *et al*., 2007; Hassell *et al*., 2016). Os EDCs podem agir em diferentes vias que envolvem muitos processos fisiológicos, como reprodução, mimetizando os hormônios estrogênicos (Vázquez *et al*., 2009), a diferenciação sexual (Baroiller e Guiguen, 2001), desenvolvimento gonadal (Vested *et al*., 2014) chegando a induzir a síntese de vitelogenina em machos (Moncaut *et al*., 2003; Vetillard e Bailhache, 2006). Também podem promover alterações nas características sexuais secundárias, comportamento reprodutivo, início da puberdade, morfologia gonadal, qualidade espermática, atraso no desenvolvimento das gônadas e inibição das respostas aos feromônios (Moncaut *et al*., 2003; Mills e Chichester, 2005; Hued *et al*., 2013).

Tais alterações ambientais podem afetar os animais nas diferentes fases do ciclo de vida e os peixes precisam se ajustar às novas condições ambientais para sobreviver e se reproduzir. As respostas às mudanças ambientais dependem das estratégias e táticas reprodutivas de cada espécie (Agostinho *et al*., 1999). A estratégia reprodutiva implica o conjunto de características que uma espécie apresenta para garantir a reprodução bem-sucedida. No entanto, alterações nas condições ambientais podem alterar algumas características da estratégia original das espécies, chamadas de táticas reprodutivas, que variam e possuem um grau diferente de plasticidade dependendo da espécie. Entre as táticas mais comuns apresentadas pelos peixes, podem ser citadas: uso diferenciado de substratos energéticos, alteração do comprimento da primeira maturação; proporção

sexual; mudança no tipo, área e período de desova; tipo de desenvolvimento gonadal (assíncrono ou sincrônico em grupo), dentre outras (Wootton, 1989; Vazzoler, 1996).

O impacto da poluição em comunidades aquáticas tem sido bem documentado em vários reservatórios neotropicais (Mangeaud, 1998; Pompeu e Alves, 2003; Cazenave *et al*., 2005; Hued *et al*., 2006; Kirschbaum *et al*., 2009; Fedato *et al*., 2010) e muitos estudos laboratoriais examinaram os efeitos de substâncias químicas específicas na fisiologia de peixes (Jones e Reynolds, 1997; Robinson *et al*., 2003; Correia *et al*., 2010; Simonato *et al*., 2011; Nascimento *et al*., 2012; Vieira *et al*., 2013).

Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) é uma espécie de peixe Neotropical essencialmente piscívora, com ampla distribuição geográfica em todas as bacias hidrográficas da América do Sul (Fowler, 1950; Godoy, 1975; Oyakawa, 2003)., espécie abundante no Pantanal, comum em ambientes lênticos e semi-lóticos (Uieda, 1984). Esta espécie é geralmente bem estabelecida em ambientes lênticos (Oliveira, 1994) e a sua ampla dispersão em diferentes locais ocorre devido à sua capacidade de sobreviver em ambientes hipóxicos e tolerar longos períodos de jejum (Barbieri, 1989). A ampla distribuição de *H. malabaricus* faz dessa espécie um bom bioindicador (Van der Oost *et al*., 2003; Lins *et al*., 2010), e apresenta o período reprodutivo predominantemente nas estações de primavera e verão (Marques *et al*., 2001; Gomes *et al.*, 2015).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto da poluição dos reservatórios Billings e Guarapiranga sobre a fisiologia reprodutiva de machos de *H. malabaricus*, utilizando-se biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica. A hipótese deste estudo é que o ambiente com elevado impacto de antropização, nos reservatórios Billings e Guarapiranga irá desencadear respostas estrogênicas em machos de *H. malabaricus* e que estas respostas diferem ao longo das estações do ano.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização da área de estudo

A área de estudo compreendeu os dois reservatórios descritos no capítulo 1, sendo o reservatório de Ponte Nova (PN) considerado como a local referência e os braços Taquacetuba e Bororé no reservatório Billings (Bil); e os braços Embu-guaçu e Barragem no reservatório Guarapiranga, considerados como os locais impactados.

2.2. Captura dos animais e coleta de amostras

Machos adultos de *H. malabaricus*, uma espécie carnívora, foram coletadas nos locais previamente descritos. Os procedimentos de captura dos animais e amostragem dos tecidos (Figura 1) foram descritos no Capítulo 2. O número de indivíduos coletados por estação em cada ambiente é apresentado no Apêndice 1 e esse foi o n utilizado em todas as análises realizadas no presente estudo.

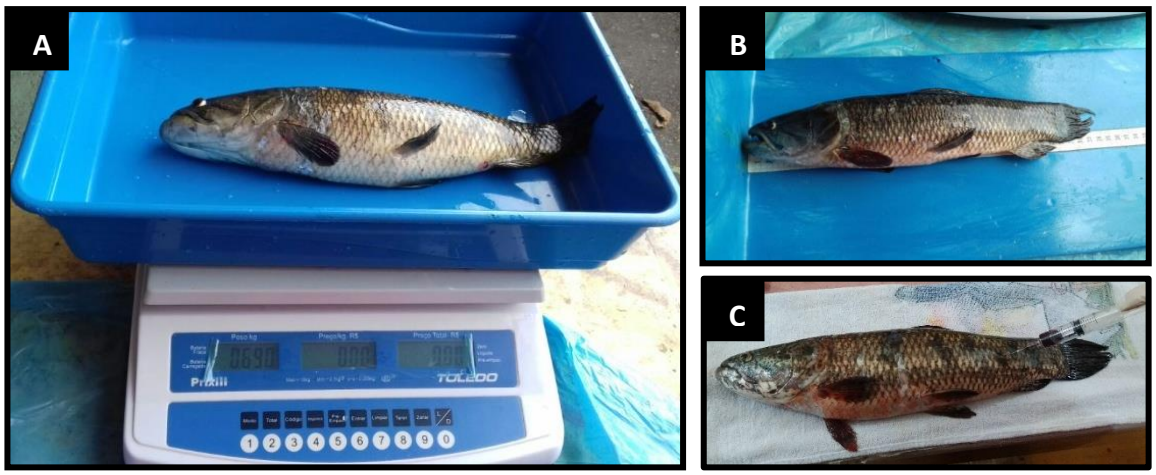


Figura 1 – Machos adultos de *H. malabaricus* coletados nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba) durante as estações de inverno e verão. (**A**) registro da massa total; (**B**) registro do comprimento total e (**C**) coleta de sangue.

2.3. Análise histológica do tecido gonadal

As análises histológicas dos testículos foram realizadas seguindo o protocolo já descrito no capítulo 2. A identificação das fases reprodutivas foi realizada de acordo com a nomenclatura proposta por Brown-Peterson *et al*. (2011).

2.4. Análise da concentração plasmática dos esteroides gonadais

Os níveis plasmáticos de 17β-estradiol (E_2) 11 cetotestosterona (11-KT) e testosterona (T) nos machos, foram quantificados pela técnica de ELISA com o emprego de kits comerciais (Cayman Chemical Company, Michigan, USA), previamente validados em *Hoplias malabaricus* (Gomes *et al*., 2015). Todas as amostras de plasma foram analisadas em duplicatas e seguindo as instruções específicas de cada kit. Ao final de cada ensaio, a absorbância das amostras foi analisada em 405 nm com um leitor de microplaca (Spectra Max 250 Molecular Devices) e os resultados expressos em pg ml^{-1}.

2.5. Análise da expressão gênica

2.5.1. Extração de RNA total

A extração de RNA total dos fragmentos dos órgãos (hipófise e fígado) de *H. malabaricus,* foi realizada com Trizol para os dois tecidos, pelo método de extração por fenol-clorofórmio proposto por Chomzynski e Sacci (1987) e foram realizadas seguindo o protocolo descrito no capítulo 2.

2.5.2. Síntese de cDNA

O cDNA de cada amostra de RNA utilizado nas reações de RT-PCR foi sintetizado por meio da incubação de 1000 ng de RNA total e foram realizadas seguindo os protocolos descritos no capítulo 2.

2.5.3. Desenho dos primers *fshb* e *vtg*

Para a clonagem dos cDNAs dos genes *fshb* e *vtg* em *H. malabaricus,* o desenho de primers degenerados ou iniciadores degenerados para o RT-qPCR, foram projetados a partir de regiões altamente conservadas das sequências nucleotídicas de *fshb* e *vtgA*, identificado após múltiplos alinhamentos das sequências disponíveis de espécies de teleósteos das ordens Siluriformes e Characiformes obtidas no GenBank e por meio do *software* de alinhamento Jalview (http://www.jalview.org) (Waterhouse *et al*., 2009). (*fshb*: Nº de acesso. JQ045707.1, XM_022667102.1, KJ544557.1, KC867349.1, XM_017703523.1, NM_001200079.1, XM_026937645.1, MF373411.1, KP036408.1, KF998583.1, KF573627.1, XM_027137127.1, XM_027137126.1, AF324541.1, AF112192.1, AF112191.1, NM_001200080.1, HP589734) e (*vtgA* Nº de acesso. XM_022669752.1, XM_007233156.3, XM_022679416.1, XM_026922653.1, XM_026919616.1, XM_026915196.1, EU138884.3, XM_017702244.1,

XM_027017401.1, XM_027160207.1, XM_027160506.1, XM_027170057.1, XM_027160502.1, XM_027148677.1).

Os resultados do alinhamento obtidos foram analisados utilizando-se a interface Nucleotide BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para a verificação de homologia com as sequências de outros genes no GenBank e a ferramenta OligoAnalyzer do IDT (https://eu.idtdna.com) para analizar: 1) propriedades físicas da sequência do *primer*: comprimento do *primer*, conteúdo GC, temperatura de fusão, coeficiente de extinção, peso molecular, µg / DO e nmoles / OD; 2) HAIRPIN: que prevê estruturas secundárias do *primer*, usando o algoritmo mFold (desenvolvido pelo Dr. Michael Zuker); 3) SELF-DIMER: para relatar possíveis duplexes e suas estabilidades quando o *primer* se hibridiza; 4) HETERO-DIMER: examina possíveis duplexes quando o *primer* puder recorrer a qualquer sequência de destino. Tendo em consideração todos esses parâmetros, se escolheram 2 *primers* degenerados para *fshb* e 3 *primers* degenerados para *vtgA*, as quais foram sintetizados por Thermofisher S.A. (Invitrogen). As sequências primárias de pares de primers degenerados (Tabela 1) para o PCR convencional foram as seguintes:

Tabela 1 – Relação dos *primers* para PCR convencional dos genes *fshb* e *vtgA* para *H. malabaricus*. Seja: F, forward e R, reverse.

Primer	**Sequência 5´→ 3´**
fshb F1	5'- CAG AAC ACC TGT AAC TTC AGG G -3'
fshb R1	5'- GTG TTA CAC TGG CTG CAC T -3'
fshb F2	5'- CAA CAT CTC CAT CAC CGT GG -3'
fshb R2	5'- CCT GAA GTT ACA GGT GTT CTG G -3'
vtg F1	5'- TGA GAG CTG TTG TGC TTG C -3'
vtg R1	5'- CTG ATG AGA ACC TTG CTG CTG -3'
vtg F2	5'- TGA GGT TGG TGT GAG AAC TG -3'
vtg R2	5'- GTT GGC AAA AGC AAT TTC CTG -3'
vtg F3	5'- GCA CAG AGG TAT CCT CAA CAT -3'
vtg R3	5'- GAG TTC CAG CCT CAT GCA -3'

A seguir foram realizadas reações de PCR convencional para avaliar se os *primers* acima citados amplificariam os produtos de interesse. As condições específicas das

reações de amplificação foram padronizadas a partir das condições padrão de enzima Taq DNA polimerase (EP0402, *Invitrogen Life Technologies*): 5µL de Taq Buffer (10X) com 2,5 µL $MgCl_2$ (25mM), 35,75µL de água, 1 µL de Solução Mix de desoxinucleotídeo (dNTP) com 10 nM para cada dNTP, 1 µL de cada *primer* (0,2 µM) e 0,25 µL de taq DNA (1,25 U) Polimerase (Invitrogen). Para isso, foi utilizado gradiente de temperatura 95°C por 3 min, seguido de ciclagem de 95°C por 30 seg, temperatura de anelamento de 60°C por 30seg, 72°C por 60 seg e a extensão final de 72°C por 10 min, por 35 ciclos.

Os produtos destas reações de PCR convencional foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo em tampão 1X Tris-borato-EDTA (TBE). O volume de 7ul de cada produto de PCR (50 µL) foi aplicado no gel juntamente com 3 µL de *loading buffer* 6X (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 120 V por 30 min e, a seguir, o gel foi analisado em transiluminador sob exposição à luz ultravioleta.

2.5.4. Análises de expressão gênica - PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os ensaios de PCR quantitativa (qPCR) em tempo real foram realizadas no equipamento Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems com SDS Software (Life Technologies, USA), pertencente ao Centro de Tecnologias Avançadas em Genômica IQ – USP, coordenado pela Profa. Dra. Aline Maria da Silva. Para a quantificação dos produtos formados durante a reação de qPCR foi utilizado o reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) e foi realizada seguindo o protocolo descrito no capítulo 2.

Ao final do processo de validação, os *primers* que melhor se enquadraram nos critérios avaliados foram escolhidos (Tabela 2) e utilizados nas reações de qPCR do estudo, seguindo o protocolo descrito no capítulo 2.

Tabela 2 – Relação dos *primers*, tamanho do amplicon, replicabilidade da reação e eficiência de amplificação de transcritos analisados por RT-qPCR em *H. malabaricus*. Seja: F, *forward* e R, *reverse*.

Primer	**Sequência 5´→ 3´**	**Amplicon (pb)**	**R^2 (%)**	**Eficiência (E)**
fshb F1	CAG AAC ACC TGT AAC TTC AGG G	125	1,000	1,956[a]
fshb R1	GTG TTA CAC TGG CTG CAC T			
vtg F1	TGA GAG CTG TTG TGC TTG C	181	1,000	1,912[a]
vtg R1	CTG ATG AGA ACC TTG CTG CTG			
elfα F	TGG TAC CTC TCA GGC TGA C	121	1,000	1,998[a]
elfα R	ACC AAG GGT GAA GGC CAG			

[a]Eficiência obtida com cDNA diluído 10 vezes, equivalente a 8,33 ng/ul para *vtg* e 10ng/ul para *fshb*.

2.5. Análises estatísticas

Os resultados foram comparados e expressos pela média ± erro padrão da média (EPM). As respostas fisiológicas foram analisadas com base em dois fatores: 1) grupos experimentais: reservatórios Billings (pontos Taquacetuba e Bororé); Guarapiranga (Barragem e Embu-Guaçu) e Ponte Nova; 2) Estações do ano: inverno (julho/agosto de 2017) e verão (janeiro de 2018). Foi aplicado o teste de Análise de Variância (*two way* - ANOVA), seguindo de testes de normalidade e homogeneidade de variância. Quando cumpriam os requerimentos de uma análise paramétrica, os resultados foram comparados com testes de comparações múltiplas post-hoc Student-Newmann-Keuls (SNK). Para os dados que não cumpriram esses requerimentos, o teste Kruskal-Wallis foi aplicado (Zar, 1999). Em todos os casos, o nível de significância de $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. As análises foram realizadas com o software *GraphPad Prism* 8.1 (San Diego, CA, USA).

3. Resultados

3.1. Parâmetros ponderais, morfométricos e índices somáticos

O comprimento total e a massa corpórea dos animais coletados não apresentaram variações durante as duas estações (p<0.05) e comparando-se os três reservatórios, (Apêndice 1).

Os índices somáticos IGS e IHS no inverno foram mais elevados no ponto Bororé (0,24 ± 0,03 e 1,45 ± 0,11; respectivamente) (Figura 2). Os machos de *H. malabaricus* coletados no braço Bororé da Billings apresentaram IGS mais elevados que os animais coletados no Taquacetuba (*P* = 0,018) e o IHS dos animais coletados em Bororé foi mais elevado que os animais coletados no braço Embu-guaçu (Gurapiranga) (*P* = 0,007) durante o inverno. Nos machos dos demais reservatórios, não foram observadas variações do IGS e IHS durante as estações (p>0.05) (Figura 2 A, B).

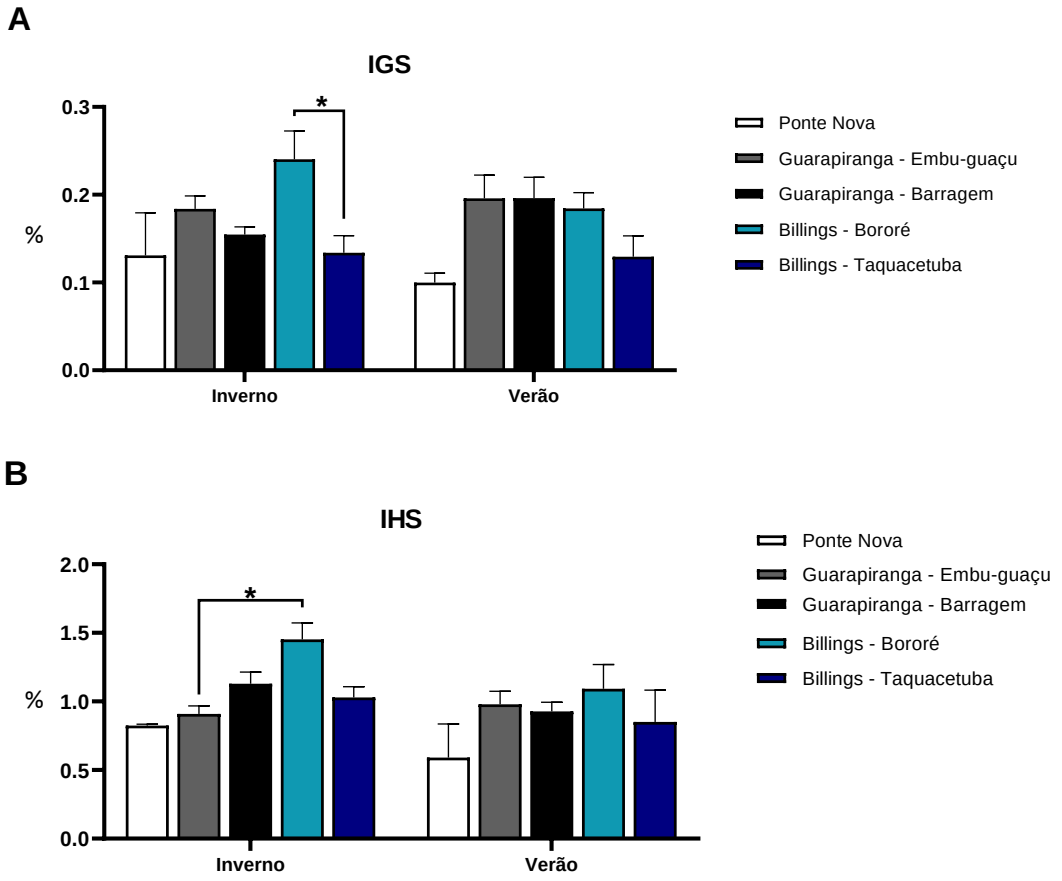


Figura 2 – Índices Gonadossomático (**A**), Hepatossomático (**B**) nos machos adultos de H. malabaricus nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de inverno e verão. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. *Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano (p< 0,05).

Em relação à dinâmica testicular, foram observados espermatozoides durante as duas estações estudadas (Figura 3) e, desta forma, os machos foram classificados na fase apta à desova (Tabela 3). Os estágios da espermatogênese, espermátides e espermatozoides, assim como a presença de cistos espermatogênicos foram encontrados ao longo de todo o testículo nas duas estações (Figura 3), evidenciando que diferentes parcelas de espermatozoides são recrutadas na espermatogênese.

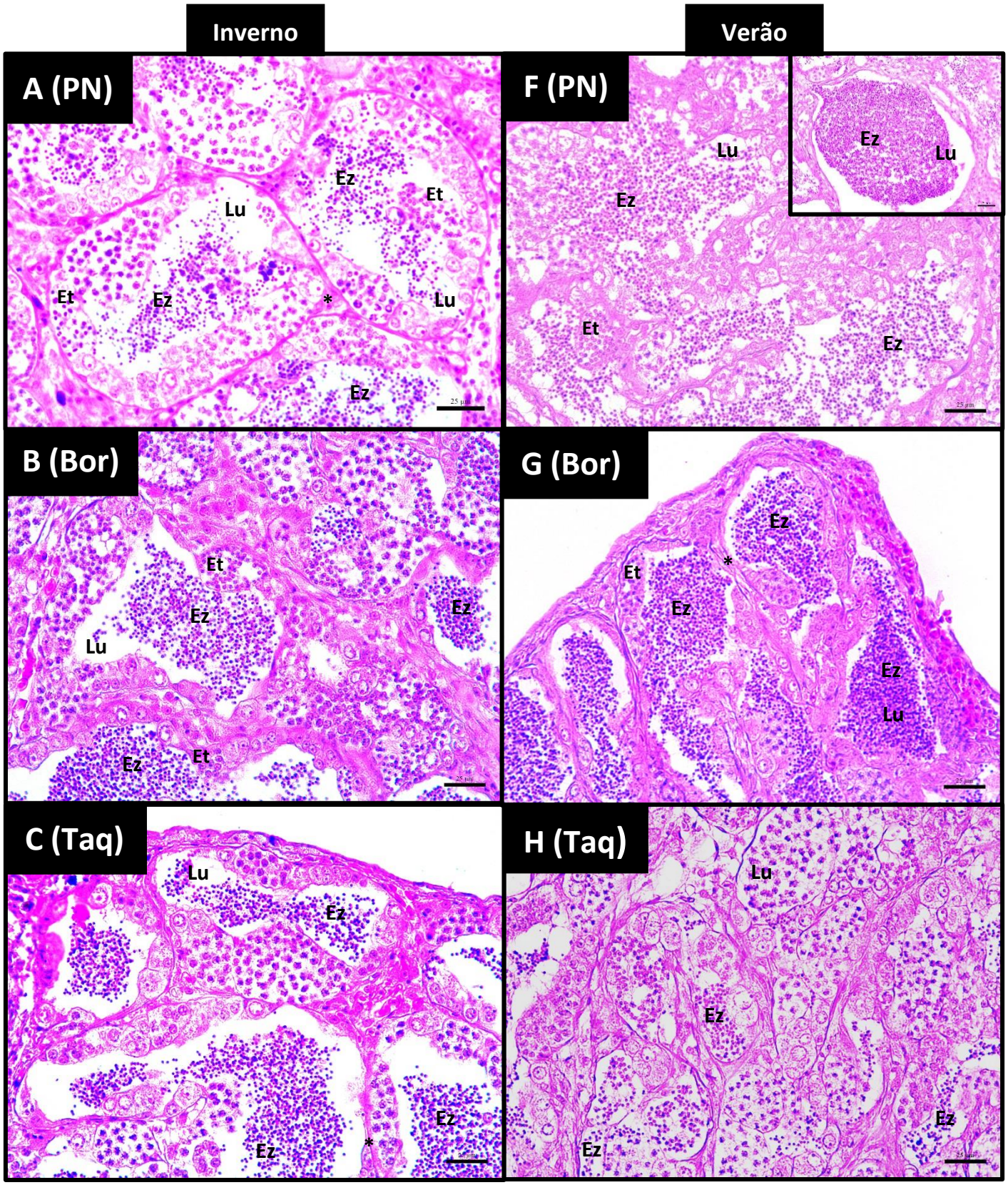
No verão (Figura 3 F, G e I) foi observada a fase apta à desova, na qual o animal já completou o desenvolvimento gonadal e está fisiologicamente preparado para reproduzir. Os testículos são grandes e firmes, e os espermatozoides são detectados no lúmen dos lóbulos ou nos ductos espermáticos. Todos os estágios da espermatogênese podem ser observados, assim como a presença de cistos ao longo de todo o testículo. Nesta estação, alguns animais também se encontravam na fase de regressão (Figura 3H e J), os testículos são pequenos e flácidos, podem ser detectados espermatozoides residuais no lúmen dos lóbulos e ductos espermáticos. Também são observados cistos próximos à periferia (Figura 3G), apresentando espermátides e espermatozoides (Figura 3A-B).

No inverno (Figura 4 A - B) foi observada a fase de apto à desova e de regressão, da mesma forma que no verão. A morfologia dos testículos foi igual nas duas estações e não teve variação entre pontos de coleta.

Tabela 3 – Fases reprodutivas dos machos adultos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de inverno e verão

Ambientes	Estação	*H. malabaricus*						
		n Histologia	Apto a desova	(%)	Regressão	(%)	Regeneração	(%)
Ponte Nova	Inverno	3	2	66,67	1	33,33	0	0,00
Bororé (Billings)		9	3	33,33	5	55,56	1	11,11
Taquacetuba (Billings)		6	5	83,33	0	0,00	1	16,67
Barragem (Guarapiranga)		7	5	71,43	2	28,57	0	0,00
Embu-Guaçu (Guarapiranga)		11	11	100,00	0	0,00	0	0,00
Ponte Nova	Verão	3	1	33,33	2	66,67	0	0,00
Bororé (Billings)		7	3	42,86	2	28,57	2	28,57
Taquacetuba (Billings)		3	2	66,67	1	33,33	0	0,00
Barragem (Guarapiranga)		7	6	200,00	1	33,33	0	0,00
Embu-Guaçu (Guarapiranga)		5	3	60,00	2	40,00	0	0,00

(%): Porcentagem das fases reprodutivas.


Inverno
Verão
A (PN)
Ez
Et
Lu
Et
Ez
*
Lu
Ez
F (PN)
Lu
Ez
Ez
Lu
Et
Ez
B (Bor)
Et
Ez
Ez
Lu
Ez
Et
G (Bor)
Ez
Et
*
Ez
Ez
Lu
C (Taq)
Lu
Ez
Ez
Ez
*
H (Taq)
Lu
Ez
Ez
Ez

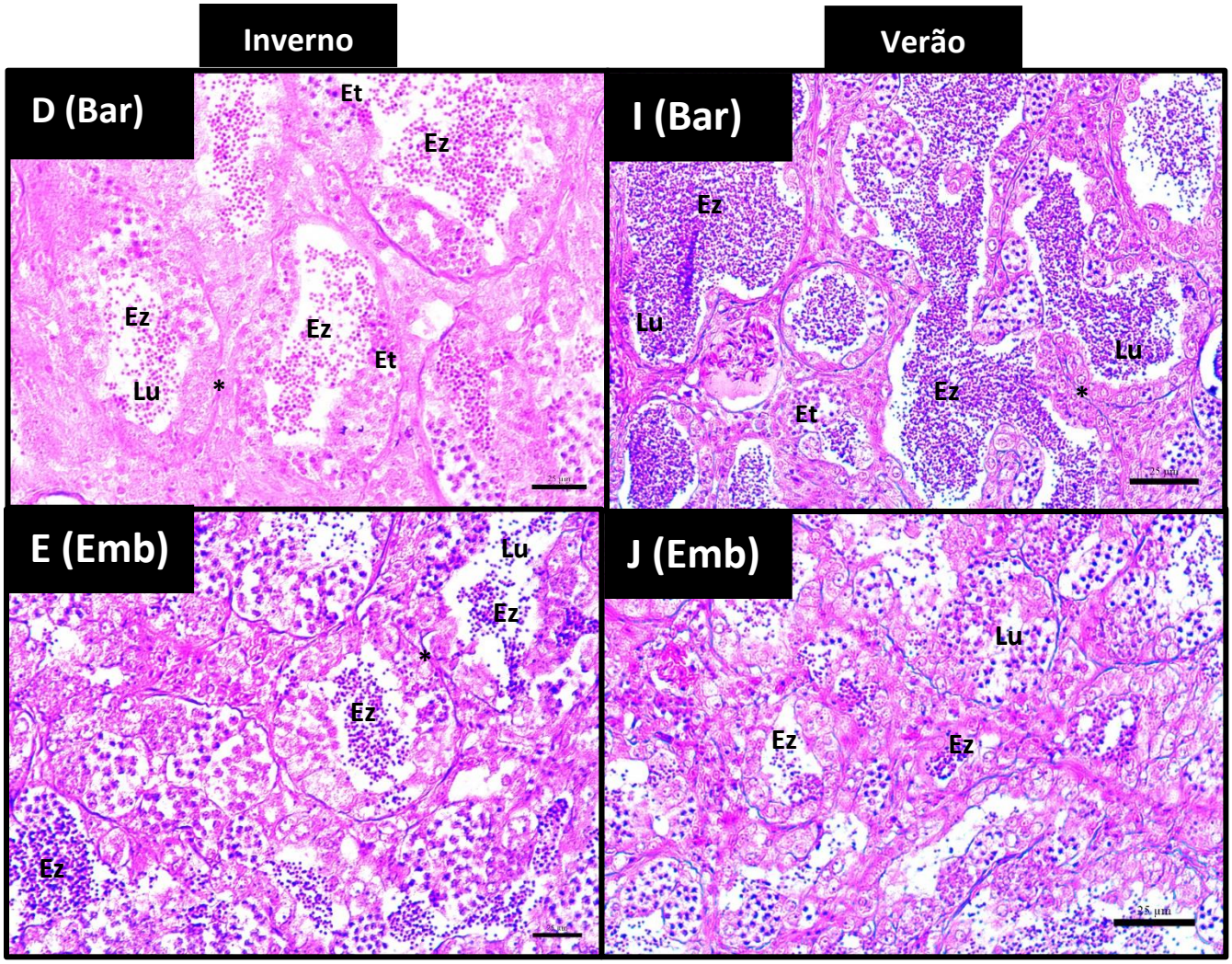


Figura 3 – Análise histológica dos testículos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova (referência) e impactados Billings (Taquacetuba e Bororé) e Guarapiranga (Barragem e Embu-guaçu), durante as estações de inverno e verão. **A**) Inverno no reservatório PN; **B**) Inverno no reservatório Bil (Bororé); **C)** Inverno no reservatório Bil (Taquacetuba); **D**) Inverno no Reservatório Gua (Barragem); **E**) Inverno no Reservatório Gua (Embu-guaçu); **F**) Verão no reservatório PN; **G**) Verão no reservatório Bil (Bororé); **H**) Verão no reservatório Bil (Taquacetuba); **I**) Verão no Reservatório Gua (Barragem); **J**) Verão no Reservatório Gua (Embu-guaçu). A fase de desova (**B-D**, **F**, **G**, **I** e **K**), fase em desova (**A**, **E**, **H** e **J**), mostrando redução da espermatogênese. Interstício (asterisco), espermatócitos (Et), espermatozoides (Ez) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estações, com excepção de PN (n = 2, no inverno e n = 3, no verão) e Bil (Taquacetuba) (n = 3, no verão). Escala: Barra: 25µm.Apto à desova (**A**, **B**, **C** e **E**, **F**) e em regressão (**D**), mostrando redução da espermatogênese e espermatozoides residuais. Interstício (asterisco), espermatócitos (Et), espermatozoides (Ez) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estação. Escala: Barra: 25µm.

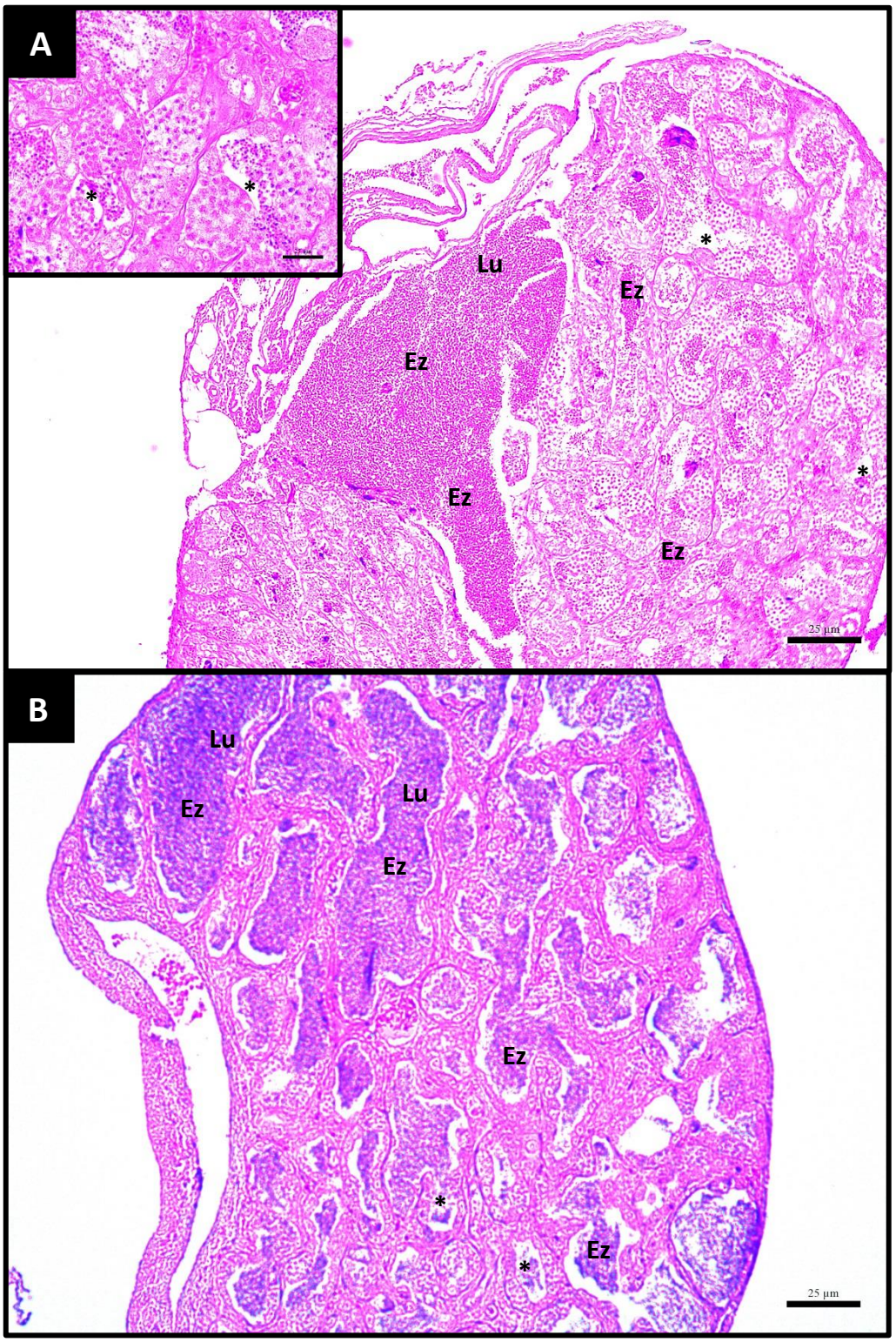


Figura 4 – Análise histológica dos testículos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova (referência) e impactado Guarapiranga. Mostrando a maior tamanho o contraste entre as duas estações de inverno e verão. **A**) A fase de desova e fase em regressão no inverno no reservatório Gua (Barraguem); **B**) A fase de desova e fase em regressão no verão no reservatório Gua (Barraguem). Espermatozoides (Ez), espermatozoides residuais (*) e lúmen testicular (Lu). Coloração H-E. n = 5 animais por ambiente em cada estações. Escala: Barra: 25µm.

3.2. Concentração plasmática dos esteroides gonadais

Nos machos de *H. malabaricus* a concentração plasmática de T foi maior nos animais coletados no ponto Bororé no verão quando comparados à estação do inverno (*P* = 0,002). Este mesmo andrógeno foi mais elevado nos animais coletados na Barragem quando comparados com aqueles coletados no ponto Taquacetuba (*P* = 0,016) no inverno. Já durante a estação do verão, a concentração plasmática de T foi mais elevada nos animais coletados no ponto Bororé (*P* = 0,002), Barragem (*P* = 0,019) e Embu-guaçu (0,001) do que aqueles coletados na Ponte Nova (Figura 5A).

A concentração plasmática de 11-KT seguiu um perfil muito semelhante àquele da T, com maior concentração no plasma dos animais coletados no verão em relação ao inverno nos animais do ponto Bororé (*P* = 0,001). Valores mais elevados de 11-KT também foram obtidos no verão nos animais coletados no ponto Embu-guaçu quando comparados à Ponte Nova (*P* = 0,015). Concentrações mais elevadas de 11-KT também foram encontradas no plasma dos animais coletados no ponto Bororé em relação aos animais coletados nos pontos Taquacetuba (*P* = 0,007), Barragem (*P* = 0,001) e Ponte Nova (*P* = 0,004) no verão (Figura 5B).

Os machos amostrados no ponto Embu-guaçu apresentaram maior concentração plasmática de E_2 no verão quando comparados com aqueles coletados no inverno (*P* = 0,001). No ponto Bororé, o perfil foi oposto, com maior concentração plasmática de E_2 no inverno comparando-se à estação do verão (*P* = 0,001). A concentração de E_2 foi mais elevada nos animais coletados no ponto Bororé comparando-se a todos os outros pontos de coleta durante o inverno (*P* = 0,009 em Ponte Nova; *P* = 0,003 em Taquacetuba; *P* = 0,001 em Barragem e *P* = 0,001 em Embu-guaçu). No verão, a concentração de E_2 foi mais elevada nos animais coletados no ponto Embu-guaçu quando comparados copm aqueles coletados em Barragem (*P* = 0,006) e Ponte Nova (*P* = 0,001) (Figura 5C).

3.3. Expressão gênica de *vtgA* e *fshb*

Os níveis expressão de *fshb* em *H. malabaricus* foram maiores no verão nos machos amostrados em Taquacetuba (P = 0,034) e Embu-guaçu (P = 0,001) quando comparados com os animais amostrados no inverno. E durante a estação do verão, os animais coletados no ponto Embu-guaçu apresentaram maiores níveis de expressão de *fshb* do que os animais coletados na Ponte Nova (P = 0,001), Bororé (P = 0,001), Taquacetuba (P = 0,003) e Barragem (P = 0,001) (Figura 6A).

Os níveis de expressão de *vtgA* foram maiores no inverno em relação ao verão nos animais coletados no ponto Bororé (P = 0,001). E durante a estação de inverno, os animais coletados no ponto Bororé apresentaram maiores níveis de expressão de *vtgA* do que os animais coletados na Ponte Nova (P = 0,008) e Taquacetuba (P = 0,001). Os animais de Embu-guaçu apresentaram os níveis de expressão de *vtgA* mais elevados do que os animais coletados no ponto Taquacetuba (P = 0,009) no inverno. Durante o verão, os animais coletados no ponto Embu-guaçu apresentaram maiores níveis de expressão de *vtgA* do que os animais coletados na Ponte Nova (P = 0,035), Bororé (P = 0,001) e Taquacetuba (P = 0,001) (Figura 6B). Durante o inverno, os animais coletados no ponto Barragem apresentaram os níveis de expressão de *vtgA* mais elevados do que os animais coletados no ponto Bororé (P = 0,025) e Taquacetuba (P = 0,021) (Figura 6B).

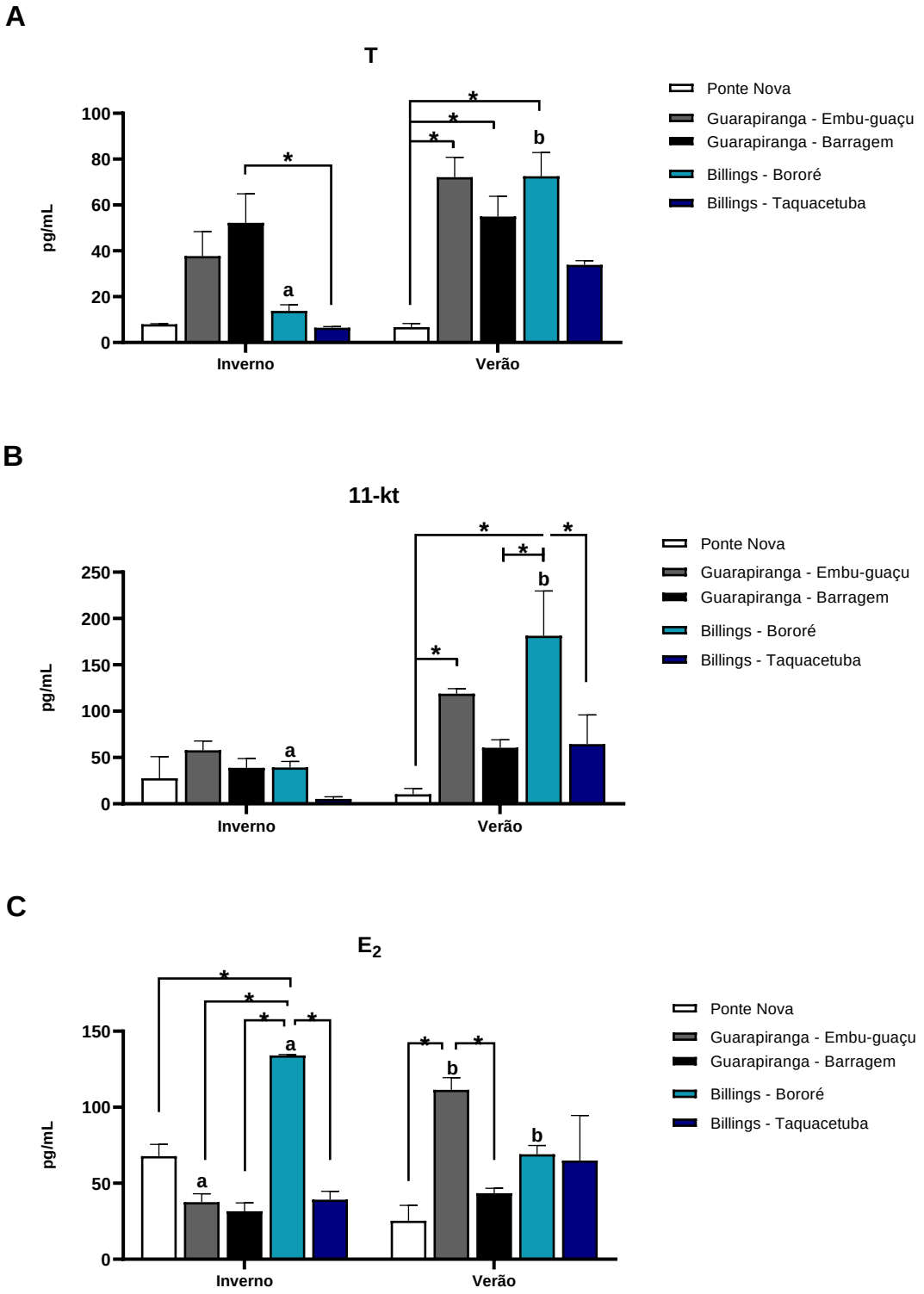


Figura 5 – Concentração plasmática de T (**A**), 11-kt (**B**) e E_2 (**C**) nos machos adultos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de inverno e verão. Os dados estão expressões como média ± erro padrão da média. [*]Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano ($p < 0,05$). [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas no mesmo ambiente nas duas estações ($p < 0,05$).

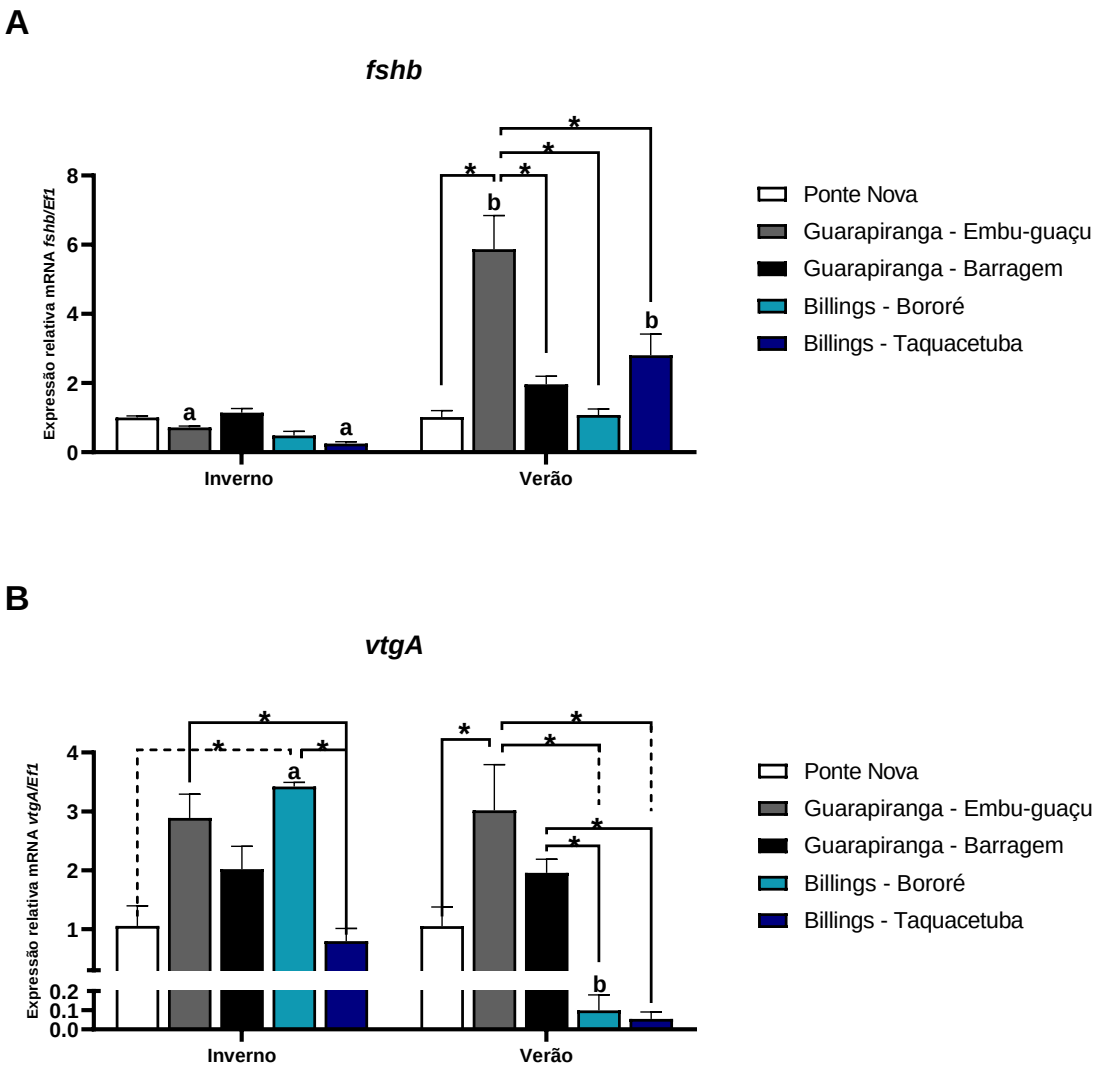


Figura 6 - Expressão relativa do mRNA para *fshb* (**A**) e *vtgA* (**B**), nos machos adultos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de inverno e verão. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média e foram calibrados em relação à média dos espécimes coletados no reservatório Ponte Nova (coluna branca). *Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano ($p < 0,05$). [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas no mesmo ambiente nas duas estações ($p < 0,05$).

4. Discussão

4.1. Parâmetros reprodutivos de *H. malabaricus*

As táticas reprodutivas dependem da interação entre o ambiente e as respostas genéticas, fisiológicas, comportamentais e ecológicas de cada indivíduo para manifestar a estratégia reprodutiva (Potts e Wootton, 1984). *H. malabaricus* apresenta cuidado parental, desova mais de uma vez, em uma temporada reprodutiva limitada ao período de primavera e verão e os ovos são depositados em ninhos construídos no fundo dos rios, sem grandes exigências com relação ao tipo de substrato (Marques *et al*., 2001). Contudo, no presente estudo, os machos nos reservatórios parecem ter uma desova do tipo parcelada, confirmada pela presença predominante de espermatozoides ao longo das duas estações de coleta. Segundo Barbieri (1989), na represa de Monjolinho em São Carlos, SP, *H. malabaricus* apresenta período reprodutivo nos meses de setembro e outubro e desova do tipo parcelada. Estudos iniciais de Azevedo e Gomes (1943) e Caramaschi (1979) verificaram que a traíra inicia a desova em novembro e se estende até fevereiro em Pirassununga, SP e até março na represa do rio Pardo em Botucatu, SP. Esse período relativamente longo de reprodução é explicado por Eustáquio (2009) como uma estratégia importante para a sobrevivência das espécies de peixes frentes às condições desfavoráveis. Desta forma, os dados do presente trabalho são corroborados por estudos com esta espécie, que registram desova do tipo parcelada em ambientes represados, apresentando capacidade de se ajustar às novas condições.

O IGS e IHS podem ser considerados importantes indicadores no processo reprodutivo, sendo relacionados ao aporte de substratos energéticos (Sayer *et al*., 1995). Apesar de apresentarem elevação apenas no ponto Bororé durante o inverno, esta diferença não pode ser atribuída somente ao processo reprodutivo, uma vez que a ocorrência de desova parcelada nos reservatórios PN, Bil e Gua pode estar relacionada à elevada e constante disponibilidade de alimento no ambiente. As características da qualidade da água exercem muita influência na utilização das reservas energéticas pelos animais (Gomes, 2016), e é importante destacar o sucesso de captura foi menor em algumas coletas, impossibilitando a obtenção de um número amostral maior, fato também observado por Eustáquio (2009).

A variabilidade quanto ao período reprodutivo de uma espécie de peixe, em diferentes ambientes, tem sido explicada como decorrente da influência de fatores

abióticos (Vazzoler e Menezes, 1992; Silvano *et al*., 2003; Alvarenga *et al*., 2005). Segundo Vazzoler (1996), após uma espécie ter atingido a maturidade sexual, variáveis ambientais como a temperatura, o fotoperíodo e a precipitação, passam a atuar sobre os indivíduos de modo que as condições na época de desova sejam as mais favoráveis possíveis, para a sobrevivência e o crescimento da prole. Historicamente, no inverno o índice pluviométrico é menor e o verão compreende a estação chuvosa (INMET, 2018) na região onde este trabalho foi desenvolvido. As inundações provocadas pela alta pluviosidade resultam em aumento da disponibilidade de nutrientes, facilitando a reprodução, bem como a sobrevivência das larvas (Vazzoler e Menezes, 1992). O aumento do aporte de nutrientes pode estar relacionado ao maior desenvolvimento de fito e zooplâncton, bactérias e fauna de invertebrados, importantes fontes alimentares para as larvas e jovens da traíra. Uma relação direta entre a reprodução e o período chuvoso foi observada para a traíra por Caramaschi (1979) e Barbieri (1989), o que sugere a influência do aumento da pluviosidade sobre a desova da espécie. Azevedo e Gomes (1943) e Paiva (1974) sugeriram que a traíra desova independentemente da época de chuvas, mas que o aumento da precipitação pluviométrica influencia o processo. Nos rios, com as chuvas, há um aumento do nível da água, deixando a vegetação submersa, o que proporciona uma área favorável à desova e benefícios às larvas e jovens com alimento e proteção contra predadores (Leão *et al*., 1991)

Os resultados deste trabalho corroboram os dados de estudos anteriores de que *H. malabaricus* tem alta plasticidade reprodutiva (Marques *et al*., 2001), com desova no inverno e no verão nos locais analisados. Adicionalmente, estudando fêmeas desta espécie, Gomes *et al*. (2015) descreve que *H. malabaricus* tem desenvolvimento gonadal do tipo sincrônico em grupo, com múltiplas desovas, limitadas à primavera e verão. No entanto, nossos dados mostram que nos reservatórios estudados *H. malabaricus* está apta à reprodução também no inverno.

4.2. Expressão gênica de *vtgA* e *fshb* e níveis plasmáticos de esteroides gonadais de *H. malabaricus.*

No presente estudo, a fisiologia reprodutiva de *H. malabaricus* foi estudada utilizando-se biomarcadores relacionados à maturação gonadal, para avaliar os efeitos da diminuição da qualidade da água dos reservatórios Billings e Guarapranga neste processo. Biomarcadores moleculares, tais como expressão gênica de *fshb* e *vtgA*, a concentração plasmática de E_2, T e 11KT, e características morfológicas, como morfologia gonadal, geraram respostas diferentes, mostrando que os peixes possuem várias habilidades regulatórias, mesmo em condições ambientais adversas.

É importante destacar que no reservatório de Ponte Nova, considerado como referência os biomarcadores analisados não diferiram entre as duas estações do ano, o que pode ser considerada mais uma evidência de que estes animais mantêm atividade reprodutiva ao longo das duas estações. No ponto Taquacetuba (Bil) e no ponto Embu-guaçu (Gua) os níveis dos transcritos de *fshb* foram mais elevados no verão, período em que ocorreu um intenso processo de espermatogênese (Schulz *et al*., 2010). Paralelamente ao aumento dos níveis de *fshb*, também observamos que machos de *H. malabaricus* apresentaram níveis elevados de T e 11-KT também no verão, mas apenas no ponto Bororé (Bil). É sabido que o FSH é um potente indutor da esteroidogênse gonadal (Schulz *et al*., 2010) e nossos dados evidenciam que o aumento da expressão de *fshb* nos animais coletados no verão em pontos específicos da Bil e Gua, estão acompanhados de um aumento da concentração plasmática de T e 11-KT em alguns destes pontos. No entanto, o experimento realizado não permite estabelecer uma relação da expressão desta gonadotropina e os níveis plasmáticos destes andrógenos. As variações na concentração de andrógenos plasmáticos e expressão de *fshb* em *H. malabaricus* ocorreram principalmente no verão, período no qual a espermatogênese está mais ativa. Adicionalmente, estas variações foram mais evidentes nos pontos de coleta dos reservatórios Billings e Guarapiranga, classificados de meso a eutróficos nesta estação.

Assim como observado em *A. fasciatus* (capítulo 2), a expressão gênica da *vtgA*, biomarcador da exposição a contaminantes de ação estrogênica mostrou alterações em machos em estações distintas. Machos apresentam o gene que expressa *vtg-A*, no entanto esta glicolipofosfoproteína não tem função nestes animais, haja vista que a vitelogênese não é um processo fisiologicamente relevante em machos. Os dados apresentados neste estudo mostram que os níveis de expressão de *vtg-A* nos animais coletados na Ponte Nova

não se alteraram entre as estações, o que seria esperado em ambiente referência. No entanto, no ponto Bororé (Bil), na estação do inverno, os níveis de expressão de *vtgA* foram mais elevados que no verão, sugerindo a presença de compostos de ação estrogênica, que poderiam estar desencadeando esta resposta, haja vista que os níveis de E_2 nestes animais são mais altos no inverno em relação ao verão, também neste ponto da Billings. É importante destacar também que durante o verão, os níveis de expressão de *vtg-A* no ponto Embu-guaçu (Gua) foram mais elevados em relação a PN, mas não variou entre as estações, mas os níveis plasmáticos de E_2 nos animais coletados no ponto Embu-guaçu foram mais elevados no verão em relação ao inverno.

Uma análise conjunta dos dados de *vtgA* com a concentração plasmática de E_2 mostram que este estrógeno se eleva no plasma dos animais da Billings (ponto Bororé) no inverno, fato que não ocorreu na Ponte Nova. Gomes *et al*. (2015) e Tolussi (2016) estudando *A. fasciatus* no reservatório Billings (ponto Taquacetuba) mostraram uma relação entre a presença de EDCs e a expressão de *vtgA*. Embora os machos pareçam ajustar seu ciclo a diferentes ambientes da Billings, as evidências de expressão gênica de *vtg-A* e altos níveis de E_2 durante o inverno sugerem a presença de xenobióticos, atuando como estrogênicos neste reservatório que podem estar interferindo nos processos reprodutivos de *H. malabaricus*. A presença destes EDCs também pode explicar a concentração mais elevada de andrógenos na Billings (ponto Bororé), no verão em relação ao inverno, e em relação aos animais amostrados na Ponte Nova.

É importante reforçar o fato de que os estrógenos, principalmente o E_2 tem uma importante ação na espermatogênese, agindo na proliferação mitótica das espermatogônias (Schulz *et al*., 2010). Desta forma, seria perfeitamente previsível a presença de níveis mais elevados deste estrógeno no período do inverno, quando normalmente a espermatogênese tem início. No entanto, dados coletados de animais na Ponte Nova não demonstram esta variação, que só se mostra evidente no ponto Bororé (Bil).

Neste estudo, apesar das alterações nos biomarcadores, havia espermatozoides nos testículos em todos os pontos de coleta e nas duas estações do ano. Esses resultados apontam para mecanismos regulatórios que minimizam o efeito das alterações observadas nestes biomarcadores, em nível histomorfológico. Em conjunto, os resultados encontrados neste estudo sugerem que os EDCs presentes na Billings influenciaram principalmente os biomarcadores efeitos biológicos.

Os animais exibiram alterações em biomarcadores de exposição em momentos específicos, possivelmente causados por diferentes contaminantes. Estes contaminantes podem influenciar na toxicidade de outros compostos, resultando em efeitos interativos, como aditivos, sinérgicos ou antagônicos (Beyer *et al*., 2014). Como afirmado por Cortes *et al*. (2016), este estudo corrobora e reforça a importância de incluir diferentes biomarcadores para avaliar a análise de risco. Diante deste contexto, acreditamos que na continuação da reavaliação desses riscos, outras análises devem ser consideradas, especialmente em áreas suscetíveis às variações de contaminação ambiental ou antropogênica, como locais próximos aos centros urbanos.

5. Conclusões

O uso de diferentes biomarcadores em vários níveis de organização permitiu descrever as alterações nos processos fisiológicos envolvidos no processo de maturação gonadal em *H. malabaricus* e sugerir a presença e os efeitos dos EDCs no ponto Bororé, ambiente impactado, durante o inverno. As condições encontradas na água dos reservatórios Billings e Guarapiranga, principalmente nos pontos Bororé e Embu-guaçu, respectivamente, interferiram em biomarcadores de efeitos biológicos (concentração plasmática de T, 11-KT e E_2,) em *H. malabaricus*. Já no reservatório de Ponte Nova, considerado como referência, os biomarcadores analisados não diferiram entre as duas estações do ano, o que pode ser mais uma evidência de que estes animais mantêm a atividade reprodutiva ao longo das duas estações. Além disso, a presença de biomarcadores de exposição (expressão gênica de *vtg-A* em machos) sustenta a hipótese de que os EDCs nos reservatórios Billings e Guarapiranga podem desencadear respostas estrogênicas em machos de *H. malabaricus* corroborando nossa hipótese inicial, e que estas respostas diferem ao longo das estações do ano, sendo mais acentuadas na Billings. Os dados permitem sugerir que os EDCs presentes neste corpo de água estão interferindo na atividade estrogênica em *H. malabaricus*, mas ajustes na via esteroidogênica permitem a reprodução nos ambientes poluídos aqui estudados.

Referências Bibliográficas

Alvarenga, E.R.; Bazzoli, N.; Santos, G.B.; Rizzo, E. 2005. Reproductive biology and feeding of *Curimatella lepidura* (Eigenmann & Eigenmann) (Pisces, Curimatidae) in Juramento reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23(2): 314-322.

Agostinho, A.A.; Miranda, L.E.; Bini, L.M.; Gomes, L.C.; Thomaz, S.M; Suzuki, H.I. 1999. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. Pp 227-266. In: Tundisi, J.G.; Straškraba, M. (Eds.). Theoretical reservoir ecology and its applications. São Carlos: *International Institute of Ecology*, 585.

Azevedo, P. de; Gomes, A.L. 1943. Contribuição ao estudo da biologia da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch,1794). São Paulo: *Boletim de Indústria Animal*, 5(4): 15-64.

Barbieri, G. 1989. Dinâmica da reprodução de *Hoplias malabaricus* (Bloch 1974) (Osteichthyes, Erythrinidae) da Represa do Monjolinho, São Carlos/SP. *Revista Brasileira de Zoologia*, 6: 225-233.

Baroiller, J.F.; Guiguen, Y. 2001. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in gonochoristic fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 91: 177-201.

Beyer, J.; Petersen, K.; 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.

Bloch, 1794. *Ethology*, 111: 881-890.

Brown-Peterson, N.J.; Wyanski, D.M.; Saborido-Rey, F.; Macewicz, B.J.; Lowerre-Barbieri, S.K.A. 2011. standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, 1(3): 52-70.

Caramaschi, E.M.P. 1979. Reprodução e alimentação de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) na Represa do rio Pardo (Botucatu, SP) (Osteichthyes, Cypriniformes, Erythrinidae). São Carlos: Dissertação de Mestrado. Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, 144.

Cazenave, J.; Wunderlin, D.A.; de Los Angeles, B.M.; Amé, M.V.; Krause, E.; Pflugmacher, S.; Wiegand, C. 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation

of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentate* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquatic Toxicology*, 75: 178-190.

Chomczynski, P.; Sacci, N. 1987. Single-step method of total RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159.

Correia, T.G.; Narcizo, A.M.; Bianchini, A.; Moreira, R.G. 2010. Aluminum as na endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology*, 151(4): 461-466.

Cortes, R.; Hughes, S.; Coimbra, A.; Monteiro, S.; Pereira, V.; Lopes, M.; Pereira, S.; Pinto, A.; Sampaio, A.; Santos, C.; Carrola, J.; Jesus, J.; Varanda, S. 2016. A multiple index integrating different levels of organization. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 132: 270-278.

Eustáquio Martins, J.M. 2009. Biologia de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes, Erythrinidae) na Represa de Capim Branco I, Rio Araguari, MG. Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia, Programa de Ecologia e Conservação dos Recursos Naturais, Universidade Federal de Uberlândia, 84.

Fedato, R.P.; Simonato, J.D.; Martinez, C.B.R., Sofia, S.H. 2010. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mutation Research*, 700: 80-85.

Fowler, H.W. 1950. Os peixes de água doce do Brasil. São Paulo: *Arquivo Zoologia*, 6: 362-364.

Godoy, M.P. 1975. Peixes do Brasil. Subordem characoidei. Bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba: *Editora Franciscana*, 4(1): 846.

Goede, R.R.; Barton, B.A. 1990. Organismic indices and an autopsy bases assessment as indicators of health and condition of fish. *American Fisheries Society*, 8: 93-108.

Goksøyr, A. 2006. Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 69: 175-184.

Gomes, A.D.; Tolussi, C.E.; Ribeiro, C.S.; Honji, R.M.; 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.

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*, 51: 1193-1206.

Hassell, K.; Pettigrove, V.; Beresford, N.; Jobling, S.; Kumar, A. 2016. No evidence of exposure to environmental estrogens in two feral fish species sampled from the Yarra River, Australia: a comparison with northern hemisphere studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131: 104-117.

Hued, A.C.; Caruso, M.N.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A. 2006. Field and in vitro evaluation of ammonia toxicity on native fish species of the central region of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76: 984-991.

Hued, A.C.; Nostro, F.L.Lo.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.D.L.A. 2013. Reproductive impairment of a viviparous fish species inhabiting a freshwater system with anthropogenic impact. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64: 281-290.

Instituto Nacional de Meteorologia - INMET, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. *http://www.inmet.gov.br*. Acesso em 10 de outubro de 2018.

Jones, J.C.; Reynolds, J.D. 1997. Effects of pollution on reproductive behaviour of fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 463-491.

Kime, D.E. 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Science of the Total Environment*, 225: 3-11.

Kirschbaum, A.A.; Seriani, R.; Pereira, C.D.S.; Assunção, A.; de Souza Abessa, D.M.; Rotundo, M.M.; Ranzani-Paiva, M.J.T. 2009. Cytogenotoxicity biomarkers in fatsnook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 32: 151-154.

Leão, E.L.M.; Leite, R.G.; Chaves, P.T.C.; Ferraz, E. 1991. Aspectos da reprodução, alimentação e parasitofauna de uma espécie rara de piranha, *Serrasalmus altuvei* (Ramirez, 1965) (Pisces, Serrasalmidae) do Baixo Rio Negro. *Revista Brasileira de Biologia*, 3: 545-553.

Lins, J.A.P.N.; Kirschnik, P.G.; Queiroz, V.S.; Cirio, S.M. 2010. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, 8: 469-484.

Mangeaud, A. 1998. Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de la calidad del agua em la Cuenca del Río Suquía (Córdoba, Argentina). Teses de doutorado, Universidad Nacional de Córdoba, 253.

Marques, D.K.S.; Gurgel, H.C.B.; Lucena, I. 2001. Época de reprodução de Hoplias malabaricus Bloch, 1794 (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências*, 3: 61-67.

Mills, L.J.; Chichester, C. 2005. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment*, 343 (1-3): 1-34.

Moncaut, N.; Lo Nostro, F.; Maggese, M.C. 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17β. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology*, 63: 127-137.

Nascimento, C.R.B.; Souza, M.M.; Martinez, C.B.R. 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C, Toxicology and Pharmacology*, 155: 456-461.

Oliveira, R.D. 1994. Hábitos e comportamento alimentar da traíra, *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae), em alagados de vazante, município de Santo Antônio de Leverger-MT. Monografia. IB, Universidade Federal de Mato Grosso, 26.

Oyakawa, O.T. 2003. Family Erythrinidae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. Jr., (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: *Livraria EdiPUCRS*, 238-240.

Paiva, M.P. 1974. Crescimento, alimentação e reprodução da traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch), no nordeste brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, 32.

Pômpeu, P.; Alves, C.B.M. 2003. Local fish extinction in a small tropical lake in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 1(2): 133-135.

Potts, G.W.; Wootton, R.J. 1984. Fish reproduction: Strategies and Tactics. London: *Academic Press*, 410.

Robinson, C.D.; Brown, E.; Craft, J.; Davies, I.M.; Moffat, C.F.; Pirie, D.; Robertson, F.; Stagg, R.M.; Struthers, S. 2003. Effects of sewage effluent and ethynyl oestradiol up on molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). *Aquatic Toxicology*, 62: 119-34.

Sayer, M.D.J.; Gibson, R.N.; Atkinson, R.J.B. 1995. Growth, diet and condition of goldsinny on the West coast of Scotland. *Journal of Fish Biology,* 46:317-340.

Schulz, R.W.; França, L.R.; Lareyre, J.J.; Legac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nobrega, R. H.; Miura, T. 2010 Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3): 390-411.

Silvano, J.; Oliveira, C.L.C.; Fialho, C.B.; Gurgel, H.C.B., 2003. Reproductive period and fecundity of *Serrapinnus piaba* (Characidae, Cheirodontinae) from the rio Ceará Mirim, Rio Grande do Norte, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 1(1): 61-66.

Simonato, J.D.; Fernandes, M.N.; Martinez, C.B.R. 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology*, 20: 1400-1410.

Tan, B.L.; Hawker, D.W.; Müller, J.F.; Leusch, F.D.; Tremblay, L.A.; Chapman, H.F. 2007. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected waste water treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environment International*, 33: 654-669.

Tolussi, C.E. 2016. Influência antrópica do ambiente aquático sobre os processos fisiológicos associados à maturação oocitária em peixes teleósteos. Tese de doutorado. Programa de Fisiologia Geral, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 87.

Uieda, V.S. 1984. Ocorrência e Distribuição dos Peixes em um Riacho de Água doce. São Carlos: *Revista Brasileira de Biologia*, 44 (2): 203-213.

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 water borne 4-tert octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupt testis morphology in the South American fresh water fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology and Pharmacology* ,50: 298-306.

Vazzoler, A.E.A. de M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: *Eduem - Editora da Universidade Estadual de Maringá e SBI - Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 169.

Vazzoler, A.E.A. de M; Menezes, N.A. 1992. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). *Revista Brasileira de Biologia*, 52(4): 627-640.

Vested, A.; Giwercman, A.; Bonde, J.P.; Toft, G. 2014. Persistent organic pollutants and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, 16: 71-80.

Vetillard, A.; Bailhache, T. 2006. Effects of 4-n-nonylphenol and tamoxifen on salmon receptor and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicology Sciences*, 92: 523-544.

Vieira, V.A.R.O.; Correia, T.G.; Moreira, R.G. 2013. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 157: 1-8.

Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.A.; Clamp, M.; Barton, G.J. 2009. "Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench" *Bioinformatics*, 25(9): 1189-1191.

Wootton, R.J. 1989. Reproduction. In: Wooton, R.J. (Ed.), Ecology of Teleosts Fishes. New York: *Chapman and Hall*, 404.

Zar, J. H. 1999. Biostatistical analysis. Upper Saddle River, NJ: *Prentice-Hall*, 663.

Apêndice 1 – Parâmetros morfométricos e ponderais nos machos adultos de *H. malabaricus* nos reservatórios Ponte Nova, Guarapiranga (Embu-guaçu e Barragem) e Billings (Bororé e Taquacetuba), durante as estações de inverno e verão (média ± EPM).

Ambientes	Estação	n	*H. malabaricus*			
			Massa corpórea (g)	Comprimento total (cm)	IGS (%)	IHS (%)
Ponte Nova	Inverno	2	351,61 ± 11,39	32,00 ± 0,00	0,13 ± 0,05	0,82 ± 0,01
Bororé (Billings)		9	587,22 ± 28,10	36,44 ± 0,74	0,24 ± 0,03*	1,45 ± 0,11*
Taquacetuba (Billings)		6	523,33 ± 25,28	35,57 ± 0,68	0,13 ± 0,02*	1,03 ± 0,08
Barragem (Guarapiranga)		7	706,43 ± 90,82	36,43 ± 1,25	0,15 ± 0,01	1,13 ± 0,09
Embu-Guaçu (Guarapiranga)		10	534,50 ± 20,13	34,10 ± 0,56	0,18 ± 0,01	0,91 ± 0,06*
Ponte Nova	Verão	3	470,00 ± 20,82	34,83 ± 0,93	0,10 ± 0,01	0,59 ± 0,24
Bororé (Billings)		7	630,03 ± 46,07	37,54 ± 0,90	0,18 ± 0,02	1,09 ± 0,18
Taquacetuba (Billings)		3	580,00 ± 12,58	36,27 ± 0,65	0,13 ± 0,02	0,85 ± 0,23
Barragem (Guarapiranga)		7	814,29 ± 129,47	37,67 ± 1,56	0,20 ± 0,02	0,93 ± 0,07
Embu-Guaçu (Guarapiranga)		5	633,00 ± 85,92	34,10 ± 1,33	0,20 ± 0,03	0,98 ± 0,09

*Símbolos representam diferenças estatísticas entre os ambientes na mesma estação do ano ($p < 0,05$).

IGS: Índice gonadossomático; IHS: Índice hepatossomático.

1. Discussão geral

Um dos principais aspectos que refletem a ajustes de uma espécie às condições impostas pelo ambiente é o processo reprodutivo (Marques *et al*., 2001). Segundo Vazzoler (1996), informações acerca do processo reprodutivo são importantes, pois o sucesso obtido por qualquer espécie é determinado pela capacidade de seus integrantes reproduzirem em ambientes variáveis, mantendo populações viáveis. Nos reservatórios, o processo de eutrofização tem resultado em desequilíbrios ecológicos com efeitos negativos para a biota, além da intensa degradação da qualidade da água (Moschini-Carlos *et al*., 2010). Atualmente, os reservatórios localizados em diferentes regiões metropolitanas do mundo estão submetidos a inúmeras pressões antrópicas (Tundisi e Matsumura-Tundisi, 2008). No presente estudo, a fisiologia reprodutiva de machos de *A. fasciatus* e *H. malabaricus* foi estudada utilizando-se biomarcadores relacionados à maturação gonadal, para avaliar os efeitos da diminuição da qualidade da água da Billings e Guarapiranga, neste processo. Deste modo, biomarcadores moleculares, tais como expressão gênica da gonadotropina hipofisária *fshb* assim como a glicolipofosfoproteína *vtgA*, ambos relacionados ao processo de maturação gonadal, assim como a concentração plasmática de esteroides gonadais (E_2, T e 11-KT) e a morfologia gonadal geraram respostas diferentes, sugerindo que os peixes apresentam habilidades regulatórias, mesmo em condições ambientais adversas.

Em princípio, foi confirmado que os reservatórios estudados apresentaram graus de trofia e qualidade da água diferente, devido principalmente às concentrações de nutrientes, que foram mais elevadas no verão. Dessa forma, foi possível estabelecer um gradiente de eutrofização. Poucas variáveis físicas e químicas excederam os valores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº357 (Brasil, 2005) no reservatório PN, e segundo Marceniuk e Hilsdorf, (2010), PN reúne áreas de mananciais sob proteção ambiental com regiões parcialmente preservadas. Assim mesmo, foram encontrados altos valores de compostos nitrogenados, além de fósforo total, que juntamente com os valores de clorofila-*a* na Bil e Gua, confirmam o intenso processo de eutrofização artificial, consequência do excessivo despejo de esgoto nos reservatórios, que tem resultado em

aumento das concentrações desses compostos na água (Carpenter, 2005; CETESB, 2015, SEADE, 2015).

Em base aos resultados da qualidade da água dos reservatórios, se interpretaram os resultados dos biomarcadores moleculares analisados. Desta maneira, destacar que no reservatório de Ponte Nova, considerado como referência, os biomarcadores analisados não diferiram entre as duas estações do ano, o que pode ser considerado mais uma evidência de que estes animais mantêm atividade reprodutiva nas duas estações. Nos dois reservatórios de coleta da Billings (ponto Bororé e Taquacetuba) e Guarapiranga (ponto Embu-guaçu) os níveis dos transcritos de *fshb* foram mais elevados no verão nas duas espécies, período em que ocorreu intensa espermatogênese (Schulz *et al*., 2010). O aumento da transcrição *fshb* também foi relacionada à intensa espermatogênese em outras espécies de teleósteos com desova parcelada, como na congênere *Astyanax altiparanae* (Characiformes) (Jesus *et al*., 2017), *Odonthestes bonariesis* (Atheriniformes) (Elisio *et al*., 2015), *Dicentrarchus labrax* (Perciformes) (Mateos *et al*., 2003) e *Hippoglossus hippoglossus* (Pleuronectifomres) (Weltzein *et al*., 2003).

As gonadotropinas, LH e FSH, são os mais importantes hormônios hipofisários que regulam a fisiologia testicular. Os níveis plasmáticos de LH são baixos ou indetectáveis durante o desenvolvimento dos testículos aumentando apenas no momento da desova. Os níveis de FSH, por outro lado, mostram um aumentam em associação com a proliferação espermatogonial, em seguida, aumentam com a espermiação, e diminuem antes da época de desova (Schulz *et al*., 2010). Paralelamente ao aumento dos níveis de *fshb*, também observamos que machos de *A. fasciatus* e *H. malabaricus* apresentaram níveis elevados de T e 11-KT também no verão, mas apenas nos pontos nos pontos da Billings. Nos machos, o FSH é responsável, via células de Sertoli, pela proliferação espermatogonial que representa a primeira fase da espermatogênese. O FSH ativa receptores presentes nas células de Leydig (principal célula esteroidogênica dos testículos) estimulando a síntese e secreção de andrógenos (Ohta *et al*., 2007; García-Lopes *et al*., 2009).

No presente estudo, a atividade do eixo hipotálamo hipófise gônadas de machos de *A. fasciatus* capturados em no ambiente natural foi analisada por meio do perfil de expressão gênica do hormônio hipofisário FSH devido a sua maior possibilidade de ser quantificado nas estações de coleta, em relação ao LH, em conjunto com os níveis de esteroides sexuais, os quais foram determinados durante a estação de verão e inverno, de março de 2017 a julho-agosto de 2017.

Nossos dados mostram que o aumento da expressão de *fshb* nos animais coletados no verão na Billings e na Guarapiranga estão acompanhados de um aumento da concentração plasmática de T e 11-KT, como já demonstrado em outras espécies de peixes (Amer *et al*., 2001; Campbell *et al*., 2003; Miura *et al*., 1999; Ohta *et al*., 2007), mas o experimento realizado não permite (e não foi objetivo deste trabalho) estabelecer uma relação entre a expressão desta gonadotropina e os níveis plasmáticos destes andrógenos.

As variações na concentração de andrógenos plasmáticos e expressão de *fshb* em *A. fasciatus* e *H. malabaricus* ocorreram principalmente no verão, período no qual a espermatogênese está ativa. Adicionalmente, estas variações foram mais evidentes nos pontos de coleta do reservatório Billings, classificado como hipereutrófico no verão de 2017 e eutrófico no verão de 2018. É importante destacar ainda que os níveis plasmáticos de 11-KT em *A. fasciatus* e *H. malabaricus* apresentaram valores absolutos mais elevados (sem a realização de análise estatística entre estas variáveis) que a T para ambas as espécies, sugerindo-se que, assim como na maioria dos telésoteos estudados (Schulz *et al*., 2010), nestes caracídeo a 11-KT seria o principal andrógeno relacionado à função testicular. Os andrógenos são eficazes durante todo o processo da espermatogênese, como multiplicação espermatogonial e formação de espermatocistos (*guppy*) ou maturação (*killifish*) (Nagahama, 1994 e Borg, 1994), podendo também participar no início da puberdade (Cavaco *et al*., 1998). Além disso, os andrógenos induzem à espermiação em algumas espécies, mas são menos eficazes do que os progestágenos nesta função (Ueda *et al*., 1985).

A expressão gênica da *vtg-A* biomarcador da exposição a contaminantes de ação estrogênica mostrou alterações em machos em estações distintas. Os EDCs podem agir em diferentes vias que envolvem muitos processos fisiológicos, como reprodução, mimetizando os hormônios estrogênicos (Vázquez *et al*., 2009), androgênicos (Sone *et al*., 2005), afetando a diferenciação sexual (Baroiller e Guiguen, 2001), desenvolvimento gonadal (Vested *et al*., 2014) e induzindo a síntese de vitelogenina em machos (Moncaut *et al*., 2003; Vetillard e Bailhache, 2006). Os dados apresentados neste estudo sugerem a presença de compostos de ação estrogênica e que poderiam estar desencadeando esta resposta nas duas espécies, principalmente na Billings (ponto Bororé), haja vista que os níveis de E_2 nos animais coletados neste reservatório são mais altos no inverno em relação ao verão. Uma análise conjunta dos dados de *vtg-A* com a concentração plasmática de E_2

mostram que este estrógeno se eleva no plasma dos animais da Billings no inverno para a traira, fato que não ocorre na Ponte Nova. Tolussi *et al*. (2018) estudando *A. fasciatus* no reservatório Billings mostraram uma relação entre a presença de EDCs e a expressão de *vtgA*. Embora os machos pareçam ajustar seu ciclo reprodutivo aos diferentes ambientes da Billings, as evidências de expressão gênica de *vtgA* e altos níveis de E_2 durante o inverno sugerem a presença de xenobióticos, atuando como estrogênios neste reservatório que podem estar interferindo nos processos reprodutivos de *A. fasciatus* e *H. malabaricus*. A presença destes EDCs também pode explicar a concentração mais elevada de andrógenos nos animais coletados na Billings no verão em relação ao inverno, e em relação aos animais amostrados na Ponte Nova para ambas as espécies. Em teleósteos do sexo masculino, a concentração plasmática de E_2 é baixa (Miura *et al*. 1999; Amer *et al*. 2001; Chaves-Pozo *et al*., 2007) e este esteroide tem um papel importante na proliferação mitótica das espermatogônias (Schulz *et al*., 2010), sendo previsível encontrar níveis mais elevados no inverno. No entanto esse padrão não é observado na Ponte Nova.

Com base no exposto, o presente trabalho utilizou biomarcadores que demonstram a presença de EDC em diferentes pontos destes reservatórios, para mais especificamente, avaliar a presença de agentes estrogênicos, como inicialmente sugerido por Tolussi *et al*. (2018). As seguintes hipóteses foram testadas e respondidas:

1) Machos adultos, com diferentes estratégias reprodutivas apresentam respostas de desregulação endócrina relacionadas ao processo reprodutivo nos reservatórios poluídos: esta hipótese foi confirmada utilizando-se os biomarcadores de efeitos biológicos, como a concentração de esteroides, expressão de *fshb*, índices corporais e morfologia gonadal.
2) As respostas de desregulação endócrina, avaliadas pelos biomarcadores são mais evidentes no inverno, pela expressão da VTG-A. No entanto, em todos os reservatórios analisados (inclusive PN), os animais apresentavam espermatozoides nos testículos nas duas estações do ano.

Deve – se enfatizar, que essa expressão da VTG-A, pode demostrar a presença de compostos estrogênicos, mas também podem ser compostos que son classificados em geral como desreguladores endócrinos.

No entanto, as alterações no perfil plasmático dos esteroides gonadais sugerem duas situações distintas, a presença de compostos androgênicos e estrógenos no ambiente e /ou a alteração da concentração destes esteroides para que possibilitar a reprodução em condições adversas. Estudos anteriores realizados nestes mesmos locais com *A. fasciatus* mostraram maior concentração de E_2, expressão gênica de *vtgA* nos machos e alterações na fecundidade relativa das fêmeas provenientes do ponto Taquacetuba (Tolussi *et al.*, 2018), além de aumento na concentração de E_2 e 11-KT em fêmeas de *H. malabaricus* (Gomes *et al.*, 2015). Deste modo, podemos sugerir que T, 11-KT, E_2 vêm sendo considerados bons biomarcadores para evidenciar a presença de EDCs no reservatório Billings, considerando a diferença encontrada em relação aos animais coletados no reservatório de Ponte Nova.

2. Conclusões e considerações finais

Em resposta ao objetivo proposto, conclui-se que o presente estudo confirmou que o uso de diferentes biomarcadores em vários níveis de organização permitiu descrever alterações nos processos fisiológicos envolvidos na reprodução de machos de *A. fasciatus* e *H. malabaricus*, e sugerir a presença e os efeitos dos EDCs nos ambientes poluídos, sendo o verão a estação com maior alteração de biomarcadores, apesar de, nas duas espécies, a atividade reprodutiva ter sido observada no verão e no inverno.

Os reservatórios Billings e Guarapiranga, apresentam vários compostos que estão acima da especificação da resolução CONAMA/357 em algumas estações, mas este fato parece não estar prejudicando os processos fisiológicos associados à maturação testicular de *A. fasciatus* e *H. malabaricus*, pois os resultados histomorfológicos não demonstram danos no processo de maturação testicular. No entanto, é necessário ressaltar que as condições ambientais encontradas na Billings e Guarapiranga, ao longo das diferentes estações estudadas, alteraram alguns biomarcadores relacionados ao processo de síntese de vitelogenina. Esta informação pode ser muito importante para auxiliar a evitar possíveis problemas futuros com estas espécies e/ou outras, presentes nos reservatórios, além de permitir o entendimento dos mecanismos adotados por espécies plásticas que garantem a sua sobrevivência em um ambiente poluído.

As condições encontradas na água dos reservatórios Billings e Guarapiranga, interferiram em biomarcadores de efeitos biológicos (concentração plasmática de T, 11-kt e E_2,) em *A. fasciatus* e *H. malabaricus*, e no reservatório de Ponte Nova, considerado como referência, os biomarcadores analisados não diferiram entre as duas estações do ano, o que pode ser considerada mais uma evidência de que estes animais mantêm atividade reprodutiva ao longo das duas estações. Além disso, a presença de biomarcadores de exposição (expressão gênica de *vtgA* em machos) sustenta a hipótese de que o elevado grau de eutrofização nos reservatórios Billings e Guarapiranga desencadeia respostas estrogênicas em machos de *H. malabaricus* e que estas repostas diferem ao longo das estações do ano. Adicionalmente, as respostas foram mais acentuadas no Billings, em ambas as espécies, podendo sinalizar que os EDCs presentes neste corpo de água estão interferindo na atividade estrogênica em *A. fasciatus* e *H. malabaricus*. Portanto, sugerimos que mesmo vivendo em ambientes com alto grau de eutrofização, machos de *A. fasciatus* e *H. malabaricus* reproduzem mediante uma plasticidade na regulação endócrina da reprodução. Cabe mencionar, que é impossível avaliar todas as variáveis presentes no ambiente natural, no entanto, estudos desta natureza permitem conhecer melhor o ambiente e assim planejar ensaios em laboratório e também em campo, que podem contribuir para o melhor entendimento dos ajustes dos animais frente às condições do ambiente.

Sugere-se uma implementação de programas de monitoramento de EDCs para evitar os efeitos prejudiciais em longo prazo nas populações de peixes nativos que habitam os reservatórios de Billings e Guarapiranga. Também estudos adicionais de campo e experimentais para investigar a origem e mecanismos das alterações produzidas pelos poluentes que possam gerar desregulação endócrina em *A. fasciatus* e *H. malabaricus*, e assim compreender melhor as respostas aos poluentes. Desta maneira, será possível fornecer evidências sólidas para a implantação de regulamentos que visem à atenuação ou à prevenção de risco nos reservatórios.

Referências Bibliográficas

Amer, M.A.; Miura, T.; Miura, C.; Yamauchi, K. 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biology of* Reproduction, 65: 1057-1066.

Baroiller, J.F.; Guiguen, Y. 2001. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in gonochoristic fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 91: 177-201.

Borg, B. 1994. Androgens in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Phisiology*, 109: 219-245.

Brasil. Resolução CONAMA nº 357, de 17 março de 2005. Poder Executivo, Brasília (DF). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 58-63.

Campbell, B.; Dickey, J. T.; Swanson, P. 2003. Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biology of Reproduction*, 69: 2109-2117.

Carpenter, S.R. 2005. Eutrophication of aquatic ecosystems: stability and soil phosphorus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(29):10002-10005.

Cavaco, J.E.B.; Vilrokx, C.; Trudeau, V.L.; Schulz, R.W.; Goos, H.J.T. 1998. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *The American Journal of Physiology*, 44: 1793-1802.

CETESB.2015. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório 2014: Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. São Paulo: *Companhia Ambiental do Estado de São Paulo*.

Chaves-Pozo, E.; Liarte, S.; Vargas-Chacoff, L.; García-López, A.; Mulero, V.; Mesequer, J.; Mancera, J. M.; García-Ayala, A. 2007. 17ß-estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) males. *Biology of Reproduction*, 76: 142-148.

Elisio, M.; Chalde, T.; Miranda, L. A. 2015. Seasonal changes and endocrine regulation of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) spermatogenesis in the wild. *General and Comparative Endocrinology*, 221: 236-243.

García-López, A.; Bogerd, J.; Granneman, J. C.; Van Dijk, W.; Trant, J. M.; Taranger, G. L.; Schulz, R. W. 2009. Leydig cells express FSH receptors in African catfish. *Endocrinology*, 150: 357-365.

Gomes, A.D.; Tolussi, C.E.; Ribeiro, C.S.; Honji, R.M.; 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.

Jesus, L.W.H.; Bogerd, J.; Vieceli, F.M.; Branco, G.S.; Camargo, M.P.; Cassel, M.; Moreira, R.G.;Yan, C.Y.I.; Borella, M.I. 2017. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: Molecular characterization, spatiotemporal expression and their possiblerole on female reproductive dysfunction in captivity. *General and Comparative Endocrinology*, 246: 150-163.

Marceniuk, A.P.; Hilsdorf, A.W.S. 2010. Peixes das cabeceiras do rio Tietê e Parque das Neblinas. 1. ed. Bauru, SP, *Editora Canal 6*, 157.

Marques, D.K.S.; Gurgel, H.C.B.; Lucena, I. 2001. Época de reprodução de *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências*, 3: 61-67.

Mateos, J.; Mañanós, E.; Martínez-Rodríguez, G.; Carrillo, M.; Querat, B.; Zanuy, S. 2003. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (alpha, FSHbeta, and LHbeta) and their expression during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 133: 216-232.

Miura, T.; Miura, C.; Ohta, T.; Nader, M. R.; Todo, T.; Yamauchi, K. 1999. Estradiol-17bstimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 144: 5504-5510.

Moncaut, N.; Lo Nostro, F.; Maggese, M.C. 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17β. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology*, 63: 127-137.

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. Taubaté: *Ambi-água - Revista Ambiente and Água: An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 5(3): 47-59.

Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology*, 38: 217–229.

Ohta, T.; Miyake, H.; Miura, C.; Kamei, H.; Aida, K.; Miura, T. 2007. Follicle stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese Eel (*Anguilla japonica*). *Biology of Reproduction*, 77: 970-977.

SEADE, 2015. Portal de Estadísticas do Estado de São Paulo, Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados. Available from http://produtos.seade.gov.br/produtos/msp/index.php?ti*P* = met4&opt=s&tema=SNE&subtema=2. Acesso em 10 de fevereiro de 2019.

Schulz, R.W.; França, L.R.; Lareyre, J.J.; Legac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nobrega, R. H.; Miura, T. 2010 Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3): 390-411.

Sone, K.; Hinago, M.; Itamoto, M.; Katsu, Y.; Watanabe, H.; Urushitani, H.; Tooi, O.; Guillette, L.J.; Jr-Iguchi, T. 2005. Effects of an androgenic growth promoter 17beta-trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). *General and Comparative Endocrinology*, 143(2):151-160.

Tolussi, C.E.; Gomes, A.D.O.; Kumar, A.; Ribeiro, C.S.; Lo Nostro, F.L.; Bain, P.A.; de Souza, G.B.; Cuña, R.D.; Honji, R.M.; Moreira, R.G. 2018. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 926-934.

Tundisi, J.G; Matsumura-Tundisi, T. 2008. Limnologia. São Paulo: *Oficina de Textos Editora*, 632.

Ueda, H.; Kambegawa, A.; Nagahama, Y. 1985. Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), and goldfish (*Carassius auratus*). *General and Comparative Endocrinology*, 59: 24-30.

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 water borne 4-

tert octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupt testis morphology in the South American fresh water fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 50: 298-306.

Vazzoler, A.E.A. de M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: *Eduem - Editora da Universidade Estadual de Maringá e SBI - Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 169.

Vested, A.; Giwercman, A.; Bonde, J.P.; Toft, G. 2014. Persistent organic pollutants and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, 16: 71-80.

Vetillard, A.; Bailhache, T. 2006. Effects of 4-n-nonylphenol and tamoxifen on salmon receptor and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicology Sciences*, 92: 523-544.

Weltzein, F.A.; Kobayashi, T.; Andersson, E.; Norberg, B.; Andersen, Ø. 2003. Molecular characterization and expression of FSHb, LHb, and common asubunit in males Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *General and Comparative Endocrinology*, 131: 87-96.