

PAULA SUZANNA PRADO

**Avaliação da atividade reprodutiva e de
biomarcadores de impacto ambiental no lambari
Astyanax fasciatus do reservatório de Furnas,
Rio Grande, Minas Gerais**

Orientadora: Dra. Elizete Rizzo

Co-orientador: Dr. Nilo Bazzoli

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - UFMG

BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS

FEVEREIRO DE 2010

PAULA SUZANNA PRADO

Avaliação da atividade reprodutiva e de biomarcadores de impacto ambiental no lambari *Astyanax fasciatus* do reservatório de Furnas, Rio Grande, Minas Gerais

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências na área de concentração de Biologia Celular.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - UFMG

BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS

FEVEREIRO DE 2010

**Avaliação da atividade reprodutiva e de
biomarcadores de impacto ambiental no lambari
Astyanax fasciatus do reservatório de Furnas,
Rio Grande, Minas Gerais**

Dissertação apresentada em 8 de fevereiro de 2010

Resultado:

Banca Examinadora:

Nilo Bazzoli

Cleida Aparecida de Oliveira

Gleydes Gambogi Parreira

Esta dissertação foi realizada no laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia ICB, UFMG em parceria com os laboratórios de química da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Furnas e Laboratório de Imunologia e Farmacologia de venenos e toxinas do Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB, UFMG, sob a orientação da Professora Dra. Elizete Rizzo e co-orientação do professor Dr. Nilo Bazzoli e com o suporte financeiro das seguintes instituições:

- Furnas Centrais Elétricas S.A.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. (FAPEMIG).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades concedidas durante toda minha vida;

Aos professores, orientadores e amigos, Dra Elizete Rizzo e Dr. Nilo Bazzoli;

A meus pais Reinaldo e Ana Paula e meus irmãos Bruno e Pradinho, que apesar da distância, sempre me apoiaram incondicionalmente;

Ao meu namorado e grande amigo Pedro, por estar ao meu lado todos os dias, pelo seu amor e sua amizade;

A todos meus familiares, especialmente meus padrinhos e avós Zélia e Nilton pelo incentivo e apoio aos meus estudos;

A Furnas Centrais Elétricas S.A., especialmente Sr. Dirceu Marzulo Ribeiro, pelo apoio financeiro e técnico e pela confiança;

A COPASA (Companhia de Saneamento de Minas Gerais), SAAE – Boa Esperança (Serviço autônomo de água e esgoto), UEMG – Passos (Universidade Estadual de Minas Gerais), EHPF (Estação de Hidrobiologia e piscicultura de Furnas) e no Laboratório de Imunologia e Farmacologia de venenos e toxinas do Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG pela parceria.

Aos funcionários da EHPF, especialmente Tiba, Marcos Evangelista, Toninho, Joaquim e Paulo por me auxiliarem nas coletas;

A todo pessoal do laboratório de Ictiohistologia, Mônica, Ralph, Fabrício, Roberto, Violeta, Flávia, Fábio, Cássia, Alexandre e Arthur por toda a ajuda e companheirismo;

A todos os estagiários do laboratório que me auxiliaram na dissecação dos peixes;

Aos colegas do curso de Pós-graduação, que de algum modo participaram de forma positiva desse projeto, especialmente meus grandes amigos Anna e Diogo.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| LISTA DE TABELAS | iii |
| LISTA DE FIGURAS | iv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. O LAMBARI <i>A. fasciatus</i> COMO MODELO DE ESTUDO..... | 5 |
| 1.2. ÁREA DE ESTUDO..... | 6 |
| 1.3. EFEITOS DE POLUENTES SOBRE A ICTIOFAUNA..... | 7 |
| 1.4. BIOMARCADORES DE IMPACTO AMBIENTAL..... | 8 |
| 2. OBJETIVO GERAL | 10 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 10 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 11 |
| 3.1. ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM DE PEIXES..... | 11 |
| 3.2. PARÂMETROS DA ÁGUA..... | 11 |
| 3.3. INDICADORES DE SAÚDE E REPRODUTIVOS..... | 11 |
| 3.4. RELAÇÃO PESO-COMPIMENTO..... | 12 |
| 3.5. MATURAÇÃO GONADAL E MORFOMETRIA..... | 12 |
| 3.6. EXPRESSÃO DE <i>Zrp</i> | 12 |
| 3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 13 |
| 4. RESULTADOS | 14 |
| 4.1. QUALIDADE DA ÁGUA..... | 14 |
| 4.2. INDICADORES DE SAÚDE DOS PEIXES..... | 14 |
| 4.3. RELAÇÃO PESO-COMPIMENTO..... | 17 |
| 4.4. MATURAÇÃO GONADAL E IGS..... | 18 |
| 4.5. MORFOMETRIA..... | 23 |
| 4.6. PROPORÇÃO SEXUAL E INTERSEXO..... | 23 |
| 4.7. <i>Zrp</i> WESTERN BLOT..... | 27 |
| 5. DISCUSSÃO | 28 |
| 6. PERSPECTIVAS DE ESTUDO | 33 |
| 7. CONCLUSÕES | 34 |
| 8. BIBLIOGRAFIA | 35 |

RESUMO

A fim de avaliar a poluição aquática por despejos domésticos, industriais e da agricultura no reservatório de Furnas, Rio Grande, peixes foram coletados em cinco pontos de amostragem em 2006 e 2007. Vários biomarcadores reprodutivos e de saúde, desde o nível molecular até o populacional, foram avaliados no caracídeo nativo *Astyanax fasciatus* e relacionados com a poluição ambiental. Os peixes capturados no ponto referência (Turvo) apresentaram os melhores parâmetros de saúde e reprodução, enquanto vários efeitos adversos foram detectados nos locais contaminados. Comparado com o ponto de referência, o índice hepatossomático foi significativamente maior em todos os locais impactados. Nos pontos Barranco Alto e Fama, os espécimes apresentaram crescimento corporal reduzido, retardo da maturação gonadal e menor índice gonadossomático que foram associados à poluição por agrotóxicos e as descargas de esgotos não tratados. Os peixes provenientes dos pontos Boa Esperança e Guapé exibiram feminilização, intersexo e sinais de comprometimento da maturação final ovocitária e desova, evidências da contaminação por xenoestrógenos. A expressão das proteínas zona radiata foi detectado em peixes machos dos pontos Fama, Boa Esperança e Guapé. Em conclusão, a avaliação de indicadores de saúde e biomarcadores reprodutivos em *A. fasciatus* forneceram evidências da contaminação por desreguladores endócrinos e indicam a necessidade de medidas de acompanhamento e reabilitação das áreas poluídas ao longo do reservatório de Furnas, a fim de preservar sua ictiofauna nativa.

Palavras-chave: *Astyanax fasciatus*, reservatório de Furnas, poluição, reprodução, intersexo, proteína da zona radiata.

ABSTRACT

In order to assess the aquatic pollution by domestic, industrial and agriculture wastes in the Furnas Reservoir, Grande River, fish catchings were conducted at five sampling sites during 2006 and 2007. A range of health and reproductive biomarkers from molecular to population levels were evaluated in feral characid *Astyanax fasciatus* and related to environmental pollution. Fish from the reference site (Turvo) exhibited the best health and reproductive status, while several adverse effects were detected at the contaminated sites. Compared to the reference site, the hepatosomatic index was significantly higher in all impacted sites. At the Barranco Alto and Fama sites, fish showed reduced body growth, delayed gonadal maturation and a lower gonadosomatic index which were associated to pollution by agrottoxics and untreated sewage discharges. Fish from the Boa Esperança and Guapé sites presented feminisation, intersex and signs of impairment of final oocyte maturation and spawning, evidence of contamination by xenoestrogen. The expression of zona radiata proteins was detected in male fish from Fama, Boa Esperança and Guapé, strongly suggesting xenoestrogen contamination. In conclusion, the assessment of health indicators and reproductive biomarkers in *A. fasciatus* provides evidence of the integrated effects of a wide-ranging of environmental contaminants and indicates a need for monitoring and rehabilitation measures of the polluted areas along the Furnas Reservoir in order to preserve its native ictiofauna.

Keywords: *Astyanax fasciatus*, Furnas Reservoir, pollution, reproduction, intersex, zona radiata proteins.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Parâmetros da água (média \pm DP) em cinco pontos de amostragem do reservatório de Furnas em 2006 e 2007.....15
- Tabela 2:** Parâmetros reprodutivos, indicadores de saúde e proporção sexual em *A. fasciatus* capturados cinco pontos de amostragem do reservatório de Furnas em 2006 e 2007.....16
- Tabela 3:** Frequências (%) e diâmetro médio de folículos vitelogênicos, número de cistos espermatogênicos por área e diâmetro dos túbulos seminíferos em exemplares de *A. fasciatus* capturados na estação reprodutiva em cinco pontos de amostragem do reservatório de Furnas, em 2006 e 2007.....26

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Paradigma das avaliações ecológicas..... | 2 |
| Figura 2: Eixo hipotálamo-pituitária-gonada-figado em fêmeas de teleósteos..... | 3 |
| Figura 3: Síntese de vitelogenina e proteínas da zona radiata nos hepatócitos..... | 5 |
| Figura 4: <i>Astyanax fasciatus</i> | 6 |
| Figura 5: Mapa do reservatório de Furnas, mostrando a localização dos pontos de amostragem: ponto de referência, Turvo (T) e os pontos impactados: Barranco Alto (BA); Fama (F); Boa Esperança (BE), Guapé (G)..... | 7 |
| Figura 6: Relação peso-comprimento para a amostragem total de <i>Astyanax fasciatus</i> capturados no reservatório de Furnas, em 2006 e 2007..... | 17 |
| Figura 7: Maturação ovariana em <i>Astyanax fasciatus</i> . A- Repouso, barra 72,4 µm; B- Maturação avançada, barra 193 µm; C- Parcialmente desovado, barra 198,51 µm; D- Totalmente desovado, barra 193 µm; E, F- Região micropilar no pólo animal, barra 77,5 µm (E) e 20,66 µm (F). O1 e O2 – ovócitos perinucleolares inicial e avançado; O4 – ovócito vitelogênico; FPO – folículo pós-ovulatório; FA – folículo atrésico; setas – região micropilar..... | 19 |
| Figura 8: Maturação testicular em <i>Astyanax fasciatus</i> . A- Corte transversal do terço médio do testículo mostrando as regiões espermatogênica (a) e não espermatogênica (b), barra 369,22 µm; B- Detalhe das duas regiões do testículo, barra 184,00; C- Maturação inicial, barra 54,37 µm; E- Maturação avançada, barra 136,71 µm; F- Parcialmente espermiado, barra 84,1 µm; G- Totalmente espermiado, 77,5 µm; D- Túbulo seminífero com as diferentes fases da espermatogênese, barra 34,72 µm; H- Região caudal não espermatogênica, barra 32,37 µm. Encarte- Detalhe do epitélio prismático, barra 89,02 µm..... | 20 |

Figura 9: Freqüências relativas (%) dos estádios de maturação gonadal de fêmeas (A) e machos (B) de *Astyanax fasciatus* capturados em 2006 e 2007 em cinco pontos de amostragem: Turvo (T); Barranco Alto (BA); Fama (F); Boa Esperança (BE), Guapé (G). Estádios de maturação gonadal: 1 = repouso, 2 = maturação inicial, 3 = maturação avançada/maduro, 4A = parcialmente desovada/espermiado, 4B = totalmente desovada/espermiado.....21

Figura 10: Distribuição sazonal dos índice gonadossomático (IGS) por período de amostragem para fêmeas (A) e machos (B) de *Astyanax fasciatus* capturados em cinco pontos de amostragem: Turvo (T); Barranco Alto (BA); Fama (F) ; Boa Esperança (BE), Guapé (G) no reservatório de Furnas em 2006 e 2007.....22

Figura 11: Intersexo em *Astyanax fasciatus*. A- Gônada em intersexo com região testicular (RT) e ovariana (RO) e distribuição focal dos ovócitos, barra 176,92 μm ; B- Distribuição multifocal dos ovócitos no tecido testicular, barra 72,37 μm ; C- Gônada em intersexo mostrando ovócitos em todas as fases de desenvolvimento, barra 217,12 μm ; D- Detalhe da presença de espermatozoides e secreção no interstício (I) entre os grupos de ovócitos, barra 33,06 μm ; E- Túbulo seminífero contendo células da linhagem espermatogênica (SP) e espermatozoides (Z) na gônada intersexo, região micopilar (seta), barra 14,88 μm . O1/O2: ovócitos previtelogênicos; O4: ovócito vitelogênico.....25

Figura 12: *Immunoblotting* para proteínas zona radiata (Zrp) no fígado de *Astyanax fasciatus* capturados no reservatório de Furnas. (Std) padrão de peso molecular; (Linha 1) fêmeas do site de referência; (linha 2-6) amostras de machos do site de referência, Turvo (T); Barranco Alto (BA); Fama (F); Boa Esperança (BE) e Guapé (G). Zrp subunidades (α , ~ 70 kDa; β , ~ 50 kDa; γ ~ 35 kDa) foram marcadas com anticorpo primário de coelho policlonal anti-salmão Zrp (Biosense) (1:1000). Anticorpo secundário anti-coelho peroxidase-HRP (Sigma) (1:2500).....27

1. INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia ambiental tem despertado interesse recente da comunidade científica com um grande número de estudos e avanços científicos em ecossistemas temperados, como os Estados Unidos, Canadá e Inglaterra. Os ecossistemas tropicais de regiões alagadas, de águas doces e marinhas apesar de possuírem mais de 75% da biodiversidade mundial (Lecher & Goldstein, 1997), têm sido negligenciados, deixando uma lacuna no conhecimento ecotoxicológico (Kwok et al., 2007). Poucos estudos têm utilizado espécies nativas bioindicadoras e biomarcadores fisiológicos adequados para avaliar os efeitos da contaminação aquática sobre a ictiofauna, especialmente na América do Sul (Bertin et al., 2009). No Brasil, principalmente na região Sul e Sudeste, trabalhos de avaliação ecotoxicológica foram realizados em pequenos rios e córregos como rio Camanducaia (Alberto et al., 2005), rio dos Sinos (Schulz & Martins-Júnior, 2001) e rio Paraíba do Sul (Linde-Arias et al., 2008), mas nenhum estudo foi conduzido no reservatório de Furnas, em particular sobre a função reprodutiva dos peixes. Estudos de campo comparando áreas impactadas e não impactadas permitem uma avaliação das condições de saúde dos peixes em seu ambiente natural e são componentes importantes para avaliação e compreensão dos efeitos biológicos e/ou ecológicos de agentes químicos sob condições naturais e fornecem ferramentas informativas e práticas para monitoramento ambiental (Winkaler et al., 2001).

No meio científico, é cada vez mais reconhecido que a avaliação dos impactos dos distúrbios ambientais sobre os organismos exige a compreensão dos efeitos em toda a hierarquia da organização biológica, partindo dos níveis moleculares e celulares até as comunidades e ecossistemas (Figura 1) (Denslow & Sepúlveda, 2007; Ankley et al 2009). Peixes são bons bioindicadores de impacto ambiental, pois apresentam alterações fisiológicas, patológicas e estruturais em vários sistemas orgânicos que provocam mudanças comportamentais nas comunidades nativas refletindo as condições de saúde do ecossistema aquático (Wootton, 1990). Atualmente, biomarcadores fisiológicos e histopatológicos de peixes são extensivamente utilizados para documentar e quantificar os efeitos de poluentes em ambientes aquáticos tais como atresia folicular, proteínas de choque térmico, apoptose, metalotioneínas, vitelogenina em machos além de alterações histopatológicas em órgãos alvos. Entretanto, para que os biomarcadores possam ser usados como ferramentas de avaliação ecotoxicológica é necessário compreender a

relação entre os processos moleculares e bioquímicos e seus reflexos na morfofisiologia de órgãos alvo, nos indivíduos e na população (Ankley et al 2009). Neste contexto, estudos mais recentes relacionam biomarcadores de relevância mecanística como níveis plasmáticos de vitelogenina (Vtg) e proteína da zona radiata (Zrp) com parâmetros de relevância ecológica como desenvolvimento gonadal, fecundidade, qualidade de ovos, diferenciação e proporção sexual, taxa de crescimento, entre outros (Ankley et al., 2008; Hinck et al., 2008; Gúzman et al., 2008; Xu et al., 2008). Esses estudos integrados fornecem embasamento para a extrapolação eficaz dos efeitos biológicos através de diferentes espécies e níveis de organização biológica, além de identificar as respostas sensíveis e as espécies prioritárias para testes extensivos, otimizando o tempo e a utilização de recursos (Ankley et al, 2009).

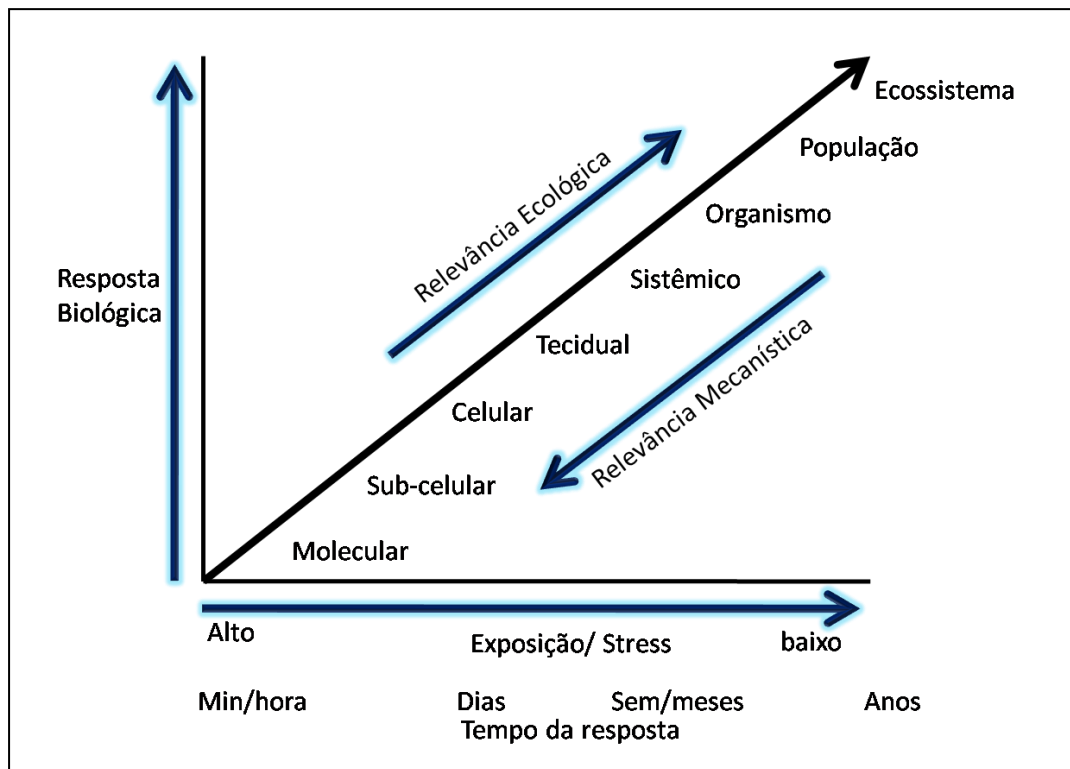


Figura 1: Paradigma das avaliações ecológicas (adaptado de Denslow & Sepúlveda, 2007).

Em geral, a atividade reprodutiva dos vertebrados é estrutural e funcionalmente similar, abrangendo o eixo evolutivamente conservado hipotálamo-pituitário-gonadal. Em todos os vertebrados a secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo estimula a pituitária a secretar os hormônios gonadotróficos (GtH) que induzem a síntese de hormônios esteróides nas gônadas (Figura 2). Porém, os peixes

apresentam alguns aspectos particulares da fisiologia reprodutiva como a secreção de GnRH controlada por fatores ambientais tais como temperatura, fotoperíodo e índices de pluviosidade (Dawson, 1998). Vários GtHs foram identificados em extratos cerebrais de teleósteos, os dois principais GtHs (GtHI e GtHII) são secretados pela hipófise e estruturalmente similares aos hormônios folículo estimulante (FHS) e luteinizante (LH) respectivamente. O GtHI (FSH) está envolvido na vitelogênese e na formação da zona pelúcida, enquanto o GtHII (LH), atua na maturação final e na ovulação. A secreção de GtH é regulada pelos hormônios 17β -estradiol e testosterona por um mecanismo de *feedback* negativo. O estrógeno é o principal hormônio sexual em fêmeas de teleósteos, mas nos ovários são também produzidas grandes quantidades de testosterona, que é sintetizada nas células tecais e subsequentemente transformada em estrógeno pela P450 aromatase (CYP19) nas células da granulosa (Denslow & Sepúlveda, 2007).

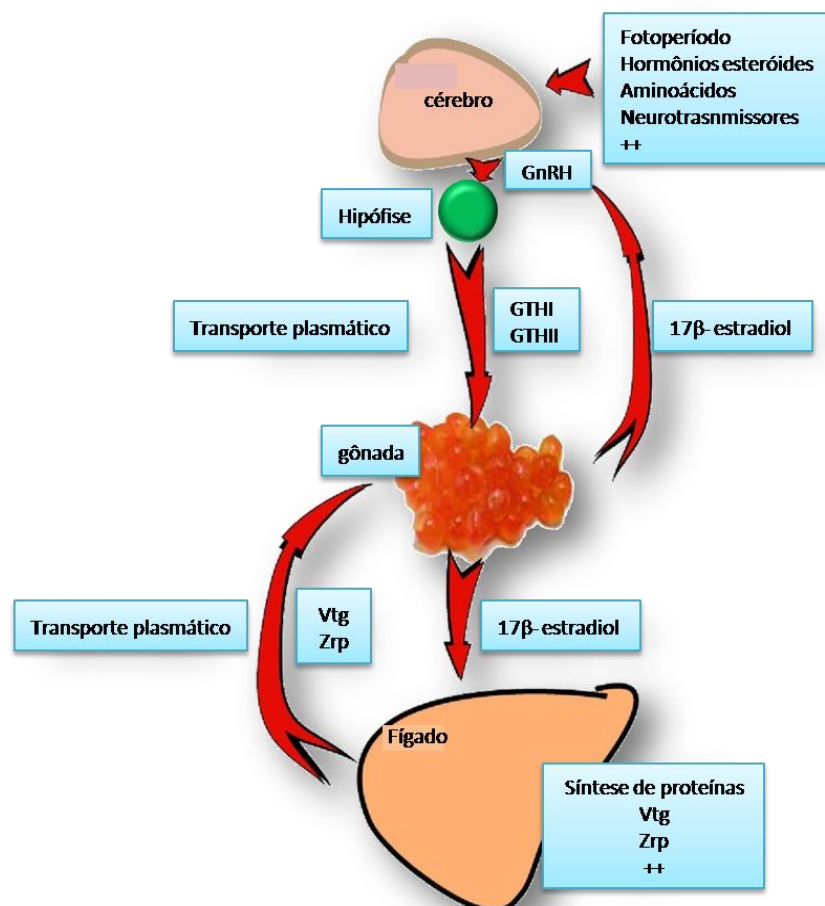


Figura 2: Eixo hipotálamo-pituitária-gonada-fígado em fêmeas de teleósteos (adaptado de Arukwe & Goksøyr, 2003).

O estrógeno estimula a produção de Vtg e Zrp no fígado de fêmeas de teleósteos (Figura 3). A Vtg, precursor das proteínas do vitelo é uma fosfoglicolipoproteína de ligação ao cálcio, com grande peso molecular (250-600kDa) e complexidade, e que apresenta um cerne protéico curto com 1.600-1.800 aminoácidos (Silversand & Haux, 1995). A Vtg, produzida pelos hepatócitos, é secretada na circulação sistêmica e transportada até os ovários, onde é seletivamente seqüestrada por endocitose mediada por receptor pelas células de folículos ovarianos em crescimento. Na membrana plasmática dos ovócitos a Vtg liga-se a receptores para LDL agrupados em vesículas cobertas por clatrina que se fundem com vesículas lisossomais derivadas do complexo de Golgi formando corpos multivesiculares no citoplasma do ovócito (Arukwe & Goksøyr, 2003). As vesículas lisossomais contêm catepsina D, que processa a vitelogenina nas proteínas do vitelo que posteriormente serão utilizadas como nutrientes para o desenvolvimento de embriões e larvas (Denslow & Sepúlveda, 2007). Estudos recentes demonstraram que a Vtg possui atividades hemaglutinante e antibacteriana no protocordado anfioxo *Branchiostoma belcheri* e em teleósteos como *Conchoniis puntius* (Li et al, 2008).

A expressão das proteínas do envelope ovocitário (Zrp) precede a da Vtg e estas apresentam maior resistência à degradação proteolítica devido a sua função estrutural (Arukwe & Goksøyr, 2003). Em mamíferos eutérios e peixes a zona radiata é composta por 3-4 glicoproteínas evolutivamente conservadas denominadas ZP 1, ZP2 e ZP3 (α , β , e γ) com massa molecular de cerca de 200, 120 e 80 kDa. Na maioria das espécies de teleósteos a zonagênese começa com o crescimento ovocitário durante o estágio previtelogênico e termina na fase vitelogênica (Arukwe & Goksøyr, 2003). A zona radiata tem papel importante durante a fertilização, atuando na ligação e atração do espermatozóide e impedindo a polispermia além de proteger o embrião contra distúrbios mecânicos durante seu desenvolvimento (Yamagami et al., 1992).

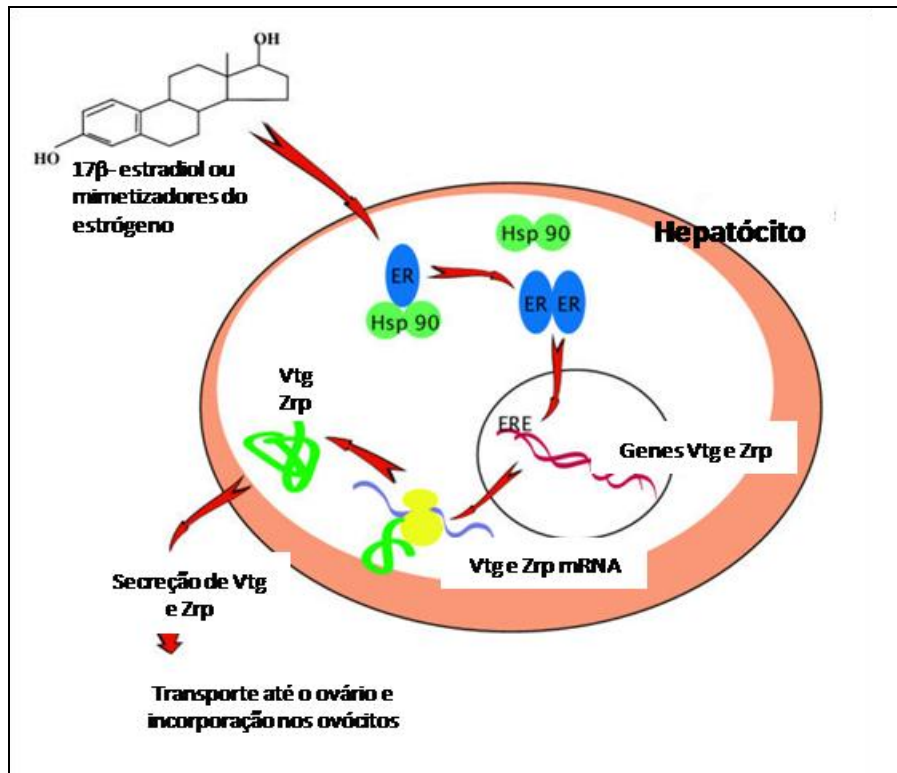


Figura 3: Síntese de vitelogenina e proteínas da zona radiada nos hepatócitos (Arukwe & Goksøyr, 2003).

1.1. O LAMBARI *Astyanax fasciatus* COMO MODELO DE ESTUDO

O gênero *Astyanax* Baird & Girard 1854 é um dos mais ricos em espécies e de distribuição geográfica mais ampla e diversa de suas populações. A espécie de pequeno porte *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), (Figura 4) conhecida como lambari ou piaba do rabo vermelho, figura entre as espécies mais abundantes do reservatório de Furnas com o maior rendimento de pesca anual (<http://www.ibama.gov.br>), tem importância ecológica servindo como forrageiro para as espécies piscívoras e adapta-se bem ao ambiente lântico criado pelo barramento de rios (Schulz & Martins-Júnior, 2001). Estudos prévios mostraram que *A. fasciatus* reproduz-se no reservatório de Furnas, apresenta desova parcelada e período reprodutivo prolongado (Carvalho, 2009; Prado & Rizzo, 2005; Prado, 2007). O uso de espécies nativas como sentinela permite avaliar os impactos biológicos da poluição e os mecanismos responsáveis pelas alterações nos biomarcadores, especialmente, quando a análise química da água é integrada com uma variedade de biomarcadores subcelulares. Recentemente, *A. fasciatus* tem sido apontado como um potencial bioindicador de poluição antropogênica devido as suas estratégias

reprodutivas, distribuição geográfica, hábito alimentar e tolerância à degradação ambiental (Schulz & Martins-Júnior, 2001; Carrasco-Letelier et al., 2006; Prado, 2007).



Figura 4: *Astyanax fasciatus*

1.2. ÁREA DE ESTUDO

O reservatório da Usina Hidrelétrica de Furnas (Figura 5), Rio Grande, Bacia do Alto Paraná, o maior da região Sudeste do Brasil, com 220 km de extensão máxima, 1.440 km² de área inundada e volume total de 22,95 bilhões de m³ de água (<http://www.furnas.com.br>). Essa água é utilizada para consumo humano, irrigação, atividades balneárias e os peixes são uma das principais fontes de proteína animal para uma população de mais de 1.120.000 residentes (Tanure, 2003). Desde sua construção em meados dos anos 60, o lago de Furnas vem sofrendo ações antrópicas que causam alterações nas características físicas, químicas e biológicas de suas águas. Pelo déficit de infra-estrutura em saneamento nos municípios marginais, o lançamento de efluentes *in natura* é a principal via de contaminação do reservatório de Furnas. Todo esgoto produzido nos municípios da região, com carga poluidora total de 2.317.358,04 kg de sólidos totais/dia, deságua no lago, através de ribeirões e rios e em poucas cidades e distritos da região o esgoto é parcialmente tratado (Tanure, 2003). Em trechos do reservatório com alto nível de contaminação, as taxas de fenóis e o número de coliformes fecais indicativos de contaminação por despejos de esgoto doméstico e industrial são extremamente elevados quando comparados com os limites estabelecidos na legislação ambiental (IGAM, 2007). A poluição aquática do reservatório é em grande parte resultado das atividades desenvolvidas nas suas áreas marginais, sendo especialmente preocupantes os dejetos *in natura* das cidades de Varginha, Boa Esperança e Guapé, a contaminação geral por agrotóxicos principalmente da região de Alfenas e o uso da água para atividades balneárias em Fama e Escarpas do Lago. Estes poluentes têm causado redução rápida e generalizada da qualidade da água do reservatório de Furnas (Tanure, 2003).

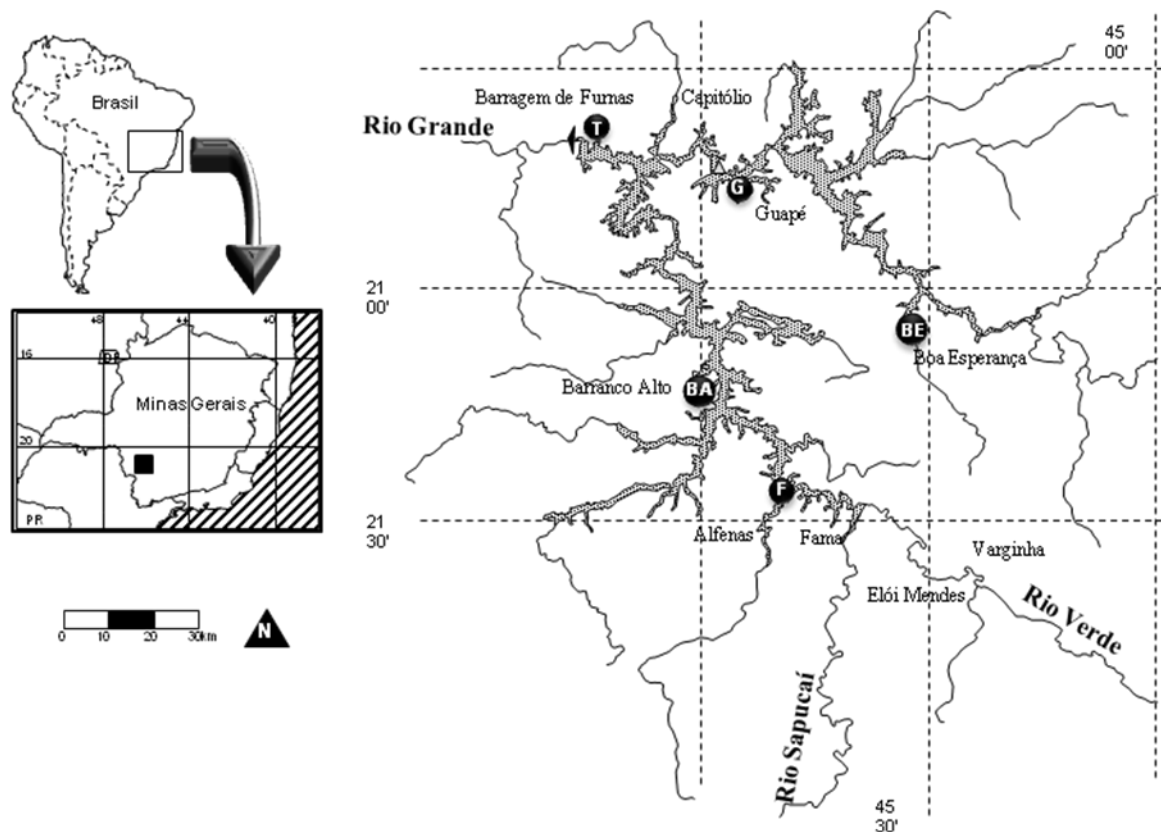


Figura 5: Mapa do reservatório de Furnas, mostrando a localização dos pontos de amostragem: ponto de referência, Turvo (T) e os pontos impactados: Barranco Alto (BA); Fama (F); Boa Esperança (BE), Guapé (G).

1.3. EFEITOS DE POLUENTES SOBRE A ICTIOFAUNA

O uso indiscriminado e inadequado de pesticidas na agricultura tem resultado em sérios problemas ecológicos. Pesticidas organoclorados e organofosforados merecem atenção especial por serem persistentes, ou seja, de difícil degradação, acumulando-se nos tecidos de peixes e outros organismos aquáticos e apresentando alta toxicidade para esses organismos. Peixes como *A. fasciatus*, que não estão em níveis tróficos superiores, podem atingir altos níveis de contaminação por absorverem nutrientes que possuem grandes cargas de poluentes associados à vegetação ou à sedimentos depositados no fundo dos rio ou reservatório (Matsushita & Souza, 1994). Diversos trabalhos analisando a exposição de peixes a inseticidas organoclorados observaram que as substâncias tóxicas afetam os peixes de diversas maneiras como inibição de metabolismo de lipídio (Singh & Singh, 2006), da esteroidogênese (Singh e Singh, 2008) e podem levar à falhas reprodutivas (Ebrahimi et al, 1995).

Numerosos compostos químicos poluentes contidos nos resíduos de esgoto e da agricultura possuem capacidade de interferir no sistema endócrino dos animais sendo assim denominados desreguladores endócrinos (EDCs) (Vos et al, 2000). Os EDCs exercem seus efeitos pela mimetização de hormônios endógenos, como antagonista e/ou agonistas de hormônios naturais, alterando o padrão normal de síntese ou metabolização de hormônios ou modificando os níveis de receptores hormonais (Sonnenchein & Soto, 1998). Os EDCs são biodisponíveis para os peixes através de uma variedade de rotas, incluindo respiração, osmoregulação, contato dermal, ingestão de alimentos contaminados e até transferência materna através das reservas lipídicas dos ovos (Van Der Kraack et al., 2001). Estrógenos de contraceptivos orais, 17 β -estradiol e estrona, provenientes dos dejetos humanos, surgem como os principais contribuintes para a capacidade de desregulação endócrina de efluentes de esgotos municipais e constituem um grave problema ecológico permanente. Apesar disso, o impacto de desregulação endócrina de efluentes de esgoto tem sido raramente investigado na América do Sul (Bertin et al, 2009). Organismos aquáticos, principalmente vertebrados inferiores tais como peixes, são os principais alvos para os EDCs (Kime, 1998; Kloas et al, 2009) Em um grande número de espécies de peixes, particularmente teleósteos, os EDCs podem alterar o desenvolvimento sexual e a fertilidade (Jobling e Tyler, 2006; Denslow & Sepúlveda, 2007; Ankley et al. 2008; Guzman et al., 2008). No entanto, somente poucos estudos têm demonstrado conseqüências a nível populacional como resultado da exposição a EDCs (Mills & Chichester, 2005; Kloas et al, 2009). A feminilização de populações de peixes têm sido observada em espécies nativas da Europa (Hecker et al., 2002; Minier et al., 2000; Kipfer et al, 2009), EUA (Folmar et al., 2001) e Inglaterra (Jobling et al. , 2002; Lye et al., 1997), em trabalhos experimentais e de campo. Além desses fenômenos, crescimento reduzido e atrasos no desenvolvimento têm sido reportados por vários autores como efeitos da contaminação por EDCs (Orlando et al, 2007). No entanto, relativamente poucos estudos foram realizados com espécies de peixes neotropicais, resultando em uma lacuna de informação científica.

1.4. BIOMARCADORES DE IMPACTO AMBIENTAL

A exposição a contaminantes estrogênicos pode induzir alterações na expressão de proteínas tais como proteínas da zona radiata (Zrp) e vitelogenina (Vtg), os quais são utilizados como biomarcadores para detecção de exposição de peixes aos EDCs através

de técnicas como imunohistoquímica, western blot e ELISA (Denslow & Sepúlveda, 2007).

A diferenciação gonadal e reprodução são as duas janelas da maior sensibilidade dos peixes para EDCs durante desenvolvimento sexual (Ankley et al, 2009). As fases mais sensíveis são os primeiros estágios de vida passando pela diferenciação dos tecidos dependentes de hormônios sexuais. Neste período, os peixes são suscetíveis à administração de esteróides sexuais exógenos causando reversão sexual e resultando em mudanças irreversíveis na diferenciação dos tecidos (intersexo), alterando a proporção sexual e o potencial reprodutivo da prole.

Em adultos, os efeitos da exposição podem ser reversíveis permanecendo apenas durante o período de exposição. Para avaliar os impactos da exposição aos EDC's em adultos os biomarcadores chave são a indução da Vtg e Zrp em machos (Kime et al. 1999; Folmar et al, 2001). A Vtg e as Zrp são normalmente encontradas no sangue de fêmeas, enquanto nos machos os níveis plasmáticos são muito baixos ou inexistentes. Porém, a síntese e secreção dessas proteínas pode ser induzida em peixes machos expostos a estrógenos exógenos (Kime et al. 1999), sendo consideradas biomarcadores sensíveis da exposição a EDCs em estudos experimentais e de campo. A adição de etinil-estradiol a um lago experimental no Canadá aumentou 9.000 vezes os níveis de vitelogenina em machos nativos de *fathead minnow* (*Pimephales promelas*), resultando em declínio populacional (Palace et al., 2002). Usando exemplares juvenis do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) expostos a diferentes doses de nonifenol, Meucci & Arukwe (2005) observaram elevados níveis plasmáticos de Vtg e Zrp após duas semanas de tratamento.

2. OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos da contaminação aquática do reservatório de Furnas sobre a saúde e o sucesso reprodutivo de peixes nativos, utilizando biomarcadores populacionais, sistêmicos, teciduais, e moleculares na espécie sentinela *A. fasciatus*, fornecendo embasamento científico para metodologias de monitoramento ambiental para rios e lagos sul americanos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os principais parâmetros físico-químicos, transparência e resíduos sólidos na água nos diferentes pontos de amostragem;
- Comparar comprimento e peso corporal, relação peso-comprimento, proporção sexual e índices biológicos de exemplares capturados nos diferentes pontos de amostragem;
- Analisar histologicamente a maturação gonadal e determinar as frequências dos estádios do ciclo reprodutivo nos trechos de coleta;
- Quantificar a atividade reprodutiva de fêmeas e machos maduros no pico da estação reprodutiva através de morfometria;
- Detectar a presença de *Zrp* no fígado de peixes machos, através do Western blot;
- Comparar estatisticamente os resultados obtidos nos pontos impactados com ponto de referencia, com pouca interferência antropogênica

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM DE PEIXES

Os peixes foram coletados trimestralmente, no reservatório de Furnas, Rio Grande (Figura 5) durante 2006 e 2007, seguindo os princípios éticos para a manipulação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os peixes foram capturados com redes de emalhar com malhas de 3-4 cm entre nós opostas expostas por 14 h na superfície da água nas margens do reservatório. Um total de 1.265 espécimes adultos de *A. fasciatus*, compreendendo 899 fêmeas e 366 machos, foram amostrados em cinco pontos: Turvo (T), ponto de referência localizado perto da barragem de Furnas, com pouca interferência antrópica; Barranco Alto (BA), ponto que recebe os resíduos da agricultura; Fama (F), que recebe esgoto sem tratamento doméstico e industrial das cidades do entorno dos rios Verde e Sapucaí, e Boa Esperança (BE) e Guapé (G), pontos que recebem todo o esgoto doméstico não tratado proveniente de suas áreas urbanas.

3.2. PARÂMETROS DA ÁGUA

Durante a captura dos peixes, temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido e condutividade foram obtidos em cada local de amostragem utilizando o instrumento multi-parâmetro modelo YSI 650 MDS. A transparência da água foi avaliada através da profundidade do disco de Secchi. Resíduos sólidos suspensos foram determinados a partir de amostras de água (1 L por ponto de coleta) pelo Laboratório de Hidrobiologia de Furnas.

3.3. INDICADORES DE SAÚDE E REPRODUTIVOS

No campo, amostras de gônadas e fígado foram obtidas para análises microscópicas e, em seguida, os espécimes foram fixados em formol 10% para as análises biométricas e dos índices biológicos. Em laboratório, de cada exemplar foram medidos comprimento total (CT) e peso corporal (PC) e, em seguida, os peixes foram dissecados, para obtenção dos pesos das gônadas (PG), fígado (PF) e gordura celômica (GC). Os seguintes índices biológicos foram calculados: gonadossomático ($IGS = 100 PG/PC$), hepatossomático ($IHS = 100 PF/PC$), gordura celomática ($IGC = 100 GC/PC$) e fator de condição de Fulton ($K = 100 PC/CT^3$).

3.4. RELAÇÃO PESO-COMPIMENTO

A relação entre o comprimento total (CT) e o peso corporal (PC) foi calculada usando a equação $PC = aCT^b$, onde a é o intercepto e b a inclinação da linha de regressão. Os parâmetros a e b foram estimados por análise de regressão linear dos dados logarítmicos e comparados entre os pontos de amostragem. O grau de associação entre as variáveis CT e PC foi avaliada utilizando o coeficiente de correlação (r^2) para a amostragem total.

3.5. MATURAÇÃO GONADAL E MORFOMETRIA

Para a histologia, amostras de gônadas de todos os exemplares capturados foram fixadas em líquido de Bouin por 8-12 h, incluídas em parafina, seccionadas com 5 μ m de espessura e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Os seguintes estádios de maturação gonadal foram estabelecidos para machos e fêmeas com base na distribuição e nas características morfológicas das células germinativas: 1 = repouso, 2 = maturação inicial, 3 = maturação avançada/maduro, 4A = parcialmente desovado/espermiado, 4B = totalmente desovado/espermiado (Carvalho et al, 2009). A proporção sexual (fêmea: macho) e a frequência (%) de exemplares intersexo foram avaliados após diagnóstico histológico. Para as análises morfométricas da maturação gonadal, a proporção (%) de folículos perinucleolares (FP), folículos vitelogênicos (FV) e folículos vitelogênicos atrésicos (FA) foi determinada em cortes histológicos de ovários nos estádios 3 e 4A de peixes capturados na estação reprodutiva ($n = 183$). O diâmetro médio dos folículos vitelogênicos também foi determinado em fêmeas maduras ($n = 10$ /ponto), perfazendo um total de 400 folículos medidos por ponto de amostragem. Nos machos, o diâmetro médio dos túbulos seminíferos e número de cistos espermatogênicos por área foi determinado em machos 3 e 4A ($n = 10$ /ponto), perfazendo um total de 150 túbulos medidos e 150 campos analisados por ponto de amostragem.

3.6. EXPRESSÃO DE Zrp

Amostras de fígado de 5 fêmeas e 5 machos do ponto referência e de 5 machos de cada ponto impactado foram congeladas em campo em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C para processamento por Western Blot. O *pool* de amostras de cada local foram homogeneizadas em tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 com aprotinina 0,02% e fluoreto fenilmetilsulfonil 1 mM), utilizando homogeneizador Potter

S (Braun, Melsungen, Alemanha) em banho de gelo. Em seguida, os extratos foram sonicados (3 X 10 amplitude 30%) no processador GEX ultrasonic 600 e centrifugado a 15.000 g por 60 min a 4°C. Após a remoção do *pellet*, o sobrenadante foi alíquotado e armazenado a -80°C para determinação da proteína total solúvel (Lowry et al., 1951) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Alíquotas contendo 100 µg de proteína total foram retiradas de cada uma das amostras e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7,5% em uma mini-cuba de eletroforese (BioRad, Hercules, Califórnia, USA) como descrito por Laemmli (1970). Após eletroforese, as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de transferência Amersham Hybond ECL (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, USA), bloqueadas com caseína a 2% e incubadas com anticorpo primário de coelho anti-Zrp de salmão (1:1000, Biosense AS., Noruega) por 1 h. Após a lavagem com PBS, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho (1:2500, Sigma, St. Louis, Missouri) conjugado com peroxidase por 2 h, lavadas novamente, e as bandas foram reveladas usando o 4-cloro-1-naftol e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St. Louis).

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad InStat e BioEstat. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparar os parâmetros da água e o fator de condição de Fulton. As frequências dos estádios de maturação gonadal foram avaliadas por ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Dunnett ($p < 0,05$). Os índices biológicos foram comparados entre os pontos usando teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn ($p < 0,05$). A relação peso-comprimento e os parâmetros a e b foram analisados por análise de Covariância (ANCOVA), utilizando-se CT como co-variável. O teste do qui-quadrado (χ^2) foi realizado para detectar o desvio de 1 : 1 na proporção sexual.

4. RESULTADOS

4.1. QUALIDADE DA ÁGUA

Temperatura (19 - 33°C), pH (6,0 - 8,5) e oxigênio dissolvido (4 - 11mg/L) não foram significativamente diferentes entre os pontos de amostragem (Tabela 1). Temperaturas mínimas variando de 18,9 a 21,0°C foram detectadas em Julho e temperaturas máximas que variaram de 26,9 a 32,7°C ocorreram em Janeiro. No mesmo período de amostragem, nenhum dos parâmetros da água apresentou valores discrepantes entre os pontos. A condutividade da água e os resíduos sólidos foram significativamente maiores no ponto BE ($p < 0,001$) em comparação com os demais pontos. A profundidade média do disco de Secchi foi maior no ponto referência, Turvo (T), quando comparada aos pontos impactados ($p < 0,01$). Devido à elevada contaminação e à baixa profundidade da água, a profundidade do disco de Secchi não foi amostrada no ponto Boa Esperança (BE).

4.2. INDICADORES BIOLÓGICOS DOS PEIXES

Para fêmeas, os maiores valores de comprimento total e peso corporal foram registrados no ponto referência, Turvo (CT = $13,86 \pm 1,73$ cm; PC = $34,60 \pm 13,28$ g) em comparação com os pontos impactados ($p < 0,001$) (Tabela 2). Os machos foram também maiores e mais pesados em T (CT = $13,14 \pm 1,82$ cm; PC = $27,74 \pm 11,46$ g) com diferenças significativas em relação aos pontos Barranco Alto e Fama. Em Boa esperança, os peixes apresentaram CT menor do que o ponto referencia T, mas não houve diferença significativa para PC. Não houve diferença significativa entre machos de Guapé e Turvo.

Tabela 1.

Parâmetros da água (média \pm DP) em cinco pontos de amostragem do reservatório de Furnas em 2006 e 2007.

| | Turvo | Barranco Alto | Fama | Boa Esperança | Guapé |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Coordenadas geográficas | 20°40' S 46°13' W | 21°11' S 45°58' W | 21°24' S 45°50' W | 21°04' S 45°33' W | 20°45' S 45°55' W |
| Temperatura (°C) | 24,27 \pm 2,48 ^a | 24,84 \pm 3,70 ^a | 24,85 \pm 4,28 ^a | 25,47 \pm 3,35 ^a | 24,93 \pm 2,74 ^a |
| pH | 7,49 \pm 0,60 ^a | 7,57 \pm 0,87 ^a | 7,47 \pm 0,93 ^a | 7,83 \pm 0,67 ^a | 7,44 \pm 0,70 ^a |
| Oxigênio dissolvido (mg/L) | 7,14 \pm 1,04 ^a | 6,80 \pm 1,33 ^a | 7,11 \pm 1,69 ^a | 7,21 \pm 1,85 ^a | 6,41 \pm 0,99 ^a |
| Condutividade (μ S/cm) | 38,10 \pm 3,74 ^a | 40,00 \pm 5,29 ^a | 39,28 \pm 4,42 ^a | 62,14 \pm 15,42 ^b | 36,43 \pm 3,04 ^a |
| Profundidade do disco de Secchi (m) | 4,07 \pm 0,81 ^a | 1,86 \pm 0,76 ^b | 2,08 \pm 1,33 ^b | - | 2,40 \pm 0,58 ^b |
| Sólidos totais suspensos (mg/L) | 0,92 \pm 0,59 ^a | 2,85 \pm 2,87 ^a | 3,35 \pm 1,97 ^a | 8,17 \pm 1,91 ^b | 1,97 \pm 0,33 ^a |
| Sólidos voláteis (mg/L) | 0,50 \pm 0,83 ^a | 1,55 \pm 1,06 ^a | 1,82 \pm 0,91 ^a | 5,70 \pm 1,62 ^b | 0,82 \pm 0,40 ^a |
| Sólidos fixos (mg/L) | 0,42 \pm 0,35 ^a | 1,30 \pm 1,30 ^a | 1,53 \pm 1,01 ^a | 2,47 \pm 0,46 ^b | 1,15 \pm 0,33 ^a |

Em uma linha, letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos de amostragem, $p < 0,05$.

Tabela 2.

Parâmetros reprodutivos, indicadores de saúde e proporção sexual em *A. fasciatus* capturados cinco pontos de amostragem do reservatório de Furnas em 2006 e 2007.

| | | Turvo | Barranco Alto | Fama | Boa Esperança | Guapé |
|--------------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Fêmeas | N | 223 | 110 | 185 | 136 | 245 |
| | CT (cm) | 13,86 ± 1,73 ^a | 11,66 ± 1,50 ^b | 11,96 ± 1,77 ^b | 12,92 ± 1,00 ^c | 13,14 ± 1,56 ^c |
| | PC (g) | 34,60 ± 13,28 ^a | 20,39 ± 9,38 ^b | 22,27 ± 10,43 ^b | 29,17 ± 8,80 ^c | 29,83 ± 11,46 ^c |
| | IGS | 6,74 ± 5,70 ^a | 4,45 ± 4,84 ^b | 4,43 ± 6,08 ^b | 7,36 ± 5,43 ^a | 7,03 ± 6,25 ^a |
| | IHS | 0,53 ± 0,21 ^a | 1,00 ± 0,67 ^b | 0,87 ± 0,38 ^b | 0,94 ± 1,05 ^{bc} | 0,71 ± 0,25 ^c |
| | IGC | 0,66 ± 0,99 ^a | 0,55 ± 0,87 ^a | 0,76 ± 0,91 ^{ac} | 1,81 ± 2,32 ^b | 0,93 ± 1,37 ^{ac} |
| | K | 1,24 ± 0,15 ^a | 1,21 ± 0,20 ^a | 1,22 ± 0,18 ^a | 1,32 ± 0,18 ^b | 1,25 ± 0,19 ^a |
| Machos | N | 100 | 83 | 101 | 43 | 39 |
| | CT (cm) | 13,14 ± 1,82 ^a | 10,71 ± 0,94 ^b | 10,42 ± 1,00 ^b | 11,55 ± 0,90 ^c | 12,05 ± 1,25 ^{ac} |
| | PC (g) | 27,74 ± 11,46 ^a | 15,65 ± 5,08 ^b | 13,33 ± 4,87 ^c | 19,43 ± 5,59 ^a | 21,46 ± 8,08 ^a |
| | IGS | 1,11 ± 1,18 ^a | 1,55 ± 0,90 ^b | 0,89 ± 0,73 ^a | 2,49 ± 1,27 ^c | 1,58 ± 1,11 ^b |
| | IHS | 0,46 ± 0,17 ^a | 0,88 ± 0,36 ^b | 0,83 ± 0,36 ^{bc} | 0,65 ± 0,24 ^c | 0,60 ± 0,21 ^{ac} |
| | IGC | 1,80 ± 1,26 ^a | 1,36 ± 1,31 ^{ab} | 1,07 ± 0,95 ^b | 2,12 ± 1,87 ^a | 1,59 ± 1,77 ^{ab} |
| | K | 1,18 ± 0,15 ^a | 1,25 ± 0,16 ^b | 1,14 ± 0,16 ^a | 1,23 ± 0,17 ^{ab} | 1,18 ± 0,22 ^{ab} |
| Proporção sexual (F : M) | 2,23 : 1 [*] | 1,32 : 1 | 1,83 : 1 [*] | 3,16 : 1 [*] | 6,28 : 1 [*] | |

Os valores representam média ± DP. Em uma linha, letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos de amostragem, $p < 0,05$. Na proporção sexual, os asteriscos indicam diferença significativa da proporção esperada de 1:1, $p < 0,05$. (CT) comprimento total; (PC) peso corporal; (IGS) índice gonadossomático; (IHS) índice hepatossomático; (IGC) índice de gordura celômica; (K) fator de condição de Fulton.

Comparando-se os índices biológicos, a média do IHS foi maior em todos os pontos impactados do que o ponto referência (T) (Tabela 2). O IGC foi maior nas fêmeas do ponto BE ($IGC = 1,81 \pm 2,32$, $p < 0,001$) e menor nos machos de F ($IGC = 1,07 \pm 0,95$, $p < 0,05$) em comparação com o ponto referência. Na mesma avaliação, o fator de condição de Fulton (K) foi maior em fêmeas de BE ($K = 1,32 \pm 0,18$, $p < 0,001$) e em machos de BA ($K = 1,25 \pm 0,16$, $p < 0,05$).

4.3. RELAÇÃO PESO-COMPIMENTO

A relação peso-comprimento mostrou crescimento isométrico para os peixes de todos os pontos de amostragem com coeficientes de regressão linear em torno de 3 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa para os coeficientes a e b da regressão linear entre machos e fêmeas e entre os pontos de amostragem. Então, a relação peso-comprimento foi estimada para a amostra total com coeficiente de correlação (r^2) de 0,91 (Figura 6).

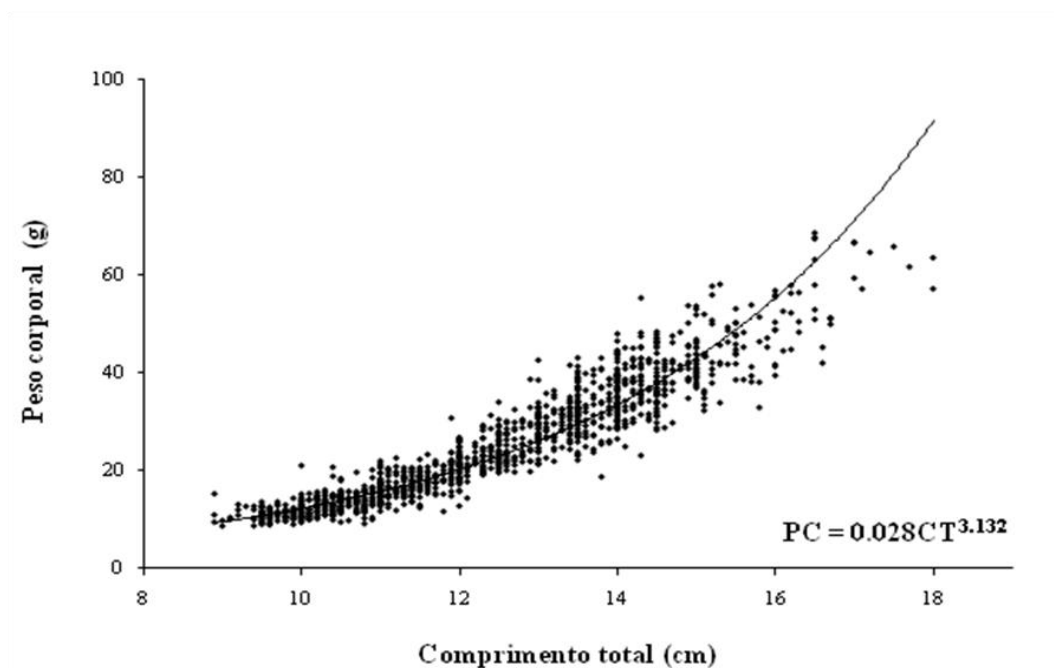


Figura 6: Relação peso-comprimento para a amostragem total de *Astyanax fasciatus* capturados no reservatório de Furnas, em 2006 e 2007.

4.4. MATURAÇÃO GONADAL E IGS

A análise histológica da maturação gonadal (Figuras 7 e 8) mostrou que todos os peixes coletados eram adultos, exemplares imaturos e juvenis não foram capturados. A distribuição das frequências (%) dos estádios de maturação gonadal mostrou fêmeas e machos em estádios 2/3 e 4A predominando em todos os pontos de amostragem, exceto em F que apresentou um número significativamente maior ($p < 0,05$) de fêmeas no estágio de repouso (Figura 9A). Machos em repouso foram menos frequentes, exceto em F, e eles não ocorrem em BE e G (Figura 9B).

Comparando-se os IGS médio dos dois anos amostrados (Tabela 2), observou-se, nas fêmeas, valores significativamente menores em BA e em F do que no ponto referência e outros pontos impactados ($p < 0,01$). Os machos de BA, BE e G apresentaram IGS significativamente maior quando comparado com T e F.

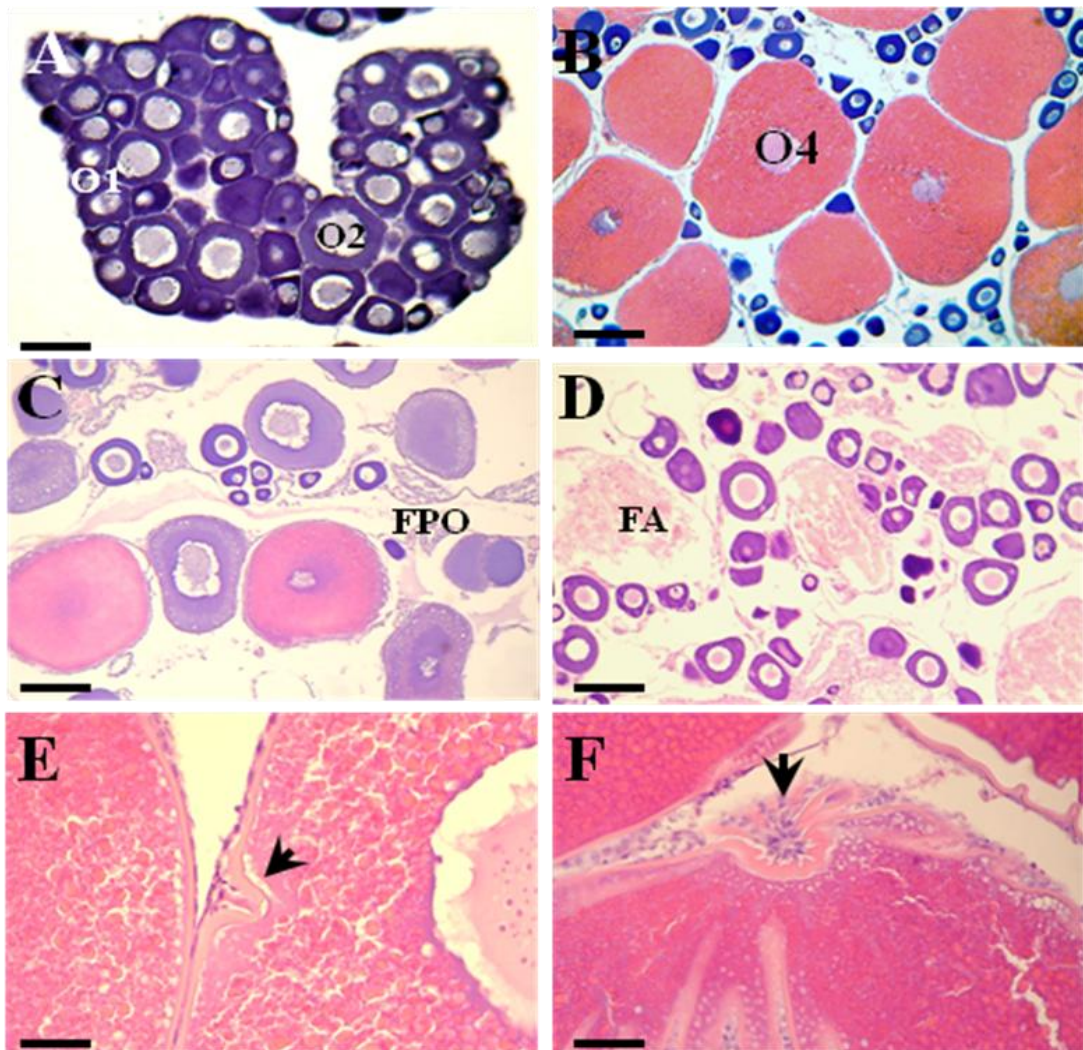


Figura 7: Maturação ovariana em *Astyanax fasciatus*. A- Repouso, barra 72,4 μm ; B- Maturação avançada, barra 193 μm ; C- Parcialmente desovado, barra 198,51 μm ; D- Totalmente desovado, barra 193 μm ; E, F- Região micropilar no pólo animal, barra 77,5 μm (E) e 20,66 μm (F). O1 e O2 – ovócitos perinucleolares inicial e avançado; O4 – ovócito vitelogênico; FPO – folículo pós-ovulatório; FA – folículo atrésico; setas – região micropilar.

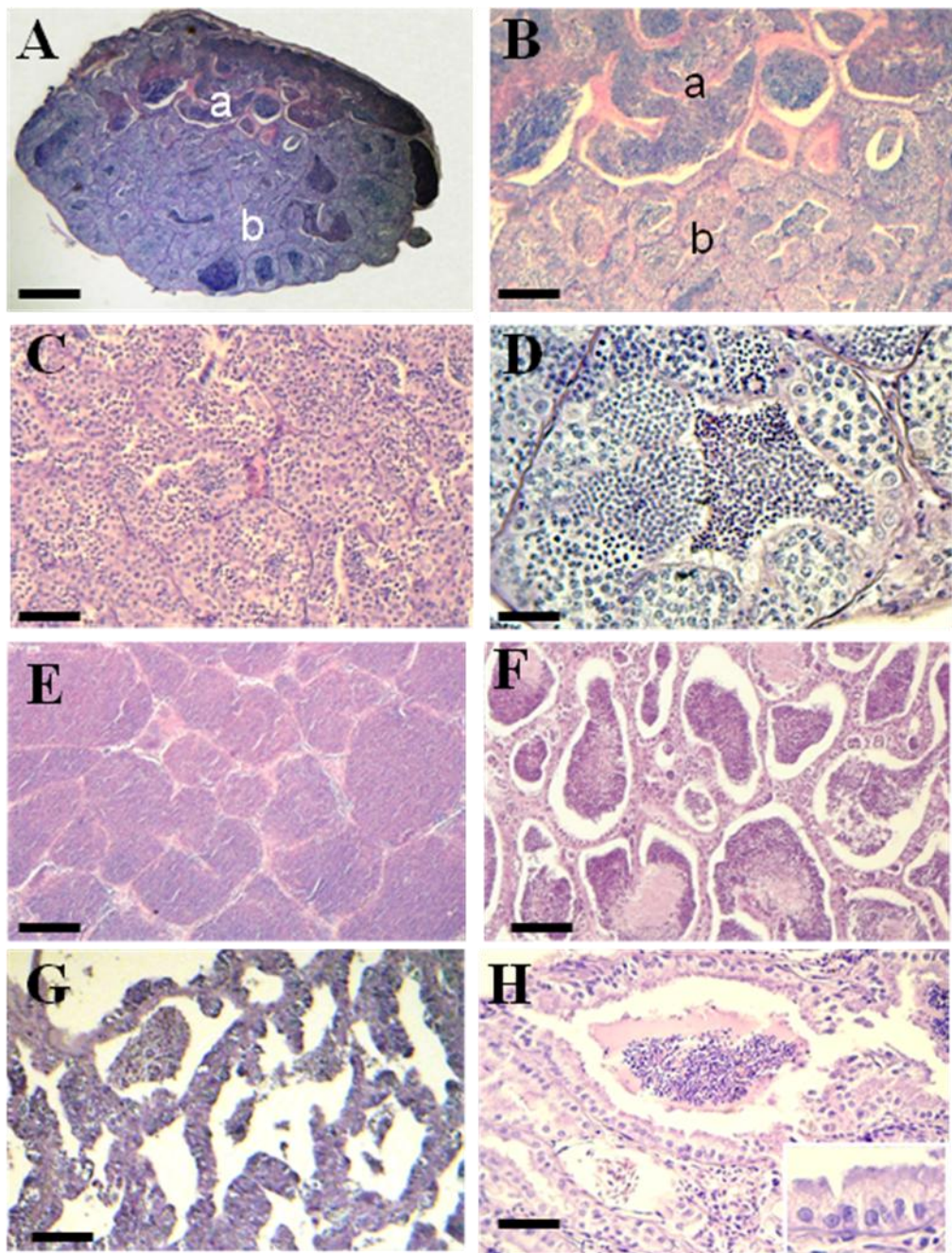


Figura 8: Maturação testicular em *Astyanax fasciatus*. A- Corte transversal do terço médio do testículo mostrando as regiões espermatogênica (a) e não espermatogênica (b), barra 369,22 μm ; B- Detalhe das duas regiões do testículo, barra 184,00 μm ; C- Maturação inicial, barra 54,37 μm ; E- Maturação avançada, barra 136,71 μm ; F- Parcialmente espermiado, barra 84,1 μm ; G- Totalmente espermiado, 77,5 μm ; D- Túbulo seminífero com as diferentes fases da espermatogênese, barra 34,72 μm ; H- Região caudal não espermatogênica, barra 32,37 μm . Encarte- Detalhe do epitélio prismático, barra 89,02 μm .

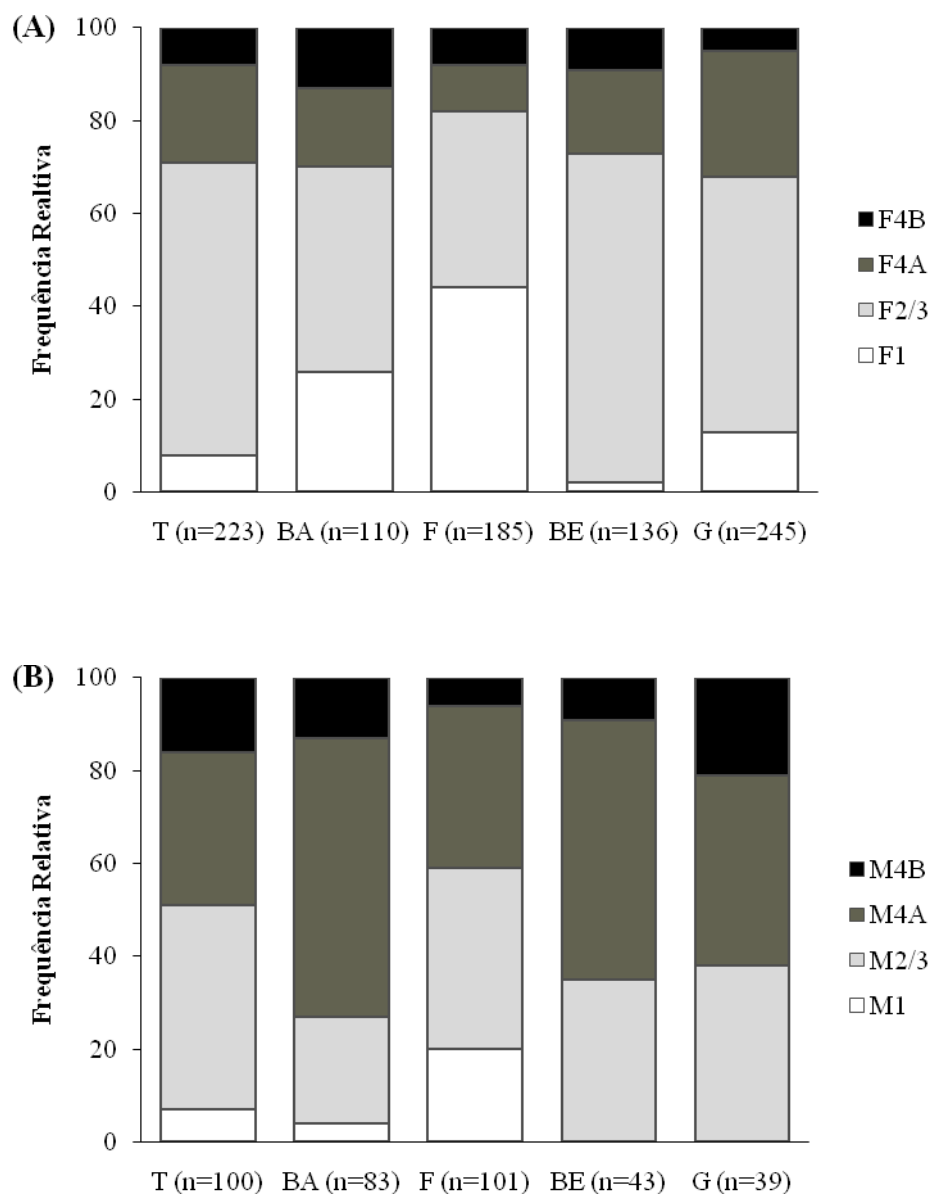


Figura 9: Frequências relativas (%) dos estádios de maturação gonadal de fêmeas (A) e machos (B) de *Astyanax fasciatus* capturados em 2006 e 2007 em cinco pontos de amostragem: Turvo (T); Barranco Alto (BA); Fama (F); Boa Esperança (BE), Guapé (G). Estádios de maturação gonadal: 1 = repouso, 2 = maturação inicial, 3 = maturação avançada/maduro, 4A = parcialmente desovada/espermiado, 4B = totalmente desovada/espermiado.

A distribuição do IGS por período de amostragem mostrou uma evidente sazonalidade no ponto referência (T), acompanhando o ciclo de maturação gonadal, com médias variando de 1,6 em julho até 12 em janeiro para fêmeas (Fig. 10A). Em BA e F, as médias do IGS foram menores do que as dos demais pontos na maioria dos períodos, com valores máximos próximos a 8 durante o pico da estação reprodutiva (Outubro e Janeiro). A mesma tendência observada nas médias por ponto (Tabela 2) foi também detectada em BE e G na maioria dos períodos de amostragem. Diferentemente das fêmeas, nos machos as variações do IGS não foram pronunciadas (Fig. 10B).

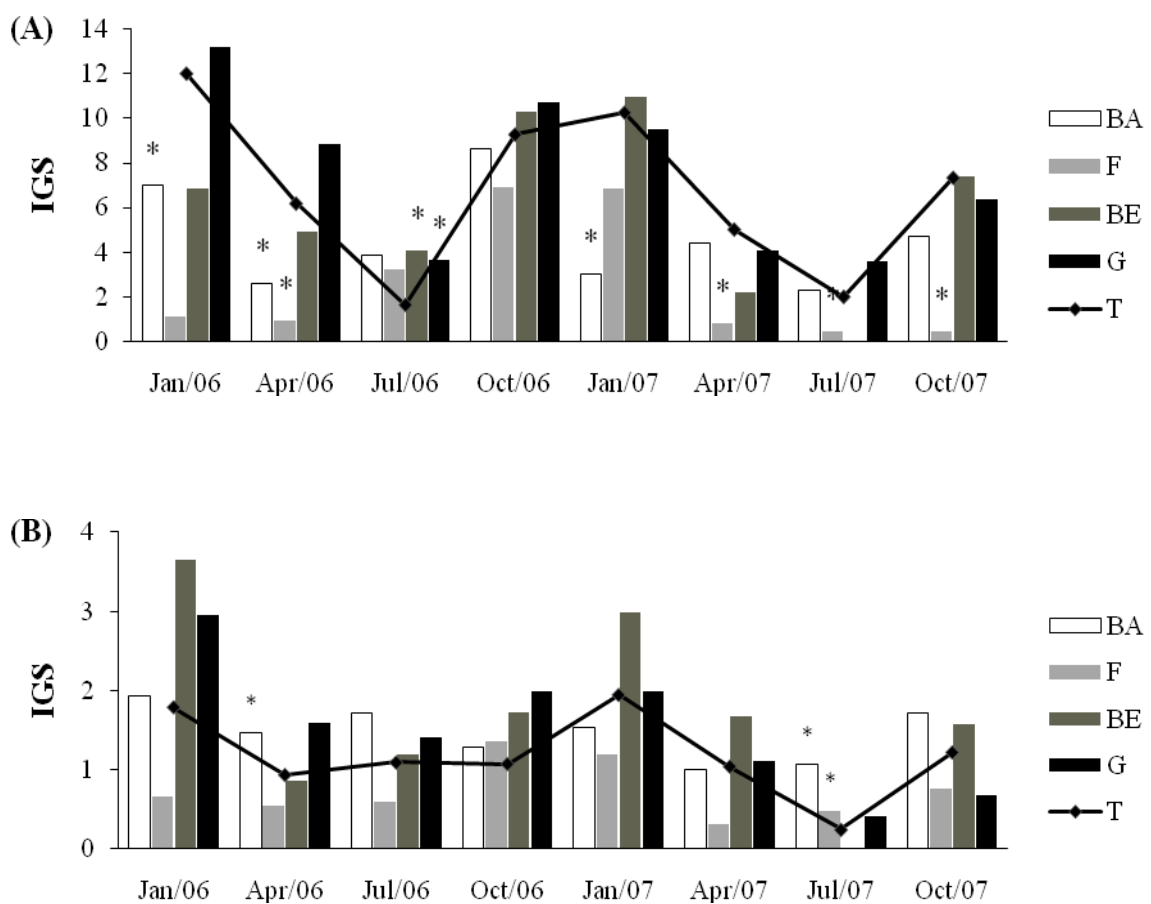


Figura 10: Distribuição sazonal dos índice gonadosomático (IGS) por período de amostragem para fêmeas (A) e machos (B) de *Astyanax fasciatus* capturados em cinco pontos de amostragem: Turvo (T); Barranco Alto (BA); Fama (F); Boa Esperança (BE), Guapé (G) no reservatório de Furnas em 2006 e 2007.

4.5. MORFOMETRIA

A análise morfométrica de ovários em estádios 3 e 4A mostrou uma distribuição próxima de 50% de folículos perinucleolares e 50% de folículos vitelogênicos em peixes do ponto referência (T) (Tabela 3). Folículos perinucleolares predominaram em fêmeas de Barranco Alto (76%) enquanto que nos outros pontos, as porcentagens de folículos perinucleolares e vitelogênicos não foram diferentes das de T. As frequências de folículos atrésicos foram baixas em todos os pontos de amostragem, variando de 3 a 6% entre os pontos e não houve diferença significativa em relação ao Turvo (Tabela 3). O diâmetro médio dos folículos vitelogênicos foi menor nos peixes de BA, F e BE em comparação com o ponto de referência ($DFV = 589,90 \pm 56,01 \mu\text{m}$).

Nos machos, o diâmetro médio dos túbulos seminíferos variou de $151,94 \pm 3,07 \mu\text{m}$ no ponto F até $190,47 \pm 38,15 \mu\text{m}$ no ponto G, sendo significativamente menor em F, onde o maior número de cistos de espermatócitos e de cistos totais por campo também foram obtidos. Cistos de espermatogônias foram menos frequentes nos peixes BE e G que nos peixes do ponto referência (T). Cistos de espermátides não foram significativamente diferentes entre os pontos de amostragem (Tabela 3).

4.6. PROPORÇÃO SEXUAL E INTERSEXO

A proporção sexual (Tabela 2) foi desviada para as fêmeas (χ^2 , $p < 0,001$) em todos os pontos de amostragem, exceto em BA (F: M = 1,31: 1) (χ^2 , $p = 0,22$). Prevalência acentuada de fêmeas foi detectada em Boa esperança (3,16 : 1) e Guapé (6,28 : 1). Em BE e G, também foi detectado intersexo em 31% e 19%, respectivamente, dos exemplares macroscopicamente classificados como machos capturados durante o pico reprodutivo em 2006, enquanto nenhum indivíduo intersexo foi detectado nos outros pontos. Neste período, o tecido ovariano normal mostrou folículos perinucleolar e vitelogênicos (Figura 7) e o tecido testicular túbulos seminíferos com cistos de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (Figura 8). Nas gônadas intersexo, os folículos ovarianos estavam organizados em dois padrões diferentes: (1) distribuição focal com grandes grupos de folículos perinucleolar e vitelogênicos em focos distintos no tecido testicular (Figura 11 A e C); (2) distribuição multifocal com pequenos grupos de folículos perinucleolar em contato direto com as células espermatogênicas nos túbulos seminíferos (Figura 11 B), com disrupção mínima da organização tecidual. A

distribuição focal foi o padrão predominante nas gônadas intersexo. Espermatozóides foram observados na região entre os folículos ovarianos vitelogênicos (Figura 11 D).

Estruturas separando os tecidos masculinos e femininos não foram detectados nos cortes histológicos, com ovócitos e células espermatogênicas em contacto direto (Figura 11 D e E). No padrão de distribuição focal, devido a seu grande tamanho, os folículos vitelogênicos ocuparam um espaço considerável nas seções testiculares e, conseqüentemente, causaram distúrbios na estrutura lobular. Folículos atrésicos também foram encontrados nas gônadas intersexo, mas folículos pós-ovulatórios não foram detectados.

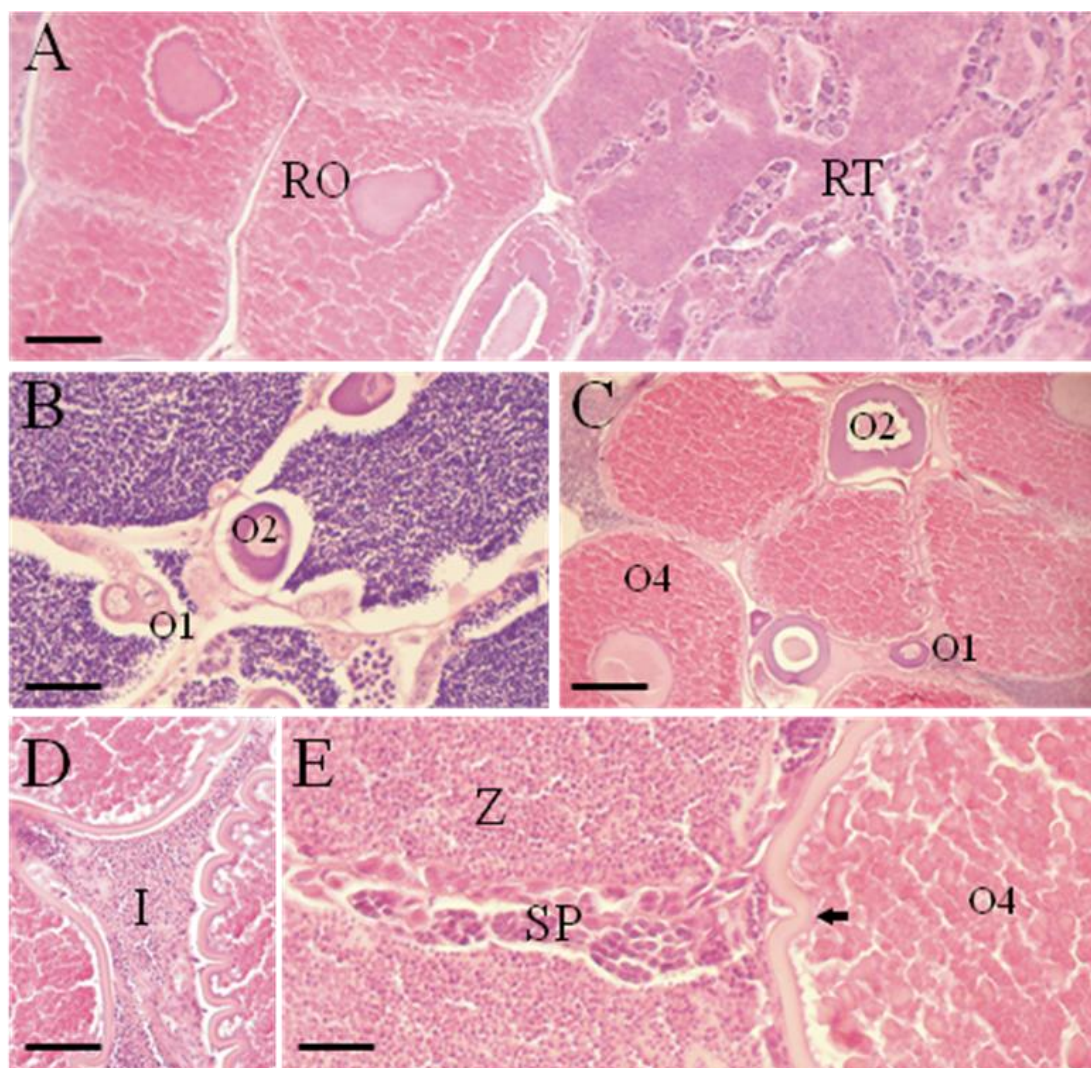


Figura 11: Intersexo em *Astyanax fasciatus*. A- Gônada em intersexo com região testicular (RT) e ovariana (RO) e distribuição focal dos ovócitos, barra 176,92 μm ; B- Distribuição multifocal dos ovócitos no tecido testicular, barra 72,37 μm ; C- Gônada em intersexo mostrado ovócitos em todas as fases de desenvolvimento, barra 217,12 μm ; D- Detalhe da presença de espermatozoides e secreção no interstício (I) entre os grupos de ovócitos, barra 33,06 μm ; E- Túbulo seminífero contendo células da linhagem espermatogênica (SP) e espermatozoides (Z) na gônada intersexo, região micopilar (seta), barra 14,88 μm . O1/O2: ovócitos previtelogênicos; O4: ovócito vitelogênico.

Tabela 3.

Frequências (%) e diâmetro médio de folículos vitelogênicos, número de cistos espermatogênicos por área e diâmetro dos túbulos seminíferos em exemplares de *A. fasciatus* capturados na estação reprodutiva em cinco pontos de amostragem do reservatório de Furnas, em 2006 e 2007.

| | | Turvo | Barranco Alto | Fama | Boa Esperança | Guapé |
|--------|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Fêmeas | Folículos perinucleolares | 50,73 ± 27,84 ^a | 76,27 ± 47,11 ^b | 45,20 ± 30,55 ^a | 42,19 ± 22,94 ^a | 46,71 ± 31,72 ^a |
| | Folículos vitelogênicos | 49,27 ± 24,51 ^a | 23,05 ± 25,77 ^b | 54,08 ± 25,79 ^a | 57,81 ± 28,34 ^a | 53,28 ± 27,82 ^a |
| | Folículos vitelogênicos atrésicos | 3,40 ± 0,49 ^a | 3,28 ± 0,59 ^a | 3,97 ± 0,55 ^a | 4,58 ± 0,48 ^a | 5,43 ± 0,79 ^a |
| | Diâmetro folículos vitelogênicos (µm) | 589,90 ± 56,01 ^a | 567,20 ± 57,24 ^b | 560,80 ± 64,51 ^b | 561,40 ± 54,35 ^b | 587,80 ± 56,36 ^a |
| Machos | Cistos de espermatogônias | 9,04 ± 6,43 ^a | 5,77 ± 3,41 ^{ab} | 9,80 ± 5,56 ^{ac} | 4,71 ± 2,24 ^{ad} | 4,02 ± 2,92 ^{bd} |
| | Cistos de espermatócitos | 18,31 ± 6,17 ^a | 20,63 ± 5,23 ^a | 29,55 ± 7,75 ^b | 19,98 ± 4,72 ^a | 21,55 ± 5,20 ^a |
| | Cistos de espermátides | 4,37 ± 2,7 ^a | 5,48 ± 2,36 ^a | 4,64 ± 1,86 ^a | 7,25 ± 3,31 ^a | 6,70 ± 2,64 ^a |
| | Cistos espermatogênicos totais | 33,67 ± 14,67 ^a | 33,42 ± 13,63 ^a | 43,60 ± 16,20 ^b | 31,53 ± 11,98 ^a | 32,54 ± 12,26 ^a |
| | Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm) | 177,86 ± 42,97 ^a | 175,48 ± 42,61 ^a | 151,94 ± 37,63 ^b | 173,64 ± 42,36 ^a | 190,47 ± 38,15 ^a |

Os valores representam média ± DP. Em uma linha, letras diferentes indicam diferença significativa entre os pontos de amostragem, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou vários parâmetros, desde o nível molecular até o populacional, para avaliar a poluição aquática no reservatório de Furnas. Esta avaliação altamente integrada permitiu uma detecção adequada dos efeitos da contaminação ambiental sobre os parâmetros reprodutivos e de saúde de *A. fasciatus*, sustentando a utilização desta espécie nativa como bioindicador de impacto ambiental para rios e lagos na América do Sul.

No geral, nossos resultados indicaram que a exposição a resíduos da agricultura e efluentes de esgoto industrial e doméstico sem tratamento no reservatório de Furnas provocou afetou negativamente o desenvolvimento e na biologia reprodutiva de *A. fasciatus*. Não entanto, não foram detectadas diferenças significativas nos coeficientes *a* e *b* da relação peso-comprimento entre os pontos de amostragem, indicando uma semelhança na condição geral de saúde dos peixes. Além disso, similarmente aos resultados relatados por Carvalho et al (2009), crescimento isométrico foi obtido no presente estudo para *A. fasciatus* no reservatório de Furnas. O crescimento alométrico negativo também foi obtido para esta espécie em diferentes ecossistemas (Barbieri et al, 1996; Gurgel et al, 2004). Estas diferenças podem estar relacionadas com as condições ambientais, perfil genético, alimentação e até mesmo com as técnicas de amostragem e preservação dos peixes (Bagenal & Tesch, 1978).

De acordo com as principais respostas biológicas obtidas no presente estudo, os pontos de amostragem investigados estão agrupados, a seguir, em três padrões diferentes: 1) ponto de referência (T); 2) BA e F, onde os peixes mostraram falhas de crescimento e maturação gonadal, e 3) BE e G onde foram detectados feminilização e intersexo. No ponto referência (T), *A. fasciatus* apresentou os melhores indicadores de saúde e de reprodução que foram semelhantes aos obtidos anteriormente (Carvalho et al. 2009). Embora esta área não seja urbana, o recente aumento do turismo nesta região, indica a necessidade de atenção especial por parte das instituições públicas ambientais para preservação de sua ictiofauna

Nos pontos BA e F, o porte dos peixes, as frequências dos estádios de maturação gonadal e os valores de IGS sugerem redução do crescimento e atraso na maturação gonadal. Essas alterações foram confirmadas nas análises morfométricas que mostraram os menores diâmetros dos folículos vitelogênicos em ambos os pontos. Além disso, a prevalência de folículos perinucleolares foi observada no ponto BA, enquanto em F

foram detectadas as maiores contagens de espermatogônias e espermatócitos, e os menores diâmetros dos túbulos seminíferos. Alterações no desenvolvimento e reprodução têm sido relatadas em várias espécies de peixes expostos aos desreguladores endócrinos, tais como o mosquitofish *Gambusia* sp (Game et al., 2006; Orlando et al., 2007) e o esturjão branco *Acipenser transmontanus* (Feist et al., 2005). Recentemente, Shved et al. (2007, 2008) observaram que tilápias *Oreochromis niloticus* experimentalmente expostas ao 17α -etinilestradiol, principal constituinte das pílulas anticoncepcionais, apresentaram conseqüências no crescimento e no desenvolvimento sexual, além de alterações nos níveis de mRNA do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e do hormônio do crescimento (GH). Estudos moleculares e genéticos adicionais são necessários para investigar os efeitos da contaminação aquática no reservatório de Furnas sobre o sistema GH / IGF-I em *A. fasciatus*.

Parâmetros de saúde como o IHS, K e histofisiologia de órgãos alvo, dentre outros, têm sido utilizados para avaliar os efeitos de misturas complexas de contaminantes e para compreender os mecanismos dos efeitos integrados dos compostos químicos sobre os sistemas biológicos dos peixes, principalmente em estudos de campo (Filby et al., 2007). No presente estudo, as maiores médias do IHS detectados nos peixes capturados nos pontos impactados (BA, F, BE e G) podem ter sido causadas por acúmulos de lipídios hepáticos e pela hipertrofia para a remoção de substâncias tóxicas ou para síntese aumentada de Vtg, Zrp e outras proteínas induzidas por EDCs. Alterações hepáticas com acumulação de lipídios e hipertrofia celular têm sido relatadas em vários teleósteos expostos a compostos orgânicos e metais pesados (Folmar et al., 2001; Meucci & Arukwe, 2005; Van Dyk et al., 2007; Fishelson et al., 2006). No presente estudo, a contaminação por resíduos da agricultura e efluentes industriais em BA e F (IGAM, 2008) pode ser responsável pela desregulação endócrina e pelos impactos de saúde detectados nos peixes habitantes dessas regiões. Esses resultados indicam a necessidade de quantificar e monitorar os resíduos de organoclorados e metais pesados no reservatório de Furnas.

Nos locais que recebem esgotos domésticos sem tratamento, a carga de matéria orgânica reduziu a qualidade da água com um aumento significativo da condutividade, principalmente no ponto BE. Além disso, nesse ponto também foram registradas maiores valores de resíduos sólidos totais, contendo cerca de 70% de matéria orgânica (sólidos voláteis). Em geral, ambientes poluídos por contaminantes orgânicos mostram

altos níveis de produtividade (Colinvaux, 1993) e as poucas espécies que sobrevivem nesses ambientes podem se tornar abundantes tal como *A. fasciatus* (Alberto et al, 2005). Considerando isso, as maiores médias de K e IGC observadas no presente estudo nos peixes do ponto BE podem estar refletindo a abundância de nutrientes associados às descargas de esgoto doméstico. Resultados semelhantes foram relatados para *A. fasciatus* habitantes de regiões poluídas por esgoto doméstico no rio dos Sinos, e no rio Camanducaía, Brasil (Schulz & Martins-Júnior, 2001; Alberto et al, 2005). Segundo Filby et al (2007), os xenoestrógenos de dejetos humanos estão associados aos resíduos sólidos nos esgotos domésticos e causam efeitos adversos na reprodução e desenvolvimento de peixes selvagens, portanto, constituem um grave problema ecológico. Em *A. fasciatus*, tendência de maiores médias de IGS e frequências elevadas de fêmeas maduras foram detectadas nos pontos BE e G, quando comparados aos demais pontos de amostragem. Vários estudos têm associado essas alterações reprodutivas com crescimento do ovário de forma contínua estimulada pela exposição aos xenoestrógenos, levando a um atraso na mudança esteroidogênica que desencadeia a maturação final ovocitária e a desova (Nagahama et al., 1995, Johnson et al. 2008). No entanto, estudos futuros devem ser conduzidos para investigar esta questão em *A. fasciatus* no reservatório de Furnas.

Desvios na proporção sexual de cerca de duas fêmeas para cada macho têm sido freqüentemente detectados em estudos de campo, principalmente em espécies do gênero *Astyanax* (Barreto et al, 1998; Carvalho et al., 2009) e podem estar relacionadas com a seletividade de redes de espera utilizadas nas capturas, tal como encontrado nos peixes coletados nos pontos T, BA e F. No entanto, nós detectamos fêmeas consistentemente mais numerosas do que machos nos pontos BE (6: 1) e G (3: 1). Também nesses pontos encontramos uma proporção elevada de exemplares intersexo (31% em BE e 19% em G), que não são consideradas normais em espécies gonadocóricas (Bjerregaard et al, 2006) como *A. fasciatus*. Gônadas intersexo foram encontradas em várias espécies de peixes capturados em rios poluídos por EDCs na América do Norte, Inglaterra e Japão, assim como no mar Mediterrâneo (De Metrio et al., 2003; Urushitani et al. 2007; Hinck et al, 2009; Jobling et al, 2009). Intersexo também foi descrito em *Astyanax scabrippinis* de córregos no sudeste do Brasil (Pereira de Sá et al, 2008) embora não relacionados à poluição ambiental como no presente trabalho. Os desvios na razão sexual e intersexo podem afetar o desenvolvimento e reprodução da prole (Hutchinson

et al, 2006; Kidd et al., 2007) e, assim, as populações de *A. fasciatus* no reservatório de Furnas poderão ser comprometidas a longo prazo.

A contaminação por xenoestrógenos no reservatório de Furnas foi também avaliada ao nível protéico através de análises por immunoblotting das proteínas da zona radiata (*Zrp*) em amostras de fígado de machos. Devido à resposta rápida e sensível, a expressão de *Zrp* é capaz de indicar as alterações nos níveis mais altos da organização biológica (Arukwe et al., 1997). Em estudos experimentais, maior sensibilidade da *Zrp* quando comparada com *Vtg* foi observada em juvenis do salmão do Atlântico tratados com diferentes doses de resíduos de refinaria de petróleo: estradiol, DDT e de nonilfenol (Arukwe et al., 1997; Celius et al, 1998; Arukwe & Roe , 2008). Nesses estudos, a expressão de *Zrp* foi detectada em baixas doses de EDCs, enquanto a *Vtg* foi induzida somente em doses elevadas, indicando uma maior sensibilidade das *Zrp* na detecção da contaminação estrogênica. No presente estudo, analisando os efeitos populacionais e nos organismos, nós esperávamos encontrar expressão de *Zrp* nos machos de BE e G, hipótese que foi confirmada em nossas análises. Entretanto, surpreendentemente, expressão significativa das *Zrp* também foi detectada em machos do ponto F. Isso pode ser um sinal precoce da contaminação por xenoestrógenos também neste ponto, que recebe dejetos industriais e domésticos das cidades do entorno. A expressão de *Zrp* nos machos dos pontos Fama, Boa Esperança e Guapé, adicionada à proporção sexual alterada em favor das fêmeas (fenômeno referido como feminilização) e a ocorrência de intersexo são as primeiras evidências de desregulação endócrina em populações selvagens de *A. fasciatus* e fortemente sugerem que a contaminação por xenoestrógenos no reservatório de Furnas está afetando sua ictiofauna nativa.

Em resumo, concluímos que *A. fasciatus* reproduz-se no reservatório de Furnas, no entanto seu desenvolvimento e reprodução estão negativamente afetados por desreguladores endócrinos. Medidas urgentes são necessárias para tratamento dos esgotos doméstico e industrial antes do descarte final dos dejetos no reservatório para evitar efeitos nocivos sobre as populações de peixes e redução da diversidade de espécies. Além disso, sugerimos que biomarcadores reprodutivos e de saúde, especialmente biomarcadores moleculares como a expressão de *Zrp* utilizada no presente trabalho, devem ser incorporados aos programas de monitoramento do reservatório de Furnas, bem como de outros ecossistemas de água doce da América do

Sul. Finalizando, o lambari *A. fasciatus* apresentou respostas efetivas aos biomarcadores analisados, confirmando a sua utilização como espécie bioindicadora de impacto ambiental no reservatório de Furnas, especialmente dos desreguladores endócrinos.

6. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam a necessidade de padronizar e validar metodologias refinadas de monitoramento de poluentes químicos, principalmente desreguladores endócrinos, utilizando espécies nativas como sentinela e biomarcadores moleculares específicos. Nesse contexto, para o projeto de tese de Doutorado, propomos a indução, purificação e produção de anticorpos específicos anti-Vtg e anti-Zrp de *A. fasciatus*, seguido por dosagens desses biomarcadores no plasma de peixes capturados em pontos impactados do reservatório de Furnas. Os resultados serão associados a análises químicas da água e do sedimento, incluindo dosagens de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) e estrógenos. Dentre os resultados esperados estão o desenvolvimento de metodologias para monitoramento ambiental de ecossistemas de água doce e os produtos gerados contribuirão para desenvolvimento tecnológico do país além de fornecer subsídios para avaliações ecotoxicológicas na América do Sul.

7. CONCLUSÕES

- A relação peso-comprimento mostrou crescimento isométrico para *A. fasciatus* em todos os pontos de amostragem com coeficientes de regressão linear em torno de 3 ($p < 0,05$).
- *A. fasciatus* reproduz-se no reservatório de Furnas, no entanto, em regiões impactadas por desreguladores endócrinos seu desenvolvimento e reprodução estão negativamente afetados.
- Nos pontos Barranco Alto e Fama, o menor porte dos peixes, as altas frequências de repouso e os IGS reduzidos sugerem redução do crescimento e atraso na maturação gonadal.
- Distúrbios na proporção sexual e indivíduos intersexo em Boa Esperança e Guapé são indicativos de disrupção endócrina nos trechos do reservatório de Furnas receptores de efluentes domésticos não tratados.
- A expressão de *Zrp* nos machos dos pontos Fama, Boa Esperança e Guapé, fortemente sugerem a contaminação por xenoestrógenos no reservatório de Furnas.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alberto, A., Camargo, A.F.M., Verani, J.R., Costa, O.F.T., Fernandes, M.N., 2005. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 61, 247-255.
- Ankley, G.T., Bencic, D.C., Breen, M.S., Collette, T.W., Conolly R.B., Denslow, N.D., Edwards, S., W., Ekman, D.R., Garcia Reyero, N., Jensen, K.M., Lazorchak, J.M., Martinovi, D., Miller, D.H., Perkins, E.J., Orlando, E.F., Villeneuve, D.L., Wang, R.L., Watanabe, K.H., 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquat. Toxicol.* 925, 168-178.
- Ankley, G.T., Miller, D.H., Jensen, K.M., Villeneuve, D.L., Martinovi, D., 2008. Relationship of plasma sex steroid concentrations in female fathead minnows to reproductive success and population status. *Aquat. Toxicol.* 88, 69–74.
- Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T., Goksøyr, A., 2000. Effects of xenoestrogen treatment on *zona radiata* protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 49, 159-170.
- Arukwe, A., Goksøyr, A., 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp. Hepatol.* 2, 1-21.
- Arukwe, A., Knudsen, F.R., Goksøyr, A., 1997. Fish *zona radiata* (Eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.* 105, 418–422.
- Arukwe, A., Røe, K., 2008. Molecular and cellular detection of expression of vitellogenin and zona radiata protein in liver and skin of juvenile salmon (*Salmo salar*) exposed to nonylphenol. *Cell Tissue Res.* 331, 701–712.
- Bagenal, T.B., Tesch, F.W., 1978. Age and growth, in: Bagenal, T.B. (Ed.), *Methods for assessment of fish production in fresh waters*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 101–136.
- Barbieri, G., Hartz, S., Verani, J.R., 1996. O fator de condição e o índice hepatossomático como indicadores do período de desova de *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819, da Represa do Lobo, São Paulo (Osteichthyes, Characidae). *Ser. Zool.* 81, 97-100.
- Barreto, B.P., Ratton, T.F., Ricardo, M.C.P., Alves, C.B.M., Vono, V., Vieira, F., Rizzo, E., Bazzoli, N., 1998. Biologia reprodutiva do lambari *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) no rio do Carmo, bacia do rio Grande, São Paulo. *Bios.* 6, 177-126.

- Bertin, A., Inostroza, P.A., Quiñones, R.A., 2009. A theoretical estimation of the concentration of steroid estrogens in effluents released from municipal sewage treatment plants into aquatic ecosystems of central-southern Chile. *Sci. Total Environ.* 407, 4965-4971.
- Bjerregaard, L.B., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2006. Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 64, 321-328.
- 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. *J. Appl. Ichthyol.* 25, 306-313.
- Celius, T., Walther, B.T., 1998. Differential sensitivity of zonagenesis and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) to DDT pesticides. *J. Exp. Zool.* 281, 346–353.
- Colinvaux, P., 1993. *Ecolog.*, Second ed. Wiley, New York.
- Dawson, A. Comparative reproductive physiology of non-mammalian species. 1998. *Pure. Appl. Chem.* 70, 1657– 1669.
- De Metrio, G., Corriero, A., Desantis, S., Zubani, D., Cirillo, F., Deflorio, M., Bridges, C.R., Eicker, J., de la Serna, J.M., Megalofonou P., Kime, D.E., 2003. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Mar. Pollut. Bull.* 46, 358-361.
- Denslow, N., Sepúlveda, M., 2007. Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction, in: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), *The fish oocyte from basic studies to biotechnological application*. Springer ©, Dordrecht, pp. 256-322.
- Game, C., Gagnon, M.M., Webb, D., Lim, R., 2006. Endocrine disruption in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) inhabiting wetlands in Western Australia. *Ecotoxicology* 15, 665-672.
- Gurgel, H.C.B., 2004. Population structure and breeding season of *Astyanax fasciatus* Cuvier (Characidae, Tetragonopterinae) from Ceará Mirim River, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev. Brasil. Zool.* 21, 131–135.
- Guzmán, J. M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C. C., Mañanós, E. L. 2008. Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *General and Comp. Endocrinol.* 156, 285–297.
- Ebrahimi, M., Singh, P.B., Kime, D.E. 1995. Biosynthesis of 17,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one, 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 11-ketotestosterone y

- testicular fragments and sperms of roach, *Rutilus rutilus*. Gen. and Comp. Endocr. 100, 375–384.
- Feist, G.W., Webb, M.A.H., Gundersen, D.T., Foster, E.P., Schreck, C.B., Maule, A.G., Fitzpatrick, M.S., 2005. Evidence of detrimental effects of environmental contaminants on growth and reproductive physiology of white sturgeon in impounded areas of the columbia river. Health. Perspect. 113, 1675-1682.
- Filby, A.M., Neuparth, T., Thorpe, K.L., Owen, R., Galloway, T.S., Tyler, C.R., 2007. Health impacts of estrogens in the environment, considering complex mixture effects. Environ. Health Perspect. 115, 1704-1710.
- Fishelson, F., 2006. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicator of stress. J. Morphol. 267, 57-69.
- Folmar, L., Denslow, N., Kroll, K., Orlando, E., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C., 2001. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 392–398.
- Furnas Centrais Elétricas S.A. 2009. <http://www.furnas.com.br>.
- Hecker, M., Tyler, C.R., Hoffmann, M., Maddix, S., Karbe, L., 2002. Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany. Environ. Sci. Technol. 36, 2311-2321.
- Hinck, J.E., Blazer, V.S., Schmitt C.J., Papoulias, D.M., Tillitt, D.E., 2009. Widespread occurrence of intersex in black basses (*Micropterus spp.*) from U.S. rivers, 1995–2004. Aquat. Toxicol. 95, 60-70.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, N.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Aquat. Toxicol. 76, 69-92
- Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM). 2008. Monitoramento das águas superficiais da bacia do Rio Grande em 2007 – Relatório anual. Governo do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. <http://aguas.igam.mg.gov.br/aguas>.
- Jobling, S., Burn, R.W., Thorpe K., Williams R., Tyler C., 2009. Statistical modeling suggests that antiandrogens in effluents from wastewater treatment works contribute to widespread Sexual disruption in fish living in English Rivers. Environ. Health Perspect. 117, 797–802.
- Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J. G., Kime, D. E., Van Look, J. J. W., McAllister, B. G., et al., 2002. Wild intersex Roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. Biol. Reprod. 67, 515-524.

- Jobling, S., Tyler, C. R., 2006. Introduction: the ecological relevance of chemically induced endocrine disruption in wildlife. *Environ. Health. Perspect.* 114, 7–8.
- Johnson, L.L., Lomax, D.P., Myers, M.S., Olson, I. O.P., Sol, S.I., O’Neil, S.M., West, J., Collier, T.K., 2008. Xenoestrogen exposure and effects in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, WA. *Aquat. Toxicol.* 88, 29-38.
- 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. *PNAS.* 104, 8897-8901.
- Kipfer, S., Segner, H., Wenger, M., Wahli, T., Bernet, D., 2009. Long-term estrogen exposure of whitefish *Coregonus lavaretus* induces intersex but not Lake Thun-typical gonad malformations. *Dis. Aquat. Organ.* 84, 43-56.
- Kime, D.E., Nash, J.P., Scott, A.P. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture.* 177, 147-152.
- Kloas, W., Urbatzka, R., Opitz, R., Würtz, S., Behrends, T., Hermelink, B., Hofmann, F., Jagnytsch, O., Kroupova, H., Lorenz, C., Neumann, N., Pietsch, C., Trubiroha, A., Van Ballegooy, C., Wiedemann, C., Lutz, I., 2009. Endocrine disruption in aquatic vertebrates. *Trends Comp. Endocr. Neurobiol.* 1163, 187-200.
- Kwok, K.H.W., Leung, K.M.I., Lui, G.S.G., Chu, V.K.H., Lam, P.K.S., Morrill, D., Maltby, L., Brock, T.C.M., Brink, P.J.V., Warne, M.S.J., Crane, M. 2007. Comparison of Tropical and Temperate Freshwater Animal Species’ Acute Sensitivities to Chemicals: Implications for Deriving Safe Extrapolation Factors. *Integr. Environm. Assess. and Manage.* 3, 49-67.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.
- Lecher, T.E., Goldstein, M.I. 1997. Tropical ecotoxicology: Status and needs. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 100–111.
- Linde-Arias, A.R., Inácio, A.F., Novo, L.A., Albuquerque, C., Moreira J.C. 2008. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environm. Pollut.* 37, 1–6.
- Li, Z., Zhang, S., Liu, Q., 2008. Vitellogenin Functions as a Multivalent Pattern Recognition Receptor with an Opsonic Activity. *PLOS one.* 4, e1940.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E., Mc Cormick, D., 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from sewage treatment works. *Mar. Pollut. Bull.* 34, 34-41.

- Matsushita, M. & Souza, N.E. 1994. Organochlorine pesticides residues in some commercial fish species from floodplain of high Paraná River, Porto Rico region, Paraná State, Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. 37, 637-644.
- Meucci, V., Arukwe, A., 2005. Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* 73, 1-10.
- Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* 343, 1– 34.
- Minier, C., Caltot, G., Leboulanger, F., Hill, E.M. 2000. An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analisis*. 28, 801–806.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T., Katsu, Y., 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30, 103–145.
- Orlando, E.F., Bass, D.E., Caltabiano, L.M., Davis W.P., Gray L.E., Guillette, L.J., 2007. Altered development and reproduction in mosquitofish exposed to pulp and paper mill effluent in the Fenholloway River, Florida USA. *Aquat. Toxicol.* 84, 399-405.
- Palace, V. P., Evans R. E., Wautier, K., Baron, C., Vanderbyllardt T, L., Vandertten¹ W., Kidd, K. 2002. Induction of Vitellogenin and Histological Effects in Wild Fathead Minnows from a Lake Experimentally Treated with the Synthetic Estrogen, Ethynylestradiol. *Water Qual. Res. J. Can.* 37, 637-650.
- Pereira de Sá, M.F., Fragoso-Moura, E.N., Fenerich-Verani, N., Ferro, D.A.M., 2008. Occurrence of intersexuality in “lambaris”, *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842), small characids from the Brazilian streams. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 51, 315-322.
- Prado, P.S.; Rizzo, E. 2005. Análise histológica do ciclo reprodutivo do lambari do rabo vermelho *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Characidae, Tetragonopterinae) do reservatório de Furnas, rio Grande, MG. IN: Resumos....XIV Semana de Iniciação Científica da UFMG. Belo Horizonte.
- Prado, P.S. 2007. O lambari *Astyanax fasciatus* como bioindicador de poluição ambiental no reservatório de Furnas, Rio Grande, MG: atividade reprodutiva e histopatologias de fígado e brânquias. 26 p. (Monografia de conclusão de curso, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas - UFMG).
- Schulz, U.H., Martins-Júnior, H., 2001. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Braz. J. Biol.* 61, 615-622.

- Shved, N., Berishvili, G., Baroiller, J.F., Segner, H., Reinecke, M., 2008. Environmentally relevant concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2) interfere with the growth hormone (GH) insulin-like growth factor (IGF)-I system in developing bony fish. *Toxicol. Sci.* 106, 93-102.
- Shved, N., Berishvili, G., D’Cotta, H., Baroiller, J. F., Segner, H., Eppler, E., Reinecke, M., 2007. Ethinylestradiol (EE2) differentially interferes with insulin-like growth factor-I (IGF-I) in liver and extrahepatic sites during development of male and female bony fish. *J. Endocrinol.* 195, 513–523.
- Silversand, C., Haux, C., 1995. Fatty acid composition of vitellogenin from four teleost species. *J. Comp. Physiol.* 164, 593–599.
- Singh, P.B., Singh, V. 2006. Impact of endosulfan on the profiles of phospholipids at sublethal concentration in the male *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Journal of Environ. Biol.* 57, 509–514.
- Singh, P.B., Singh, V. 2008. Pesticide bioaccumulation and plasma sex steroids in fishes during breeding phase from north India. *Environ. Toxicol. and Phar.* 25, 342–350.
- Sonnenschein, C., Soto, A. M., 1998. An update review of environmental estrogen and androgens mimics and antagonists. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 65, 140-150
- Tanure, E.L., 2003. Projeto Furnas Fase III: Monitoramento de metais, resíduos agrotóxicos e cargas poluidoras. <http://www.unifenas.br/extensao/furnas>.
- Urushitani, H., Katsu, Y., Kato, Y., Tooi, O., Santo, N., Kawashima, Y., Ohta, Y., Kisaka, Y., Lange, A., Tyler, C.R., Johnson, R.,D., Iguchi, T., 2007. Medaka (*Oryzias latipes*) for use in evaluating developmental effects of endocrine active chemicals with special reference to gonadal intersex (testis-ova). *Environ. Sci.* 14, 211-233.
- Van Der Kraack, G., Hewitt, M., Lister, A., McMaster, M.E., Munkittrick, K.R. 2001. Endocrine toxicants and reproductive success in fish. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 7, 1017– 1025.
- Van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., Van Vuren, J.H.J. 2005. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecot. Environ. Safe.* 66, 432-440.
- Vos, J. G., Dybing, R., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., et al., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 71-133.

- Winkaler, E.U., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R. 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum*. 23, 507-514.
- Wootton, R.J. 1990. Ecology of teleost fishes. Chapman and Hall, New York, 404p.
- Xu, H., Yang, J., Wang, Y., Jiang, Q., Chen H., Song, H. 2008. Exposure to 17-ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 88, 1–8.
- Yamagami, K., Hamazaki, T.S., Yasumasu, S., Masuda, K., Iguchi, I., 1992. Molecular and cellular basis of formation, hardening, and breakdown of the egg envelope in fish. *Int. Rev. Cytol.* 136,51-92.