



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA  
LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

**LAURA ESTELA DE MELO**

**Parâmetros comportamentais e reprodutivos para  
utilização como biomarcadores de desregulação endócrina  
em *Poecilia vivipara***

RECIFE  
2016

**LAURA ESTELA DE MELO**

**Parâmetros comportamentais e reprodutivos para  
utilização como biomarcadores de desregulação endócrina  
em *Poecilia vivipara***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: **Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho**

RECIFE  
2016

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Melo, Laura Estela de**

**Parâmetros comportamentais e reprodutivos para utilização como biomarcadores de desregulação endócrina em *Poecilia vivipara* / Laura Estela de Melo** Recife: O Autor, 2016.

**87 folhas: il., fig., tab.**

**Orientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho**

**Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Biologia Animal, 2016.**

*Inclui referências*

1. *Poecilia* 2. Fecundidade 3. Toxicologia ambiental I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (orientador) II. Título

**597.667**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2016-308**

**LAURA ESTELA DE MELO**

**Parâmetros comportamentais e reprodutivos para  
utilização como biomarcadores de desregulação endócrina  
em *Poecilia vivipara***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

**Data de Aprovação:** 31/05/2016

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Profa. Dra. Eliete Zanardi Lamardo (1º Titular)  
Departamento de Oceanografia - UFPE

---

Profa. Dra. Cristiane Maria Varela de Araújo Castro (2º Titular)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal ó UFRPE

---

Prof. Dr. Antonio Souto (3º Titular)  
Departamento de Zoologia - UFPE

---

Profª. Dra. Bruna Martins Bezerra (Suplente Interno)  
Departamento de Zoologia - UFPE

---

Profa. Dra. Lilia P. Souza Santos (Suplente externo)  
Departamento de Oceanografia - UFPE

RECIFE  
2016

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo  
para a vitória é o desejo de vencer!

**Mahatma Ghandi**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e sabedoria durante minha caminhada, me fortalecendo em todos os momentos desta jornada, e também por me conceder mais uma importante conquista.

A minha família, especialmente minha mãe Lindalva, e minhas tias Zisa, Tata e Bia, pela confiança e suporte durante esses dois anos, e por sempre me incentivarem a ir mais longe.

Ao meu orientador, Paulo Carvalho, por compartilhar comigo toda a sua sabedoria e pela confiança a mim proporcionada. E por ter me acompanhado em cada passo deste trabalho, contribuindo de maneira essencial no meu crescimento profissional e pessoal, ao longo do mestrado.

A professora Christina Peixoto, do Instituto Ageu Magalhães, pela oportunidade de colaboração, disponibilizando seu conhecimento e membros de sua equipe para a execução da parte histológica desse estudo. E também a Duda e Gabriel, pela paciência e ajuda durante esses procedimentos.

A professora Cassiana C. Montagner Raimundo, do Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da UNICAMP, pela oportunidade de colaboração, disponibilizando seu conhecimento e membros de sua equipe para a execução das análises cromatográficas de estrógenos e outras moléculas com atividade estrogênica.

A toda equipe do LABETOTOX, pelo acolhimento e paciência durante esses 4 anos. Agradeço a Luiz, Juliana, Rômulo e Helena, por estarem presentes comigo nesses últimos dois anos. A Driele, por todo companheirismo, conselhos, pela amizade, brincadeiras no momento de descontração, enfim por tudo que você fez por mim, principalmente nesta última etapa do mestrado. A Aline, que apareceu de repente em nossas vidas, e que com certeza já tem um lugarzinho no meu coração. Aos mais novos membros do Labeco, Lícia, Maria, Célio e Akemi, que embora estejam a pouco tempo na equipe, também foram essenciais na realização desse trabalho. Aos ex-companheiros do Labecotox, Gabi, Priscila, Renato, Talita e Raissa, que embora não estejam mais na equipe, vão estar sempre no meu coração.

Aos meus amigos do PPGBA, Celina, Cori, Heloína, Jaire, Éder, Ikaro, Arthur, Neto, Raissa e Tarci, que estiveram comigo, não apenas contribuindo na minha formação ao longo das disciplinas, mas também nos momentos de alegria.

Aos meus amigos Millena, Teresa, Livia, Mari Lins, Natália, Sílvia, Rodolfo, Bruno, Fernando e Rodrigo por tudo, pela amizade, companheirismo, alegrias, apoio, enfim, por ser quem vocês são e de fato muito importantes para mim.

Ao CNPq pelo concedimento da bolsa de pesquisa, e por fim, agradeço a todos que sendo ou não citados aqui, tiveram uma enorme contribuição para a construção de cada página deste trabalho.

## RESUMO

Compostos desreguladores endócrinos (CDEs) contaminam ecossistemas aquáticos e são capazes de imitar a ação de hormônios endógenos em peixes. Diante disso, este trabalho avaliou primeiramente os efeitos da exposição de machos adultos de *Poecilia vivipara* a uma mistura ambiental de contaminantes com atividade estrogênica e ao CDE 17 $\beta$ -etinilestradiol (EE2), envolvendo a análise química de moléculas estrogênicas na mistura ambiental, e de parâmetros bioquímicos, comportamentais e reprodutivos. Moléculas com atividade estrogênica foram quantificadas por cromatografia líquida com espectrometria de massas nas águas da Lagoa do Araçá (LA), do rio Capibaribe (RC) e no Complexo estuarino da Baía do Pina (CEBP), região metropolitana de Recife. Machos adultos de *P. vivipara* cultivados em laboratório foram expostos por 14 dias a água limpa controle (EECT), a 10 ng EE2 L<sup>-1</sup> (EE10) e 100 ng EE2 L<sup>-1</sup> (EE100). Em paralelo, machos adultos residentes no CEBP foram coletados em LA, e trazidos ao laboratório. Machos expostos ao EE2 em laboratório e residentes no CEBP foram colocados em contato com fêmeas adultas cultivadas no laboratório, e os casais foram monitorados por um sistema de vídeo, com posterior avaliação quantitativa do comportamento sexual pelo software de análise comportamental Smart. Os parâmetros avaliados foram: número de contatos entre machos e fêmeas (NC); duração média dos contatos em segundos (YACUBIAN-FERNANDES et al.); distância média entre machos e fêmeas durante os contatos (DiC). O número de tentativas de cópula dos machos (TC) foi avaliado por observação humana dos vídeos, e a velocidade natatória dos machos isolados foi também quantificada pelo software Smart. Após a interação entre os casais, fêmeas pareadas com machos controle e LA foram mantidas isoladas em aquários por 90 dias para quantificação do sucesso de impregnação (SI) e do número de juvenis produzidos (NJP). Machos dos tratamentos EECT, EE10, EE100 e LA foram sacrificados e a quantidade de vitelogenina no fígado foi avaliada indiretamente por método histoquímico para coloração de fosfoproteínas. As análises cromatográficas indicaram a presença dos estrogênios estriol (E3), estrona (E1), EE2 e estradiol (E2), e de bisfenol A (BPA) nas concentrações médias de 31,8; 19,5; 11,9; 8,6; e 4,2 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente, nas águas do CEBP, típicas de áreas urbanas contaminadas por esgotos domésticos. Machos expostos ao EE2 e provenientes da Lagoa do Araçá apresentaram indução de vitelogenina ( $p < 0,05$ ). O número de contatos entre machos e fêmeas, e número de tentativas de cópula dos machos diminuiu nos casais em EE100 e LA ( $p < 0,05$ ). A distância média entre machos e fêmeas durante os contatos aumentou em EE100 e LA ( $p < 0,05$ ). Machos isolados expostos a EE10 e EE100 apresentaram hiperatividade natatória, enquanto machos provenientes de LA apresentaram hipoatividade natatória comparado aos controles. Machos de LA impregnaram 55% das fêmeas, enquanto machos controle impregnaram 88% das fêmeas. Fêmeas pareadas com machos controle (FeCt) produziram 7,1 juvenis em média, enquanto fêmeas pareadas com machos de LA (FeLA) produziram 2,7 juvenis ( $p = 0,019$ ), totalizando 57 juvenis produzidos por FeCt versus 14 juvenis produzidos por FeLA, o que representa uma redução de 75% na geração de potenciais recrutas para a população.

No segundo tema deste trabalho, machos e fêmeas adultos cultivados no laboratório foram mantidos isolados e ambos machos e fêmeas foram expostos por 30 dias ao herbicida atrazina nas concentrações 0 (controle-ATCT), 0,5  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (AT0,5); 5  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (AT5) e 50  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (AT50).

Após a exposição, casais foram formados para cada tratamento, e o comportamento sexual foi analisado para o parâmetro TC por observador humano. A atividade natatória de machos e fêmeas mantidos isolados também foi avaliada. Após a exposição e pareamento dos casais, fêmeas de cada tratamento foram mantidas isoladas em aquários por 90 dias, para quantificação do número de ovócitos maduros (NO), e dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (Webb and Weihs). Os parâmetros NO, IGS e IHS para as fêmeas não foram alterados significativamente. Nos casais expostos a atrazina foi observada uma redução em TC na concentração de 5 ( $p > 0,05$ ) e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). Hiperatividade natatória foi detectada nas fêmeas expostas a todas concentrações, e em machos expostos a 5 ( $p > 0,05$ ) e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). Este estudo quantifica pela primeira vez CDEs estrogênicos em águas da região metropolitana de Recife, e demonstra o efeito de desreguladores endócrinos como o EE2 em laboratório, bem como os efeitos de uma mistura ambiental de contaminantes incluindo CDEs estrogênicos, em biomarcadores bioquímicos, comportamentais e reprodutivos de *Poecilia vivipara*, que podem afetar a viabilidade populacional em situações ambientalmente realistas.

**Palavras-chave:** *Poecilia vivipara*; desreguladores endócrinos; estrógenos; cromatografia líquida; vitelogenina; comportamento sexual; fecundidade; fertilidade



## ABSTRACT

Endocrine disruptor compounds (EDCs) contaminate aquatic ecosystems and are able to mimic the action of endogenous hormones in fish. Therefore, this study first evaluated the effects of adult male *Poecilia vivipara* exposure to an environmental mixture of contaminants with estrogenic activity and to the EDC 17 $\beta$ -ethinylestradiol (EE2), involving the chemical analysis of estrogenic molecules in the environmental mixture, and biochemical, behavioral and reproductive parameters. Molecules with estrogenic activity were quantified by liquid chromatography with mass spectrometry in the waters of Lagoa do Araçá (LA) and the Capibaribe River (CR), in the Pina Basin estuarine complex (PBEC), metropolitan area of Recife. Laboratory grown adult male *P. vivipara* were exposed for 14 days to a clean water control (EECT) and to 10 ngEE2 L<sup>-1</sup> (EE10) and 100 ngEE2 L<sup>-1</sup> (EE100). In parallel, resident adult males in the PBEC were collected in LA, and brought to the laboratory. Males exposed to EE2 in the laboratory and residents of PBEC were placed in contact with adult females grown in the laboratory, and the couples were monitored by a video system, with subsequent quantitative assessment of sexual behavior by behavioral analysis software Smart. The parameters evaluated were: number of contacts between males and females (NC); average duration of contacts in seconds (YACUBIAN-FERNANDES et al.); average distance between males and females during the contacts (DiC). The number of male copulation attempts (Lichota et al.) was assessed by human observation of the videos, and swimming speed of single males was also quantified by the Smart software. After the interaction between couples, females paired with control and LA males were kept isolated in tanks for 90 days to quantify the impregnation success (IS) and the number of juveniles produced (NJP). Males of treatments EECT, EE10, EE100 and LA were sacrificed and the amount of vitellogenin in the liver was assessed indirectly by a histochemical staining method for phosphoproteins. Chromatographic analysis indicated the presence of estrogens estriol (E3), estrone (E1), EE2 and estradiol (E2), and bisphenol A (BPA) in concentrations averaging 31.8; 19.5; 11.9; 8.6; and 4.2 ng L<sup>-1</sup>, respectively, in PBEC waters, typical of urban areas contaminated by domestic sewage. Males exposed to EE2 and from Lagoa do Araçá showed vitellogenin induction ( $p < 0.05$ ). The number of contacts between males and females, and the number of male copulation attempts decreased in couples from EE100 and LA ( $p < 0.05$ ). The average distance between males and females during the contacts increased at EE100 and LA ( $p < 0.05$ ). Isolated males exposed to EE10 and EE100 developed swimming hyperactivity, while males from LA developed swimming hypoactivity compared to controls. LA males impregnated 55% of females, while control males impregnated 88% of females. Females paired with control males (FeCt) produced 7.1 juveniles on average, while females paired with LA males (FeLA) produced 2.7 juveniles ( $p = 0.019$ ), totaling 57 juveniles produced by FeCt versus 14 juveniles produced by FeLA, which represents a 75% reduction in the generation of potential recruits for the population. In the second theme of this work, adult males and females grown in the laboratory were kept isolated and both males and females were exposed for 30 days to atrazine concentrations 0 (control-ATCT), 0.5 g L<sup>-1</sup> (AT0.5); 5 g L<sup>-1</sup> (AT5) and 50 g L<sup>-1</sup> (AT50). After exposure, couples were formed for each treatment, and sexual behavior was analyzed for MCA by a human observer. Swimming activity of isolated males and females was also evaluated. After exposure and pairing of couples, females from each treatment were kept isolated in tanks for 90 days, to quantify the

number of mature oocytes (NO), and the Gonadosomatic index (GSI) and hepatosomatic index (HSI). The parameters NO, GSI and HSI for females did not change significantly. In couples exposed to atrazine a significant reduction in MCA was observed at concentrations 5 ( $p > 0,05$ ) and 50  $\text{g.L}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ). Hyperactive swimming was detected in females exposed to all concentrations, and in males exposed to 5 ( $p > 0.05$ ) and 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ). This study quantifies for the first time estrogenic EDCs in waters of the metropolitan area of Recife, and demonstrates the effect of endocrine disruptors such as EE2 in the laboratory, as well as the effects of an environmental mixture of contaminants including estrogenic EDCs, in biochemical, behavioral and reproductive biomarkers of *Poecilia vivipara*, which can affect population viability in environmentally realistic conditions.

**Palavras-chave:** *Poecilia vivipara*; endocrine disruptors; estrogens; liquid chromatography; vitellogenin; sexual behavior; fecundity; fertility

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura molecular do hormônio sintético 17  $\beta$ -etinilestradiol..... 12
- Figura 2:** Representação esquemática da principal via de entrada dos desreguladores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos, evidenciando o hormônio sintético 17  $\beta$ -etinilestradiol. Adaptado de (REIS FILHO et al., 2006)..... 14
- Figura 3.** Estrutura molecular e o nome segundo a IUPAC do herbicida atrazina (2- cloro-4-etilamino 6 isopropilamino-s-triazina)..... 15
- Figura 4.** Representação esquemática da sequência de processos que levam à síntese da Vitelogenina em fêmeas ovíparas de peixes. Adaptado de (REIS FILHO et al., 2006)..... 18
- Figura 5:** Níveis de organização biológica através dos quais os efeitos de um contaminante ambiental podem se propagar, indicando os níveis biológicos nos quais medidas classificadas como biomarcadores e bioindicadores podem ser quantificadas..... 21
- Figura 6:** Cortes histológicos de fígado da espécie *Poecilia vivipara* apresentando a coloração histoquímica para fosfoproteínas no fígado. Ocorrência da coloração azul claro (painel F) indica presença de fosfoproteínas no tecido. Em A - macho controle; B ó fêmea grávida (controle positivo); C ó macho exposto a 10 ng L<sup>-1</sup> 17  $\beta$ -etinilestradiol (EE2); D ó macho exposto a 100 ngL<sup>-1</sup> de EE2 e E ó macho da Lagoa do Araçá (exposto ambientalmente à mistura de contaminantes)..... 39
- Figura 7:** Número de pixels de coloração azul clara (média  $\pm$  desvio padrão) nas seções de fígado analisadas de machos de *Poecilia viviparam* mantidos em água limpa (controle negativo), fêmeas grávidas (controle positivo), machos expostos em laboratório a concentrações de 10 ngL<sup>-1</sup> e 100 ngL<sup>-1</sup> do hormônio 17  $\beta$ -etinilestradiol durante 14 dias, e de machos coletados na Lagoa do Araçá. O asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em comparação com os controles por ANOVA (ANOVA,  $F_{4,20} = 16,1$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ). Letras a e b indicam diferença estatística relativa ao controle por teste T student,  $p < 0,05$ ).....40
- Figura 8:** Média do número de contatos (média  $\pm$  desvio padrão) entre casais (macho e fêmea) da espécie *Poecilia vivipara* expostos em laboratório as concentrações de 10 ngL<sup>-1</sup> e 100 ngL<sup>-1</sup> do hormônio 17  $\beta$ -etinilestradiol durante 14 dias, e trazidos do campo (Lagoa do Araçá, machos ambientalmente expostos a mistura de contaminantes). O asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{3,80} = 3,38$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ )..... 41
- Figura 9:** Duração média de contato (média  $\pm$  desvio padrão) entre casais (macho e fêmea) da espécie *Poecilia vivipara* expostos em laboratório as concentrações de 10 ngL<sup>-1</sup> e 100 ngL<sup>-1</sup> do

hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias e trazidos do campo (Lagoa do Araçá, machos ambientalmente expostos a mistura de contaminantes) (ANOVA,  $P = 0,408$ )..... 42

**Figura 10:** Distância de contato (média  $\pm$  desvio padrão) entre casais (macho e fêmea) da espécie *Poecilia vivipara* expostos em laboratório as concentrações de  $10 \text{ ngL}^{-1}$  e  $100 \text{ ngL}^{-1}$  do hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias e trazidos do campo (Lagoa do Araçá, machos ambientalmente expostos a mistura de contaminantes). O asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{3,62} = 5,70$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ )..... 43

**Figura 11:** Tentativas de cópula por minuto (média  $\pm$  desvio padrão) entre casais (macho e fêmea) da espécie *Poecilia vivipara* expostos em laboratório as concentrações de  $10 \text{ ngL}^{-1}$  e  $100 \text{ ngL}^{-1}$  do hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias e trazidos do campo (Lagoa do Araçá, machos ambientalmente expostos a mistura de contaminantes). Tempo total de análise foi 25 minutos. O asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{3,68} = 3,50$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ )..... 44

**Figura 12:** Velocidade média de natação de machos expostos a concentrações de  $10 \text{ ngL}^{-1}$  e  $100 \text{ ngL}^{-1}$  do hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias, ou coletados na Lagoa do Araçá. Asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em comparação com os controles (ANOVA,  $F_{3,56} = 24,8$ ,  $p < 0,001$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ )..... 46

**Figura 13:** Número de filhotes nascidos (média  $\pm$  desvio padrão) de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara* grávidas do grupo Controle e do grupo Lagoa do Araçá. O asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (Teste T,  $t = 2,574$   $p = 0,019$ ;  $N = 10$ )..... 48

**Figura 14:** Tentativas de Cópula por minuto (média  $\pm$  desvio padrão), entre os casais (macho e fêmea) de *Poecilia vivipara*, expostos a diferentes concentrações,  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 14 dias (A) (ANOVA,  $F_{3,27} = 3,66$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ) e 30 dias (B) (ANOVA,  $P = 0,887$ ). O asterisco (\*) em 14A indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle. Tempo total de análise foi 25 minutos..... 63

**Figura 15:** Número de ovócitos maduros (média  $\pm$  desvio padrão), de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara*, expostas a diferentes concentrações,  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 30 dias (ANOVA,  $P = 0,684$ )..... 64

**Figura 16:** Velocidade de Natação (média  $\pm$  desvio padrão) de indivíduos machos da espécie *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações,  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 14 dias (A) e 30 dias (B). O asterisco (\*) em 16A indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{4,35} = 2,63$ ,  $p < 0,05$ ; Dunn,  $p < 0,05$ )..... 66

**Figura 17:** Velocidade de Natação (média  $\pm$  desvio padrão) de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara* expostas a diferentes concentrações,  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 14 dias (A) e 30 dias (B). O asterisco (\*) em 17A indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{4,34} = 5,31$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ )..... 68

**Figura 18:** Índice Gonadosomático (média  $\pm$  desvio padrão), de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara*, expostas a diferentes concentrações,  $0,5\mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0\mu\text{gL}^{-1}$  e  $50\mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 30 dias (ANOVA,  $P = 0,704$ )..... 69

**Figura 19:** Índice Hepatosomático (média  $\pm$  desvio padrão), de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara*, expostas a diferentes concentrações,  $0,5\mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0\mu\text{gL}^{-1}$  e  $50\mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 30 dias (ANOVA,  $P = 0,613$ )..... 70

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** ó Percentual de acerto do número de tentativas de cópula quantificadas pelo observador humano e confirmadas pela detecção de contatos automaticamente pelo software Smart..... 45

**Tabela 2** ó Sucesso na impregnação de fêmeas por machos do controle e da Lagoa do Araçá, média do número de juvenis gerados, e número total de juvenis gerados nos tratamentos controle e Lagoa do Araçá..... 48

**Tabela 3** ó Concentração em  $\text{ngL}^{-1}$  de estrógenos (17 $\beta$ -etinilestradiol - EE2, Estrona - E1, Estradiol ó E2, e Estriol ó E3) e bisfenol-A, quantificados em águas superficiais no Complexo Estuarino da Bacia do Pina e rio Capibaribe. ND ó não detectado. LA: Lagoa do Araçá; CBSP: rio Capibaribe em frente ao Sport Clube; CBPI: Pier do Iate Clube Casa de banho no Porto de Recife; CBCX: rio Capibaribe na ponte sobre a Avenida Caxangá. Valores em réplicas das amostras coletadas..... 49

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CBCX:** rio Capibaribe na ponte sobre a Avenida Caxangá

**CBPI:** Pier do Iate Clube Casa de banho no Porto de Recife

**CBSP:** rio Capibaribe em frente ao Sport Clube

**CDEs:** Compostos Desreguladores Endócrinos

**CEBP:** Complexo estuarino da Bacia do Pina

**CONAMA:** Conselho nacional do Meio ambiente

**CT:** Grupo Controle

**E1:** Estrona

**E2:** 17 -estradiol

**E3:** Estriol

**EE10:** 10 ng EE2 L<sup>-1</sup>

**EE100:** 100 ng EE2 L<sup>-1</sup>

**EE2:** 17 -etinilestradiol

**IGS:** Índice Gonadossomático

**IHS:** Índice Hepatossomático

**LA:** Lagoa do Araçá

**RC:** Rio Capibaribe

**VTG:** vitelogenina

## SUMÁRIO

I.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	10
I.1	Ecotoxicologia.....	10
I.2	Compostos Desreguladores Endócrinos (CDEs) .....	11
I.2.1.	17 -etinilestradiol.....	11
I.2.2.	Atrazina .....	14
I.3	Parâmetros de avaliação Ecotoxicológica.....	16
I.3.1.	Biomarcadores Bioquímicos .....	16
I.3.2.	Biomarcadores Comportamentais.....	19
I.4	Peixes como modelos para avaliação de efeitos comportamentais de compostos desreguladores endócrinos .....	21
I.4.1.	Peixes poecilídeos como modelos para avaliação de efeitos comportamentais de compostos desreguladores endócrinos.....	23
I.4.2.	Poecilia vivipara como modelo experimental para avaliação de CDEs .....	24
I.2	OBJETIVOS .....	26
I.2.1	Geral .....	26
I.2.2	Específicos .....	26
II.	CAPÍTULO 1: Comportamento e reprodução de machos de Poecilia vivipara expostos a estrógenos em laboratório e em campo .....	28
II.1	INTRODUÇÃO .....	28
II.2	METODOLOGIA .....	31
II.2.1	Obtenção dos organismos teste.....	31
II.2.2	Preparo da solução de 17 -esthinilestradiol e exposição dos machos cultivados no laboratório .....	32
II.2.3	Análises comportamentais reprodutivas dos casais .....	32
II.2.4	Sucesso na impregnação de fêmeas, e produção de juvenis recém-nascidos vivos....	34
II.2.5	Análise histoquímica de fosfatos no fígado como indicador de vitelogenina .....	34
II.2.6	Coleta e análise química de moléculas estrogênicas na água .....	35
II.2.8	Análise estatística.....	37
II.3	RESULTADOS .....	38
II.3.1.	Análise histoquímica .....	38
II.3.2	Análises comportamentais reprodutivas dos casais .....	41
II.3.2.1.	Número de Contatos .....	41
II.3.2.2	Duração média dos contatos.....	42
II.3.2.3.	Distância média por contato.....	43
II.3.2.4.	Tentativa de cópula por minuto.....	44
II.3.2.5.	Comparação entre o número de tentativas de cópula detectados por observador humano e o número de contatos detectados automaticamente.....	45



[illegible]

# I. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## I.1 Ecotoxicologia

O crescimento populacional verificado nas últimas décadas, aliado ao avanço tecnológico e ao aumento na geração de produtos industriais, inclusive fertilizantes, inseticidas, substâncias farmacêuticas, etc, tem elevado significativamente a concentração de compostos xenobióticos no ecossistema aquático. Em 1962, com a publicação do livro *Primavera Silenciosa*, de Rachel Carson, os problemas causados ao meio ambiente começaram a ser reconhecidos e discutidos pela sociedade. Diante de tal impacto, em 1969 foi sugerido pela primeira vez, por René Truhaut, o termo Ecotoxicologia, que vem sendo utilizado até os dias de hoje em estudos de biomonitoramento ambiental (TRUHAUT, 1977; ROMÉO and GIAMBÉRINI, 2013).

A Ecotoxicologia surge como uma ciência multidisciplinar, que engloba conceitos tanto da Ecologia como da Toxicologia, e pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos deletérios causados por contaminantes químicos em organismos (animais e vegetais) do ecossistema de forma não intencional. Segundo Paracelsus, o pai da toxicologia, a dose é que faz o veneno, e é nesse conceito que o principal paradigma da Ecotoxicologia (paradigma dose-resposta) se baseia, ou seja, na relação que existe entre a dose que um ser vivo é exposto a um poluente e a resposta que este pode ocasionar (WALKER et al., 2005; MAGALHÃES and FERRÃO FILHO, 2008).

Testes ecotoxicológicos para avaliação da toxicidade de poluentes aquáticos em ecossistemas naturais têm sido padronizados e baseados em exposição de curta duração (aguda) ou longa duração (crônica), sendo que as respostas avaliadas nestes testes podem ser a mortalidade ou uma enorme variedade de alterações biológicas subletais (BERTOLETTI, 2009). Recentemente, testes que avaliam efeitos subletais têm sido amplamente utilizados pela grande maioria dos pesquisadores da área ecotoxicológica. Efeitos subletais podem ser baseados em parâmetros a nível subcelular como os bioquímicos, que por sua vez podem desencadear alterações em níveis biológicos superiores, potencialmente alterar o desempenho ecológico dos indivíduos, prejudicando sua existência ou a de sua população no meio em que vivem (BREWER et al., 2001).

## **I.2 Compostos Desreguladores Endócrinos(CDEs)**

Diversos produtos químicos de uso doméstico e de fontes industriais têm o potencial de perturbar o desenvolvimento sexual e a reprodução de uma ampla gama de espécies animais. Ultimamente tem havido um grande interesse científico nestas substâncias químicas que são capazes de alterar uma ou mais funções do sistema endócrino, bem como a sua estrutura, causando efeitos adversos tanto sobre um organismo e sua descendência, como em populações ou subpopulações de organismos. Estas substâncias são chamadas de compostos desreguladores endócrinos (CDEs) (EDSTAC, 1998). Esses são definidos segundo alguns autores como sendo um grupo de substâncias que interagem diretamente com os sítios receptores de hormônios causando desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino (MCLACHLAN, 1980; JOBLING et al., 1998; EDSTAC, 1998).

O sistema endócrino é o sistema responsável pela comunicação química do corpo, e este é constituído por combinações de glândulas e hormônios que são responsáveis pela regulação de algumas funções biológicas como: a homeostase dos fluidos corporais, controle do estresse, reprodução e fertilidade, sendo essas últimas, umas das mais importantes para a perpetuação das espécies (KIME, 1998). Quanto ao mecanismo de ação e aos efeitos que podem causar no sistema endócrino, os CDEs podem ser classificados em: estrogênicos (competem com o estradiol pelos receptores de estrogênio e produzem efeitos de feminização no organismo), androgênicos (competem com a diidrotestosterona pelos receptores de androgênio e produzem efeitos de masculinização), antiestrogênico (ligam-se aos receptores de estrogênio inativando-os) e antiandrogênico (ligam-se aos receptores de androgênio inativando-os) (GHISELLI and JARDIM, 2007).

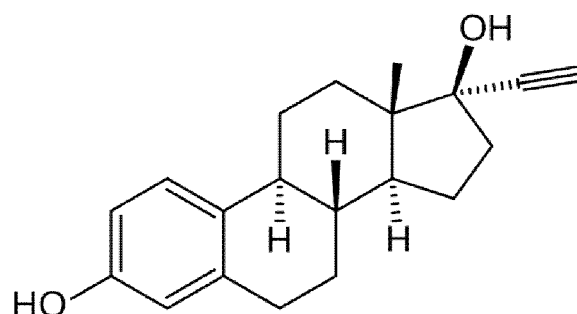
Para avaliar o risco potencial destas substâncias é importante a sua detecção e quantificação nos ecossistemas aquáticos. Entretanto, essa detecção torna-se uma tarefa difícil devido a baixa concentração na qual estes contaminantes se encontram presentes no ambiente aquático (BILA and DEZOTTI., 2007; CHAMBEL, 2011).

### **I.2.1. 17 -etinilestradiol**

Dentre uma gama de CDEs (pesticidas, bisfenol A, bifenilas policloradas, etc.), uma preocupação recente tem se concentrado nos estrogênios sintéticos, tendo em vista que quando presentes no ambiente são capazes de mimetizar a ação dos hormônios

ocupando o seu lugar ou até mesmo antagonizar a ação e o padrão de síntese desses hormônios (BILA and DEZOTTI., 2007; ESCUDERO, 2010). Os estrogênios sintéticos são esteróides que tiveram suas estruturas moleculares alteradas como o Mestranol, levonorgestrel, dietilstilbestrol, sendo compostos sintetizados para agirem diretamente no sistema endócrino, por isso possuem um alto potencial estrogênico. Dentre os estrogênios sintéticos, o 17 -etinilestradiol (EE2) (Figura 1) tem despertado maior preocupação, tanto pela potência como pela introdução contínua do mesmo no ambiente, uma vez que se trata de um hormônio sintético que foi desenvolvido para uso médico em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos.

**Figura 1.** Estrutura molecular do hormônio sintético 17 -etinilestradiol.



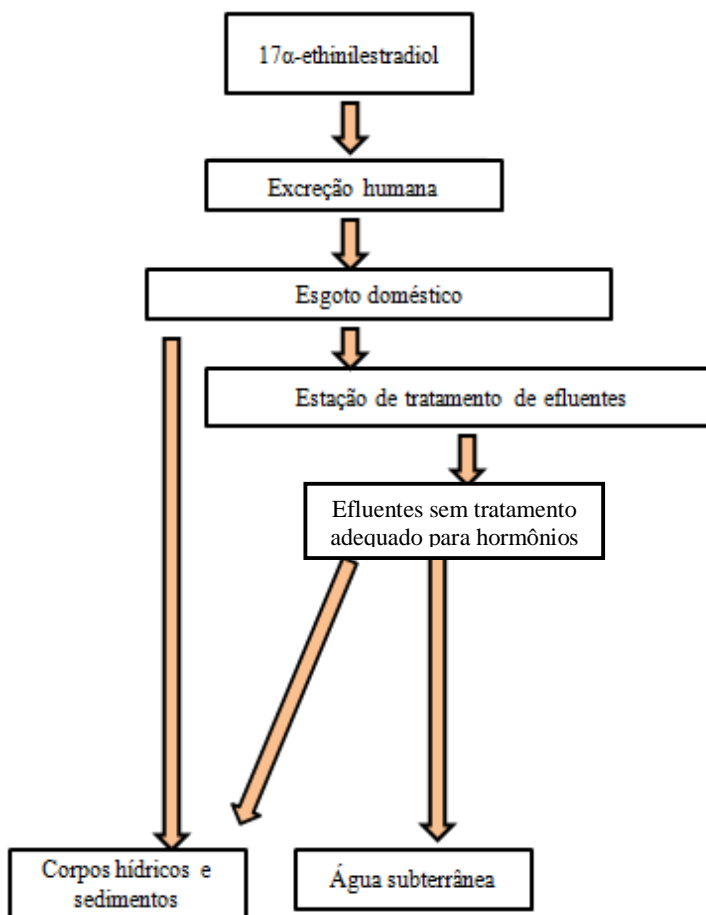
O monitoramento da presença desses estrogênios no meio ambiente tem sido realizado em uma grande variedade de estudos em todo o mundo. Os hormônios excretados através da urina e fezes, principalmente pelas mulheres, seguem para a rede coletora e depois entram no ambiente (Figura 2). O EE2 é encontrado em efluentes de estações de tratamento de esgoto em concentrações que podem atingir  $7 \text{ ngL}^{-1}$  no Reino Unido (DESBROW et al., 1998), e até  $42 \text{ ngL}^{-1}$  em efluentes de estações de tratamento no Canadá (YING et al., 2002). No Brasil, a portaria 2914 do Ministério da saúde, de 12 de dezembro de 2011, define os padrões de qualidade da água para consumo humano. Porém, nesta portaria não há previsão de análise dos CDEs como os hormônios, e estes usualmente não são analisados nas estações de tratamento de água ou de esgoto. Estudos de remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgoto brasileiras são raros e dispersos, porém, já existem algumas iniciativas que tentam monitorar e até mesmo remover esses interferentes endócrinos dos efluentes brasileiros (TERNES et al., 1999; LIMA et al., 2014).

As concentrações encontradas em rios ou até mesmo nas estações de tratamento variam consideravelmente, dependendo da proximidade de zonas urbanas ou do aporte de efluentes que a estação de tratamento recebe diariamente. Em efluentes de esgoto doméstico do Rio de Janeiro, por exemplo, foi verificada uma concentração de EE2 igual a  $21 \text{ ngL}^{-1}$ . Já numa estação de tratamento de efluentes localizada na região metropolitana de Campinas essa concentração de EE2 chegou a  $5000 \text{ ngL}^{-1}$  (TERNES et al., 1999; GHISELLI, 2006).

Os efluentes contêm, além de EE2, misturas de outros estrogênios como o estrogênio natural  $17\text{-estradiol}$  (E2), e possivelmente outros contaminantes com ação estrogênica. A soma do potencial estrogênico presente em amostras de água de rios expressa em equivalentes do estrogênio natural  $17\text{-estradiol}$  (E2) pode chegar a  $147 \text{ ngE2 L}^{-1}$  em efluentes e a  $17 \text{ ngE2 L}^{-1}$  em águas superficiais, sendo que  $5 \text{ ngEE2 L}^{-1}$  tem sido detectado em águas superficiais (KIDD et al., 2007).

O  $17\text{-etinilestradiol}$  (EE2) apresenta meia-vida relativamente longa (até 17 dias), quando comparado aos demais estrogênios (estradiol e estrona de 2 a 3 dias), baixa fotodegradação e incapacidade de ser removido completamente pelas tecnologias convencionais nos processos de tratamento de água e esgoto, se tornando assim um problema generalizado em ambientes aquáticos (JURGENS et al., 2002; ATKINSON et al., 2011). Diversos estudos relatam a potência que esse estrogênio apresenta, e mostram que o mesmo é capaz de interferir na fisiologia reprodutiva (LARSSON et al., 1999), no comportamento sexual (KRISTENSEN et al., 2005), e podendo inclusive gerar consequências a nível populacional para peixes (KIDD et al., 2007).

**Figura 2:**Representação esquemática da principal via de entrada dos desreguladores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos, evidenciando o hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Adaptado de (REIS FILHO et al., 2006).



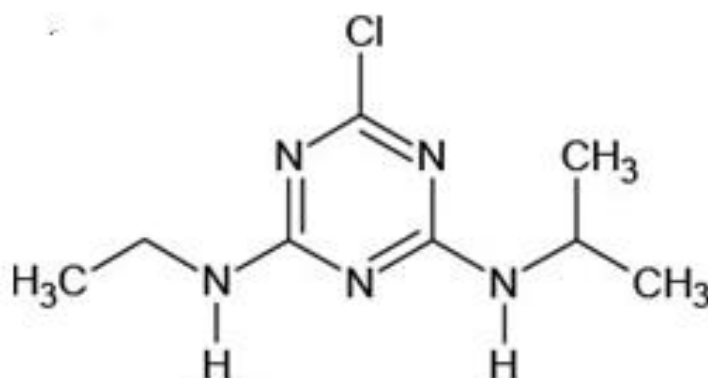
### I.2.2. Atrazina

A utilização de agrotóxicos e sua aplicação pela comunidade rural e urbana tornaram-se um fator preocupante, pois, nem sempre os usuários desses defensivos agrícolas fazem seu preparo e seu uso de maneira correta (VEIGA, 2007; FARIA, 2009). Os herbicidas são os tipos de agrotóxicos mais utilizados mundialmente, sendo amplamente empregados na agricultura, confecção de jardins e principalmente no controle de plantas daninhas. Ambientes terrestres e aquáticos são poluídos constantemente por esses produtos agrícolas, que por sua vez, acabam contaminando as

cadeias alimentares e exibindo efeitos tóxicos tanto em animais como na própria população humana (BRINGOLF et al., 2004; VASANTH et al., 2015).

A Atrazina (2- cloro-4-etilamino 6 isopropilamino-s-triazina) (Figura 3), introduzida mundialmente na década de 1950, tem sido nos últimos anos um dos herbicidas mais utilizados na agricultura. Isso se deve a sua eficiência, tendo em vista que ela atua inibindo a fotossíntese pelo bloqueio do transporte de elétrons no fotossistema II, e ao seu baixo custo quando comparado aos demais herbicidas. Atualmente encontra-se incluída na lista de substâncias prioritárias a serem reavaliadas nos Estados Unidos, devido à sua alta mobilidade, persistência no ambiente e toxicidade para espécies de vida selvagem (GRAYMORE et al., 2001; SHINN et al., 2015).

**Figura 3.** Estrutura molecular e o nome segundo a IUPAC do herbicida atrazina (2- cloro-4-etilamino 6 isopropilamino-s-triazina).



No Brasil, a portaria 2914 do Ministério da saúde, de 12 de dezembro de 2011, estabelece uma concentração máxima de atrazina em água potável de 2,0 µg/L. O limite máximo aceitável de concentração do herbicida atrazina também foi definido na Resolução 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA, o qual dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (CONAMA, 2005). Embora essa lei esteja em vigor, ainda não há um monitoramento eficiente das concentrações e da presença desse herbicida nas águas superficiais e subterrâneas. Logo, ainda há inúmeras lacunas quanto aos prejuízos que o mesmo pode trazer à saúde

da biota e dos seres humanos, que são afetados indiretamente por esse composto (ZANINI, 2010).

Apesar de sua proibição na Europa e reavaliação para possível relicenciamento nos Estados Unidos, a atrazina ainda é bastante utilizada em outros países e, por sua natureza resistente, ela vem sendo frequentemente detectada em sedimentos e águas superficiais (WU et al., 2009; SUN et al., 2010; MANDIKI et al., 2014). A atrazina tem sido considerada um composto desregulador endócrino (CDE), chegando a causar efeitos adversos sobre a função reprodutiva em algumas espécies aquáticas, principalmente alterações nos níveis de hormônios sexuais e anormalidades gonadais (TYLER et al., 1998; GRAYMORE et al., 2001; SHENOY, 2012; BARTELL et al., 2013). Segundo FAN et al. (2007), HAYES (2005) e SALABERRIA et al. (2009), a atrazina é capaz de induzir a aromatização da testosterona em estradiol, causando um efeito estrogênico nos indivíduos expostos. Porém, embora esses estudos tenham demonstrado esse efeito feminizante da atrazina em anfíbios e peixes, ainda existe um número muito grande de estudos com resultados ambíguos e contraditórios, que acabam contribuindo para evitar mudanças de política em relação ao uso deste pesticida (PAPOULIAS et al., 2014).

Os efeitos desse herbicida no comportamento reprodutivo de peixes Poecilídeos ainda é pouco conhecido, aparecendo apenas alguns trabalhos como SHENOY (2012), relatando que a exposição prolongada à atrazina reduziu a expressão de dois sinais comportamentais importantes em machos de *Poecilia reticulata*: da área de manchas laranja (importante na ornamentação) e do número de displays sigmóides (comportamento de corte dos machos) realizados. Porém, sabe-se que a atrazina é capaz de causar uma redução na fecundidade das fêmeas em *Pimephales promelas* (TILLITT et al., 2010), bem como alterações no comportamento de natação explosiva e de grupo em *Carassius auratus* (Goldfish), que embora não sejam comportamentos essencialmente reprodutivos, são necessários para o sucesso reprodutivo (SOLOMON et al., 2008).

### **I.3 Parâmetros de avaliação Ecotoxicológica**

#### **I.3.1. Biomarcadores Bioquímicos**

A entrada de um composto químico contaminante no metabolismo dos organismos expostos pode provocar alterações em diversos níveis biológicos, como alterações de vias metabólicas ao nível subcelular, alterações morfológicas e

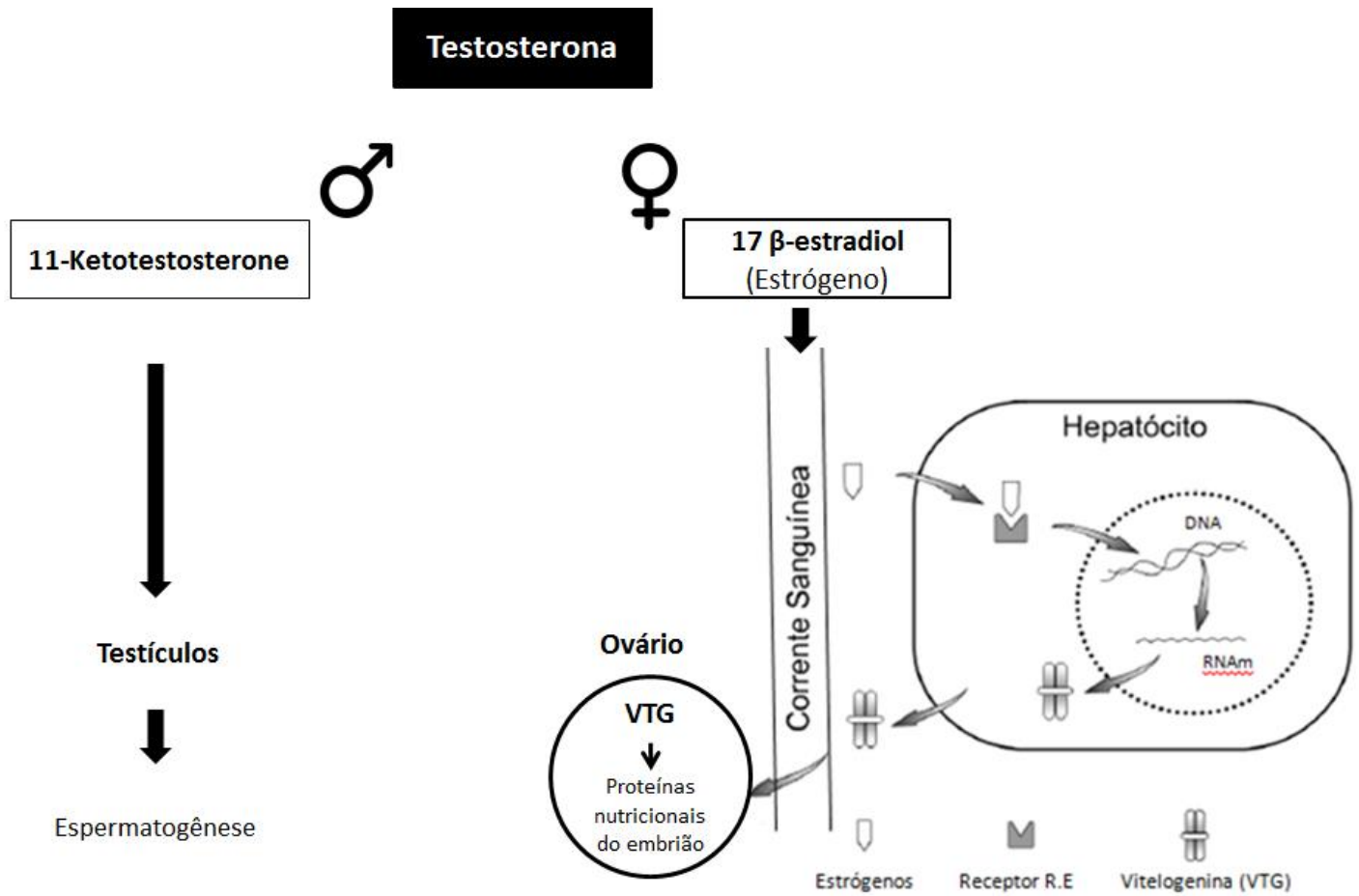


fisiológicas ao nível de tecidos e órgãos, e nos padrões comportamentais de indivíduos. Medidas feitas nestes níveis de organização biológica são classificadas como biomarcadores (JESUS and CARVALHO, 2008; SOUZA and CARVALHO, 2009). A utilização de parâmetros bioquímicos como biomarcadores tem sido amplamente testada com relação a suas respostas aos CDEs, tendo em vista que alterações bioquímicas precedem um dano estrutural às células, permitindo a identificação precoce de uma exposição excessiva a determinado composto (AMORIM, 2003).

Biomarcadores bioquímicos são capazes de relacionar o contaminante ao efeito a nível subcelular, mais precisamente. Entretanto, nem sempre essas alterações bioquímicas estão associadas a efeitos em níveis biológicos superiores, não permitindo avaliar de fato o que estas alterações acarretarão na sobrevivência do indivíduo (CORREIA et al., 2007). Um exemplo de biomarcador bioquímico que vem sendo bastante utilizado com esse propósito é a vitelogenina (VTG), uma proteína presente no plasma sanguíneo e que desempenha importante papel no sistema reprodutivo de fêmeas ovíparas.

Em peixes, a testosterona é o precursor de dois hormônios: 11-Ketotestosterone (11-KT), produzido predominantemente nos testículos dos machos, e 17 $\beta$ -estradiol (E2), sintetizado principalmente pelos ovários das fêmeas. O E2 endógeno, na fêmea reprodutivamente ativa, estimula o fígado para produzir a vitelogenina, que é transportada através do sangue para os ovários, onde se acumula nos ovócitos em crescimento para ser utilizada como precursora de proteínas que servirão de reserva nutricional durante o desenvolvimento do embrião (Figura 4) (TYLER et al., 1991). Em machos a vitelogenina também está presente, mas apresenta uma concentração pouco expressiva. Entretanto, sua concentração no plasma (ou no fígado) pode se tornar elevada após a exposição de um determinado organismo a substâncias que apresentam atividade estrogênica (LINTELMANN et al., 2003; REIS FILHO et al., 2006). O 17 $\alpha$ -etilestradiol (EE2), um dos mais potentes e persistentes estrogênios presentes no ambiente, tem sido constantemente associado à feminização de peixes machos em rios que recebem águas residuais municipais. Esta feminização é caracterizada pela síntese de vitelogenina (VTG) pelos machos, que pode ser avaliada por ensaios moleculares, imunoquímicos e histoquímicos (VAN DER VEN et al., 2003; AERNI et al., 2004; HUTCHINSON et al., 2006; BRIAN et al., 2007; KIDD et al., 2007).

**Figura 4.** Representação esquemática da sequência de processos que levam à síntese da Vitelogenina em fêmeas ovíparas de peixes. Adaptado de (REIS FILHO et al., 2006).



### **I.3.2. Biomarcadores Comportamentais**

Testes de letalidade com exposição de curto prazo (agudos) ignoram a chamada morte ecológica, ou seja, mesmo que os animais não tenham morrido durante a exposição ao contaminante, eles podem se tornar incapazes de funcionar num contexto ecológico caso seu comportamento normal seja alterado, o que pode levar a sua morte por predação ou falta de alimento (SCOTT and SLOMAN, 2004). Mudanças no comportamento trazem informações diretas sobre as consequências que estes compostos podem ter no condicionamento individual do animal, por causa disso, recentemente tem havido grande desenvolvimento em relação à utilização de testes comportamentais em pesquisas toxicológicas, representando assim, uma fusão dos campos de comportamento, ecologia, toxicologia e biologia da conservação (LITTLE et al., 1985; ZALA and PENN, 2004; THORPE et al., 2009). Efeitos a nível individual podem por sua vez desencadear efeitos em níveis superiores de organização, como populações, comunidades e ecossistemas (Figura 5) (WALKER et al., 2005).

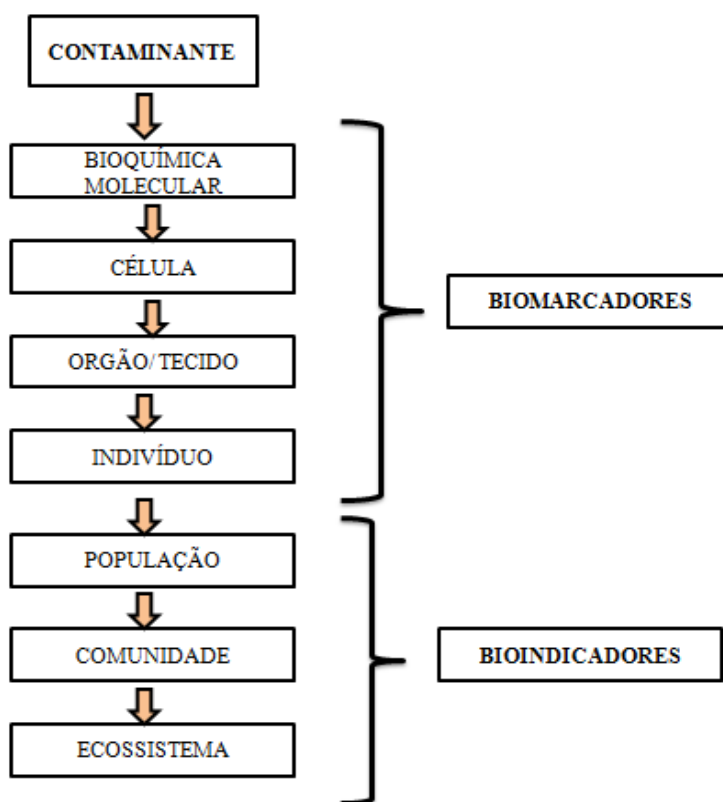
O comportamento oferece uma perspectiva única que liga a fisiologia e ecologia de um organismo, ao ambiente em que ele vive. Dessa forma o comportamento se resume a uma sequência de ações quantificáveis que permite um organismo se adaptar a estímulos externos e internos, a fim de melhor enfrentar o desafio de sobreviver num ambiente de constante mudança (LITTLE and BREWER, 2001; KANE et al., 2005). A utilização do comportamento como uma ferramenta para medir os efeitos da exposição a CDEs é relativamente recente, e isso se deve principalmente ao fato dos experimentos comportamentais serem mais trabalhosos e demorados, por sua avaliação geralmente ser feita por um observador humano, e também pelas dificuldades de repetição do mesmo, caso algo dê errado (ZALA and PENN, 2004; THORPE et al., 2009).

Alterações comportamentais representam um sistema integrado de resposta para todos os organismos. Estas respostas alteradas, por sua vez, podem estar associadas com a redução da aptidão e sobrevivência, resultando em consequências adversas ao nível da população. Parâmetros comportamentais que integram fatores endógenos e exógenos podem ligar os processos bioquímicos e fisiológicos com processos ecológicos, proporcionando um melhor conhecimento dos efeitos ao nível de indivíduo, e seu potencial de afetar populações e comunidades numa contaminação ambiental (BRIDGES, 1997; BREWER et al., 2001).

Ensaio comportamentais fornecem parâmetros biologicamente relevantes para avaliar a exposição subletal. Recentemente pesquisas começaram a se concentrar nos impactos que os CDEs e outros contaminantes ambientais provocam nos comportamentos complexos de peixes, como por exemplo, a interrupção de comportamentos associados ao forrageamento(KASUMYAN, 2001), fuga de predadores(KANE et al., 2005), hierarquias sociais e reprodução, tendo em vista que estes comportamentos são ambientalmente mais relevantes do que simples respostas a nível letal a alguns tóxicos(LITTLE et al., 1985; KASUMYAN, 2001; SCOTT and SLOMAN, 2004; KANE et al., 2005).

A atividade natatória espontânea se tornou um biomarcador comportamental bastante útil em estudos ecotoxicológicos devido a sua fácil avaliação e sensibilidade. Ela pode ser expressa considerando uma situação normal, onde o indivíduo nada e age normalmente, e a partir desta há um aumento (hiperatividade) ou diminuição (hipoatividade) dessa atividade, podendo conferir vantagens ou desvantagens para o indivíduo. Métodos de avaliação de natção espontânea e da velocidade natatória variam de medidas semi-quantitativas a quantitativas, com análises sofisticadas executadas por softwares específicos (LITTLE and FINGER, 1990; WEIS et al., 2001a).

**Figura 5:** Níveis de organização biológica através dos quais os efeitos de um contaminante ambiental podem se propagar, indicando os níveis biológicos nos quais medidas classificadas como biomarcadores e bioindicadores podem ser quantificadas.



#### **I.4 Peixes como modelos para avaliação de efeitos comportamentais de compostos desreguladores endócrinos**

Os peixes se tornaram modelos convenientes para estudos ecotoxicológicos comportamentais, tendo em vista que muitos dos seus comportamentos são facilmente observados e quantificados sob condições controladas (SCOTT and SLOMAN, 2004). Por sua inerente importância ecológica, tornaram-se organismos ideais para ensaios comportamentais avaliando efeitos reprodutivos de contaminantes por apresentarem as seguintes características: contato direto constante com o ambiente aquático onde a exposição química ocorre, relevância ecológica em muitos sistemas naturais, grande variedade de estratégias reprodutivas, e facilidade de cultivo (KANE et al., 2005;

MANRIQUE, 2009). Esses organismos atuam como importantes indicadores de potenciais efeitos de desregulação endócrina, principalmente aqueles ligados à fisiologia reprodutiva, pois, seu sistema reprodutivo é regulado por estrogênios similares aos dos mamíferos (JOHNS et al., 2011).

Estudos feitos com adultos de *Pomatoschistus minutus* (õsand gobiesõ) expostos a  $4 \text{ ngL}^{-1}$  de EE2 mostraram reduções na capacidade do macho em conquistar e manter o ninho e também na exibição dos comportamentos sexuais típicos da espécie (SAARISTO et al., 2009). Em outro estudo filhotes de Zebrafish (*Danio rerio*) foram expostos durante o período de diferenciação sexual (20-60 dias após a fertilização) a concentrações de  $2,76$  e  $9,86 \text{ ngL}^{-1}$  de EE2, e depois permitiu-se que os peixes crescessem até a idade adulta em água limpa. Como resultado foi observado que as fêmeas expostas a maior concentração do hormônio apresentaram uma redução da resposta ao comportamento de corte dos machos e também no sucesso reprodutivo (COE et al., 2010). SALIERNO and KANE (2009) observaram alterações significativas no comportamento reprodutivo de machos da espécie *Pimephales promelas* após exposição a  $40 \text{ ngL}^{-1}$  de EE2. Presença de vitelogenina e reduções na habilidade de competir com outros machos por substratos de desova, no índice gonadosomático e no número de tubérculos (estrutura indicadora de período reprodutivo) foram algumas dos efeitos observados nos machos nessa espécie. Já BAATRUP and HENRIKSEN (2015), expuseram machos de *D. rerio* até a idade adulta a concentrações de  $1$ ,  $3$  e  $10 \text{ ngL}^{-1}$  de EE2. Depois de pará-los com fêmeas não expostas, confirmou que o comportamento sexual dos machos não foi afetado pelo EE2, porém, surpreendentemente o composto alterou significativamente quase todos os elementos no comportamento de corte das fêmeas, apesar de não terem sido expostas ao EE2. Acredita-se que essa alteração tenha sido provocada provavelmente por diferenças na morfologia do macho, feromônios ou algum outro mecanismo não revelado.

Impactos dos CDEs nas populações de peixes selvagens é outro problema que recentemente vem sendo bastante abordado. Inúmeros estudos tem sido feito para avaliar os efeitos que essas substâncias lançadas diretamente em rios e lagos, na forma de rejeitos industriais e domésticos, tem na fisiologia, comportamento e reprodução desses animais. VAJDA et al. (2008), por exemplo, coletaram indivíduos da espécie *Catostomus commersoni*, a montante e a jusante de uma estação de tratamento de água residuais na cidade de Boulder, no Colorado. Como resultado eles observaram alterações consistentes nas gônadas (presença de intersex), histopatologias ovarianas e testiculares,

na proporção sexual e na indução de vitelogenina nos indivíduos capturados a jusante da estação de tratamento. Já JOBLING et al. (2006) confirmou através de um estudo de modelagem, que populações de indivíduos da espécie *Rutilus rutilus*, viventes em rios contaminados por estrogênios presentes em águas de esgoto tratado no Reino Unido, apresentavam uma alta taxa de intersex, sendo esta significativamente correlacionada com a presença dessas substâncias estrogênicas (17 $\beta$ -estradiol; 17 $\beta$ -etinilestradiol e estrona).

#### **I.4.1. Peixes poecilídeos como modelos para avaliação de efeitos comportamentais de compostos desreguladores endócrinos**

Uma das famílias de peixes mais utilizadas em estudos que avaliam mudanças no sucesso reprodutivo envolvendo CDEs é a Poeciliidae, destacando-se principalmente as espécies *Gambusia affinis*, *Gambusia holbrooki* e *Poecilia reticulata*. Para *Poecilia reticulata* o número de estudos relatando efeitos comportamentais causados por CDEs é relativamente amplo, envolvendo desde parâmetros bioquímicos (TIAN et al., 2012) a parâmetros reprodutivos (KRISTENSEN et al., 2005). BAATRUP and JUNG (2001) conduziram experimentos para investigar os efeitos de 3 compostos antiandrogênicos, o Vinclozolin, p,p'-DDE e a Flutamida no comportamento e desenvolvimento sexual de machos adultos expostos a concentrações de 0,1 e 100  $\mu$ g/g de ambos os compostos por 30 dias. Os três produtos químicos provocaram alterações profundas nos animais (a nível celular e de indivíduo), induzindo uma redução significativa no número de espermatozoides, na coloração sexual, no tamanho dos testículos e no comportamento de corte dos machos. Já BAYLEY et al. (1999) investigaram os efeitos do 17 $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) e Octilfenol (150  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) sobre o comportamento sexual de machos expostos durante quatro semanas. Embora não tenha sido observada diferença significativa na natação, o número de displays sexuais foi reduzido drasticamente nos machos expostos ao Octilfenol e completamente inibido nos machos expostos ao 17 $\beta$ -estradiol. A indução de vitelogenina em machos foi vista por TIAN et al. (2012), que expuseram indivíduos desde filhotes até a fase adulta ao pesticida Monocrotofós, por 90 dias. Além de induzir a produção de vitelogenina, esse pesticida também aumentou significativamente o nível de 17 $\beta$ -estradiol, acompanhado de uma diminuição do nível de testosterona, o que acabou resultando numa deficiência na produção de espermatozoides e no desenvolvimento dos testículos. KRISTENSEN et

al. (2005) expuseram apenas os machos (do nascimento até a fase adulta) a concentrações de 10, 50, e 200 ng L<sup>-1</sup> do hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol por 108 dias. Ao final foi observado uma redução significativa no número de espermatozoides e no comportamento de corte dos machos.

Estudos feitos relatando efeitos comportamentais e reprodutivos causados por CDEs com as espécies *Gambusia holbrooki* e *Gambusia affinis*, também tem sido bastante relatado. DOYLE and LIM (2005) expuseram juvenis machos de *Gambusia holbrooki* a concentrações de 20, 100 e 500 ngL<sup>-1</sup> de 17 $\alpha$ -estradiol durante 84 dias, e viram que o número de contatos e de tentativas de cópulas foram reduzidos significativamente em todas as concentrações. RAUT and ANGUS (2010) expuseram machos de *Gambusia affinis* a concentrações de 100, 200 e 350 nM de triclosan (agente antibactericida usado em indústrias de produtos de cuidado pessoal) por 35 dias. Nos indivíduos expostos a maior concentração de triclosan, eles observaram uma elevada expressão de vitelogenina e redução na quantidade de esperma. Já ANGUS et al. (2005) expuseram machos juvenis (durante o período de maturação) de *G. affinis*, através da dieta, a concentrações de 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5 e 10  $\mu$ gEE2 por grama de comida por 150 dias. Ao final, perceberam uma clara inibição do desenvolvimento gonopodial e uma alta presença de vitelogenina no sangue em todos os peixes expostos a concentração de 1 ou mais  $\mu$ gEE2 por grama de comida.

#### **1.4.2. *Poecilia vivipara* como modelo experimental para avaliação de CDEs**

A espécie *Poecilia vivipara* (Barrigudinho ou Guarú) Bloch & Schneider, 1801 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) é um peixe teleósteo euriliano (vive em águas com salinidades que variam de 0 a 28, chegando a 30 em laboratório) que vem sendo utilizado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática do CNPq para o desenvolvimento de metodologias de biomonitoramento de ambientes aquáticos, tendo em vista que esta apresenta uma distribuição cosmopolita na costa brasileira e uma grande capacidade adaptativa (AMARAL et al., 2001; FISHER et al., 2004).

Como os outros peixes da família Poeciliidae, o barrigudinho é uma espécie ovovivípara que está presente em todo litoral brasileiro, sendo frequentemente encontrado nas regiões costeiras pernambucanas (FISHER et al., 2004; PAIVA et al.,



2008). Essa espécie apresenta um sistema de acasalamento bem característico, comum aos peixes da família Poeciliidae, no qual os machos procuram continuamente uma fêmea receptiva e tentam fertilizá-la internamente por meio de uma nadadeira anal modificada, o chamado gonopódio. Porém, para que a fêmea torne-se receptiva, os machos desenvolvem uma postura de corte, na qual realizam comportamentos típicos, como por exemplo, o display sigmoide (macho orienta-se em frente da fêmea e realiza uma postura em forma de S ou C) e as investidas gonopodiais (macho se aproxima da fêmea por trás, move seu gonopódio para frente, e tenta colocá-lo na abertura genital da fêmea sem a sua cooperação), de modo a chamar a atenção da parceira, tendo em vista que a seleção sexual é em grande parte uma escolha da fêmea (ENDLER, 1987; EVANS et al., 2002).

Não foram encontrados trabalhos relacionando o impacto dos CDEs no comportamento reprodutivo ou outros parâmetros biológicos em *Poecilia vivipara*.

## I.2 OBJETIVOS

### I.2.1 Geral

Implementar no Laboratório de Ecotoxicologia aquática da UFPE métodos quantitativos de avaliação dos efeitos comportamentais e reprodutivos de contaminantes ambientais em peixes, utilizando como organismo modelo a espécie *Poecilia vivipara*.

### I.2.2 Específicos

- Realizar experimentos de exposição de machos da espécie *P. vivipara* cultivada em laboratório a diferentes concentrações do hormônio sintético 17 - etinilestradiol.
- Avaliar a presença de efeitos comportamentais e reprodutivos do hormônio 17 - etinilestradiol em machos sexualmente maduros da espécie, com base nos seguintes parâmetros relacionados ao processo de corte e cópula: 1) Número de contatos entre os animais; 2) duração de cada contato; 3) distância média entre os animais; 4) número de tentativas de cópula e 5) atividade natatória;
- Avaliar a presença dos efeitos comportamentais e reprodutivos listados acima em machos sexualmente maduros residentes na Lagoa do Araçá-PE, expostos a mistura ambiental de contaminantes, incluindo esgoto e potencialmente estrógenos presentes na região. Além destes parâmetros, avaliar 6) Sucesso de impregnação das fêmeas pelos machos e 7) número de juvenis gerados pelas fêmeas, comparando com os resultados obtidos dos machos controle cultivados em laboratório;
- Quantificar indiretamente através de análise histoquímica com coloração para detecção de fosfatos a presença da proteína Vitelogenina em fígado de machos de *P. vivipara* expostos a concentrações crescentes de 17 -etinilestradiol e a mistura ambiental;

- Quantificar a concentração de estrogênios e bisfenol A nas águas superficiais da Lagoa do Araçá e do rio Capibaribe por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS);
- Verificar se o software de análise de vídeos SMART (PanLab Harvard Apparatus, EUA) é eficiente quando comparado a um observador humano na detecção de interações próximas entre machos e fêmeas no processo de corte e na quantificação de tentativas de cópula por machos da espécie *Poecilia vivipara*.
- Realizar experimentos de exposição de machos e fêmeas cultivados em laboratório da espécie *P. vivipara* a diferentes concentrações do herbicida atrazina.
- Avaliar a presença de efeitos comportamentais e reprodutivos dose-dependentes do herbicida atrazina em machos e fêmeas da espécie, com base nos seguintes parâmetros reprodutivos: 1) número de tentativas de cópula; 2) Número de ovócitos maduros ou fecundados; 3) Índice hepatossomático; 4) Índice gonadossomático e 5) atividade natatória.

## II. CAPÍTULO 1: Comportamento e reprodução de machos de *Poecilia vivipara* expostos a estrógenos em laboratório e em campo

### II.1 INTRODUÇÃO

Diversos produtos químicos de uso doméstico e de fontes industriais que contaminam ecossistemas aquáticos são caracterizados como compostos desreguladores endócrinos (CDEs), substâncias que interagem diretamente com os sítios receptores de hormônios, causando desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino. Esta desregulação endócrina pode gerar efeitos adversos no desenvolvimento sexual e na reprodução de uma ampla variedade de espécies de vertebrados e invertebrados (BERGMAN et al., 2013). Estudos focados em peixes têm proporcionado informações relevantes sobre contaminantes ambientais que podem imitar ou antagonizar hormônios sexuais esteroides gonadais, causando efeitos na função reprodutiva de machos e fêmeas (JOBLING et al., 1998; KIME, 1998).

Uma significativa preocupação ambiental tem se concentrado nos estrogênios sintéticos como contaminantes, tendo em vista que quando presentes no ambiente são capazes de mimetizar a ação do estrogênio gonadal natural das fêmeas de teleósteos 17 -estradiol (E2), ocupando o seu lugar e gerando respostas bioquímicas e metabólicas típicas desses hormônios (KIME, 1998). O 17 -etinilestradiol (EE2) é um hormônio sintético que foi desenvolvido para uso médico em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos, e que tem sido detectado em ecossistemas aquáticos em todo o mundo. As concentrações encontradas em efluentes de estações de tratamento de esgoto doméstico variam consideravelmente, dependendo da proximidade de zonas urbanas ou do aporte de efluentes que a estação de tratamento recebe diariamente. Concentrações de EE2 em efluentes de estações de tratamento de esgoto de 7 ng.L<sup>-1</sup> foram encontradas no Reino Unido (DESBROW et al., 1998) e de 42 ng.L<sup>-1</sup> no Canadá (YING et al., 2002). Em efluentes de esgoto doméstico do Rio de Janeiro foi verificada uma concentração de EE2 igual a 21 ng.L<sup>-1</sup> (TERNES et al., 1999), enquanto que no rio Jundiaí, importante manancial de abastecimento público do estado de São Paulo, essa concentração de EE2 chegou a 310 ng.L<sup>-1</sup> (SODRÉ et al., 2007). Os efluentes contêm, além de EE2, misturas de outros estrogênios como o estrogênio natural 17 -estradiol (E2), e possivelmente outros contaminantes com ação estrogênica. O 17 -etinilestradiol (EE2) apresenta meia-vida relativamente longa de 17 dias, baixa fotodegradação e incapacidade de ser

removido completamente pelas tecnologias convencionais nos processos de tratamento de água e esgoto, se tornando assim um problema generalizado em ambientes aquáticos (JURGENS et al., 2002; ATKINSON et al., 2011). Em águas superficiais, concentrações médias de  $5 \text{ ngEE2 L}^{-1}$  tem sido detectadas em águas superficiais em diferentes regiões (KIDD et al., 2007).

A vitelogenina (VTG) é uma proteína presente no plasma sanguíneo que desempenha importante papel no sistema reprodutivo de fêmeas ovíparas. A síntese desta proteína é realizada no fígado por estímulo do estrógeno gonadal E2, sendo transportada através do sangue para as gônadas, onde se acumula nos ovócitos em crescimento para ser utilizada como precursora de proteínas que servirão de reserva nutricional durante o desenvolvimento do embrião. Machos de peixes teleósteos também possuem genes para VTG que podem ser ativados por receptores para E2 no fígado, e a vitelogenina pode ser sintetizada, apesar de não apresentar função biológica reprodutiva, atingindo concentrações significativas após exposição a estrógenos. Desta forma, a detecção de vitelogenina em peixes machos em ecossistemas aquáticos contaminados por EE2 tem sido utilizada como importante biomarcador de desregulação endócrina por contaminantes estrogênicos (JOBLING et al., 1998; DENSLOW et al., 1999).

A quantificação de vitelogenina pode ser avaliada por métodos moleculares de hibridização do seu RNA mensageiro, imunohistoquímicos dependentes de um anticorpo específico para a vitelogenina, ou por método histoquímico baseado na detecção de fosfatos presentes em grande quantidade na vitelogenina (VAN DER VEN et al., 2003).

KIDD et al. (2007) conduziram experimentos em lagos que foram artificialmente contaminados por 17 -etinilestradiol (EE2) em concentrações semelhantes às encontradas em ambientes aquáticos contaminados por esgotos domésticos. Foi detectado aumento de vitelogenina plasmática nos machos do peixe *Pimephales promelas*, bem como tecido intersexuado (presença de oócitos nas gônadas masculinas), o que por sua vez culminou na ausência de recrutamento e quase extinção da espécie nos lagos contaminados por EE2, demonstrando pela primeira vez que a contaminação de ecossistemas aquáticos por EE2 pode causar efeitos em cascata do nível molecular ao nível populacional. Entretanto, neste estudo não foram avaliados aspectos relativos à possível influência do EE2 no comportamento sexual dos peixes, que podem levar a uma redução da fecundidade essencial para a manutenção de populações (THORPE et

al., 2009).

A espécie *Poecilia vivipara* é um peixe teleósteo eurialino com distribuição cosmopolita na costa brasileira, que apresenta reprodução por ovoviviparidade com um sistema de acasalamento bem característico, comum aos peixes da família Poeciliidae, que culmina com a cópula, na qual os machos introduzem gonopódio (nadadeira anal modificada) na abertura genital das fêmeas, após o macho tipicamente orientar-se em frente da fêmea e realizar uma postura em forma de S ou C ( $\displaystyle \text{sigmóide}$ ), de modo a chamar a atenção da parceira (ENDLER, 1987; EVANS et al., 2002). A análise desse padrão de comportamento sexual foi proposta como biomarcador comportamental de desregulação endócrina, uma vez que o mesmo é controlado por esteroides gonadais em peixes poecilídeos (BAYLEY et al., 1999). DOYLE and LIM (2002), por exemplo, verificaram uma redução dose-dependente do número de tentativas de cópula em machos do poecilídeo *Gambusia affinis* após exposição ao E2. O comportamento sexual a cópula compõe uma etapa essencial no processo reprodutivo para a efetiva inseminação das fêmeas pelos machos, cujos espermatozoides viáveis levam a fertilização dos oócitos em fêmeas, desenvolvimento de embriões viáveis até o seu nascimento, seguido do desenvolvimento subsequente dos jovens recém-nascidos que podem se recrutar para a população adulta. Neste sentido, possíveis alterações no comportamento sexual de poecilídeos machos, no sucesso da fertilização de fêmeas e geração de embriões são parâmetros reprodutivos cruciais que podem ser avaliados após a exposição a CDEs. DOYLE and LIM (2005) expuseram machos de *Gambusia affinis* ao 17 $\beta$ -estradiol (E2), e observaram reduções nas tentativas de cópula destes machos, bem como uma redução do percentual de impregnação de fêmeas pelos machos expostos.

A Lagoa do Araçá (8°05'37.4" S e 34°55'00.5" O) localiza-se na região urbana de Recife, dentro do complexo estuarino da Bacia do Pina (CEBP), formado pela confluência dos rios Capibaribe, Tejipió, Jordão e Pina. Trata-se de uma região com extensa contaminação por esgotos domésticos, e potencialmente estrógenos, onde a espécie *P. vivipara* é encontrada. Desta forma, este estudo tem por objetivo avaliar a presença de estrógenos nesta região, e os efeitos do 17 $\beta$ -etinilestradiol (EE2) na indução de vitelogenina, no comportamento reprodutivo de machos de *P. vivipara*, tanto em situação de exposição controlada ao EE2 em laboratório, quanto em indivíduos residentes na Lagoa do Araçá.

## II.2 METODOLOGIA

### II.2.1 Obtenção dos organismos teste

Exemplares machos e fêmeas maduros sexualmente do barrigudinho *Poecilia vivipara* foram criados no biotério aquático do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABECOTOX) da Universidade Federal de Pernambuco. Jovens recém-nascidos foram alimentados quatro vezes ao dia, três vezes com náuplios de *Artemia sp* e uma vez com ração comercial para peixes com 45% de proteína. Indivíduos machos foram separados do grupo no início da diferenciação sexual, a partir de aproximadamente 2 meses de idade, pela verificação de desenvolvimento visível do gonopódio na nadadeira anal. Fêmeas foram mantidas em aquários separados, representadas pelos indivíduos sem desenvolvimento do gonopódio na nadadeira anal, e mantidas virgens, sem contato com machos até a experimentação. Machos e fêmeas foram mantidos separadamente por 8 a 12 meses até um tamanho adulto médio que variou de 26 a 30 mm de comprimento total para os machos (desvio padrão de 3 mm), e de 37 a 40 mm para as fêmeas (desvio padrão de 6 mm). Todos os animais foram mantidos em aquários de vidro com 80 L de água, com sistema de recirculação da água do mar na salinidade 25, acoplado a um sistema de filtração mecânica e biológica. Foi mantido um fotoperíodo de 12h Luz/12h escuro, e parâmetros de qualidade de água (média  $\pm$  desvio padrão) foram mensurados semanalmente com uma sonda multiparamétrica YSI Professional Plus, registrando-se temperatura de  $26 \pm 0,5$  °C, concentração de amônia total abaixo de  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ , pH  $8,2 \pm 0,1$ , e concentração de oxigênio dissolvido de  $6,0 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ .

Para a experimentação com animais provenientes de seu habitat natural na Lagoa do Araçá, exemplares adultos machos foram capturados com o auxílio de redes de mão (puçás) no canal de acesso à Lagoa do Araçá, na área urbana de Recife, Pernambuco. Em seguida, os mesmos foram levados para o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram mantidos em aquários de vidro contendo água provinda de seu habitat natural. Estes indivíduos foram aclimatados às condições do laboratório durante dois dias, sendo então selecionados aleatoriamente 10 indivíduos que foram submetidos aos testes de comportamento sexual pelo pareamento com fêmeas adultas cultivadas no laboratório, conforme procedimentos descritos abaixo.

## **II.2.2 Preparo da solução de 17 -etinilestradiol e exposição dos machos cultivados no laboratório**

Foi pesado 10mg de 17 -etinilestradiol com 99% de pureza (Sigma Aldrich) numa balança analítica Shimadzu, sendo este posteriormente dissolvido em 100 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) P.A. num balão volumétrico de 100ml. Esta solução estoque primária de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  foi diluída 10 vezes com DMSO para a preparação de uma solução secundária  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . 10  $\mu\text{L}$  destas soluções estoque secundária e primária foram pipetados com micropipeta de volume variável modelo P20 (faixa de trabalho de 2 a 20  $\mu\text{L}$ ) para aquários com 10 L de água do mar, de modo a atingir as concentrações nominais na água de  $10 \text{ ng EE2 L}^{-1}$  e  $100 \text{ ng EE2 L}^{-1}$ , respectivamente.

Machos adultos cultivados no laboratório com comprimento total médio de 25 mm foram distribuídos em três grupos, contendo 10 indivíduos cada, e colocados em aquários com 10 L de água com concentrações nominais do hormônio sintético EE2 de  $10 \text{ ng L}^{-1}$  e  $100 \text{ ng L}^{-1}$ , além de um grupo controle em água limpa do cultivo. A exposição dos machos durou 14 dias e foi realizada num sistema semi-estático nos aquários, com renovação de 100% da água nas respectivas concentrações a cada 24 h. Parâmetros de qualidade de água foram mantidos nas mesmas condições da água do cultivo descrita anteriormente.

## **II.2.3 Análises comportamentais reprodutivas dos casais**

Foram analisados quatro tratamentos experimentais para as análises comportamentais reprodutivas, incluindo machos dos tratamentos controle (CT),  $10 \text{ ng EE2 L}^{-1}$  (EE10),  $100 \text{ ng EE2 L}^{-1}$  (EE100), e machos coletados na Lagoa do Araçá (LA). Numa primeira etapa machos de cada um destes tratamentos foram transferidos isoladamente para aquários de vidro fosco de 20 x 15 x 15 cm (Comprimento x Largura x Altura), contendo 2 L de água do mar (6,5 cm de coluna de água), sendo a atividade natatória espontânea dos mesmos monitorada por 30 min por câmeras de vídeo com lentes de 6-60 mm de distância focal, enquadrando por vista superior cada um destes aquários ou arenas experimentais. Arquivos de vídeo dos diferentes animais isolados foram criados por uma placa de captura de vídeo Geovision modelo GV- 900 num computador, para posterior análise da velocidade natatória.



Após este período de 30 min de monitoramento dos machos isolados, foi acrescentada uma fêmea adulta cultivada no laboratório em cada aquário com os machos isolados dos diferentes tratamentos, e o comportamento de cada casal foi monitorado pelo mesmo sistema de câmeras de vídeo por 25 minutos, sendo os arquivos de vídeo armazenados em computador para posterior análise do comportamento sexual de cada casal.

Os arquivos de vídeo do monitoramento da atividade natatória espontânea dos machos isolados foram analisados pelo módulo básico do software *Smart* (PanLab Harvard Apparatus, Espanha), quantificando a velocidade média de natação em  $\text{cm s}^{-1}$  de cada animal monitorado.

Os seguintes parâmetros relacionados a atividades comportamentais reprodutivas de cada casal isolado foram quantificados a partir da análise automatizada dos arquivos de vídeo do monitoramento da atividade dos casais, pelo módulo de interação social do software *Smart* (PanLab Harvard Apparatus, Espanha), que é capaz de identificar separadamente os dois peixes que compõe cada casal:

a) número de contatos entre o macho e a fêmea, definido na configuração do software para este parâmetro como eventos em que a distância entre cada um dos indivíduos do casal é inferior a 0,5 cm, sendo que para facilitar comparações o número de contatos totais detectados foi dividido pelos 25 minutos de monitoramento, sendo expresso em número de contatos  $\text{min}^{-1}$ ;

b) duração média dos contatos em minutos, sendo que um contato é iniciado quando a distância entre o macho e a fêmea atinge valores inferiores a 0,5 cm durando no mínimo 1 segundo, e é considerado finalizado quando esta distância excede 0,7 cm entre o macho e a fêmea.

c) distância média em cm entre o macho e a fêmea durante os contatos detectados.

Além desses parâmetros relativos ao comportamento de cada casal, também foi analisado o comportamento de cada casal a partir da análise detalhada do respectivo arquivo de vídeo por observador humano. Nesta análise o observador quantificou:

d) o número de tentativas de cópula efetuado pelos machos de cada casal durante o período total de 25 minutos de monitoramento. Este comportamento é caracterizado pela tentativa de introdução do gonopódio no poro genital da fêmea, representando etapa essencial para a efetiva fertilização interna da fêmea, e que pode ser observado nas imagens obtidas pelo sistema utilizado. Para facilitar comparações o número de

tentativas de cópula totais detectados para cada casal foi dividido pelos 25 minutos de monitoramento, sendo expresso em número de tentativas de cópula  $\text{min}^{-1}$ .

Arquivos de vídeo de 9 casais do grupo controle foram analisados para verificar a existência de correspondência entre os contatos detectados pelo software Smart, envolvendo um contato próximo (inferiores a 5 mm de distância) entre machos e fêmeas, e as tentativas de cópula quantificadas por observador humano. Num primeiro momento foram analisados os arquivos da interação dos casais, anotando os tempos em que as tentativas de cópula ocorreram. Posteriormente foi analisado se o tempo em que aconteceu esta tentativa de cópula, analisada pelo observador humano, também tinha sido detectado como evento de contato entre machos e fêmeas pelo software.

#### **II.2.4 Sucesso na impregnação de fêmeas, e produção de juvenis recém-nascidos vivos**

Ao término do monitoramento das interações reprodutivas de cada casal pelo sistema de vídeo, os casais do tratamento controle e do tratamento Lagoa do Araçá foram mantidos juntos nos mesmos aquários por mais uma hora. Passado esse tempo, as fêmeas pareadas com machos de cada tratamento foram transferidas para redes circulares individualmente dentro de aquários de 80L, sendo acompanhadas individualmente por um período adicional de 60 a 90 dias, para avaliação do sucesso de impregnação e da quantidade de juvenis recém-nascidos vivos gerados. Além disso, o total de juvenis recém-nascidos vivos gerados pelas fêmeas pareadas com machos de cada tratamento também foi quantificado.

#### **II.2.5 Análise histoquímica de fosfatos no fígado como indicador de vitelogenina**

Ao término do monitoramento das interações reprodutivas de cada casal pelo sistema de vídeo, todos os machos provenientes de cada um dos tratamentos foram eutanaziados em água com gelo a 2°C, e fixados em formol tamponado a 10% por 48 horas, sendo então transferidos para álcool 70% (v/v). Posteriormente os tecidos foram desidratados em série crescente de etanol, transferidos para o xilol e incluídos em parafina a 60° C. Cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura foram realizados em micrótomo Leica e distendidos em lâminas previamente preparadas. A coloração histoquímica para detecção de fosfoproteínas como indicador da presença de vitelogenina se baseia na alta

concentração típica de grupos fosfatos presentes nessa proteína, e foi aplicado conforme protocolos descritos em (VAN DER VEN et al., 2003). Os grupos fosfato nos tecidos analisados foram complexados com FeIII, após desparafinação em série de xilol e etanol, lavagem em água destilada, e incubação com solução de cloreto férrico hexa-hidratado  $10 \text{ mM L}^{-1}$  durante 1 hora a  $25^\circ\text{C}$ , seguido de nova lavagem em água destilada. Os grupos fosfato complexados com o FeIII foram corados pela coloração de azul da Prússia, gerando uma cor azul clara indicativa da presença de fosfatos, seguido de desidratação, diafanização e montagem das lâminas com lamínula utilizando Entellan. Lâminas de seções de fígado de três machos de cada tratamento foram fotografadas em microscópio Leica em um aumento de 40x, e os arquivos digitais das fotos geradas foram analisados pelo software GNU Image Manipulation Program (GIMP, versão 2.8). Seções de fígado dos machos controle não expostos foram considerados controles negativos (Figura 6A), com baixa concentração de vitelogenina. Seções de fígado de fêmeas grávidas também foram processadas como controles positivos (Figura 6B), assumindo-se que os fígados apresentariam concentrações elevadas de vitelogenina. Pode-se visualizar nas Figuras 6A e 6B a amplitude de variação da cor azul claro indicativa da presença de fosfatos. A Figura 6F apresenta a coloração azul claro que foi utilizada para definir a cor a ser avaliada pelo software GNU Image Manipulation Program (GIMP, versão 2.8) em cada imagem analisada, pela quantificação do número de pixels na imagem contendo esta cor.

## II.2.6 Coleta e análise química de moléculas estrogênicas na água

Para a coleta utilizou-se um balde inox de 8 L, com uma corda amarrada ao mesmo. Foram coletadas amostras de água superficial na semana em que foram coletados os peixes machos utilizados nos experimentos, sendo 2 amostras no canal de comunicação do rio Tejió com a Lagoa do Araçá (LA,  $8^\circ05'35.6''\text{S}$  e  $34^\circ55'04.5''\text{W}$ ), 1 amostra no rio Capibaribe em frente ao Sport Club Recife (CBSP,  $8^\circ03'46.2''\text{S}$  e  $34^\circ54'04.3''\text{W}$ ), 1 amostra no pier em frente ao Iate Clube Casa de Banho (CBPI,  $8^\circ04'12.0''\text{S}$  e  $34^\circ52'18.5''\text{W}$ ), e 1 amostra no rio Capibaribe na ponte sobre a Avenida Caxangá (CBCX,  $8^\circ01'50.9''\text{S}$  e  $34^\circ57'22.8''\text{W}$ ).

Após as coletas, as amostras de água de 2 L foram transferidas para frascos de vidro de cor âmbar previamente lavados, acondicionadas em uma caixa térmica e transportadas para o LABECOTOX. As amostras foram filtradas inicialmente em filtros

de fibra de celulose de 2  $\mu\text{m}$  (Química Moderna, Brasil), seguida por filtração em membrana de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ . 1 L do filtrado foi extraído em cartuchos de extração em fase sólida OASIS HLB 6CC/500mg (Waters, Milford, EUA), em um sistema de extração utilizando uma bomba vácuo com frascos de vidro tipo Kitasato, adaptados com rolhas de silicone para a conexão dos cartuchos de extração. Para ativação do cartucho de extração eluiu-se 6 mL de metanol grau HPLC, seguido da eluição de 6 mL de água ultrapura. Em seguida, as amostras foram passadas pelo cartucho a uma taxa de fluxo de 10  $\text{mL min}^{-1}$ . Ao término da extração das amostras pelos cartuchos, a fase sólida dos mesmos foi seca sob a corrente de sucção da mesma bomba a vácuo durante 30 minutos. Os cartuchos foram encaminhados para o laboratório de Química ambiental do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em São Paulo, Brasil, onde foi feita a determinação dos compostos estrogênicos estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\beta$ -etinilestradiol (EE2), estriol (E3) e bisfenol-A (BPA) através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, segundo método de (SODRÉ et al., 2010). Após a extração em fase sólida, a separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Zorbax SB-C18 (30 x 2,1 mm e tamanho de partícula de 3,5  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies) a 25°C com gradiente de eluição. A fase móvel foi constituída de água ultrapura e metanol, previamente filtrados em membranas contendo 0,01% de  $\text{NH}_4^+$ , um aditivo a formação de íons. A identificação e a quantificação dos compostos foram realizadas por espectrometria de massas em um equipamento Agilent com triplo quadruplo (modelo 6410B) equipado com bomba de vácuo auxiliar operando na célula de colisão. A quantificação foi realizada no modo MRM (Multiple Reaction Monitoring), no qual cada sistema precursor-produto é específico para cada composto. Essa quantificação foi feita por meio da construção de curvas analíticas, onde cada ponto foi construído pela extração em colunas de extração de fase sólida de um litro de água ultrapura contendo diferentes concentrações dos compostos analisados. Os limites de quantificação para E1, E2, EE2, E3 e BPA foram iguais a 0,3; 0,6; 3,1; 0,6 e 1,2  $\text{ngL}^{-1}$ , respectivamente.

### II.2.8 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software SigmaPlot 11(Jandel Scientific, Erkrath, Germany), a um alfa de 5% para todas as análises. A comparação entre os tratamentos para os dados de histoquímica e parâmetros comportamentais foi feita por análise de variância de um fator (ANOVA), após aceitas as premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando foi detectada diferença significativa entre os tratamentos em um nível de significância de 5%, o teste de comparação múltipla de Dunnet foi aplicado para determinar diferenças com relação ao controle. O teste t de Student foi aplicado para avaliar diferenças entre dois tratamentos, quando aplicável. Quando não foi observada normalidade ou homogeneidade de variâncias, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste *a posteriori* de Dunn para avaliar diferenças entre o tratamento controle e os outros tratamentos.

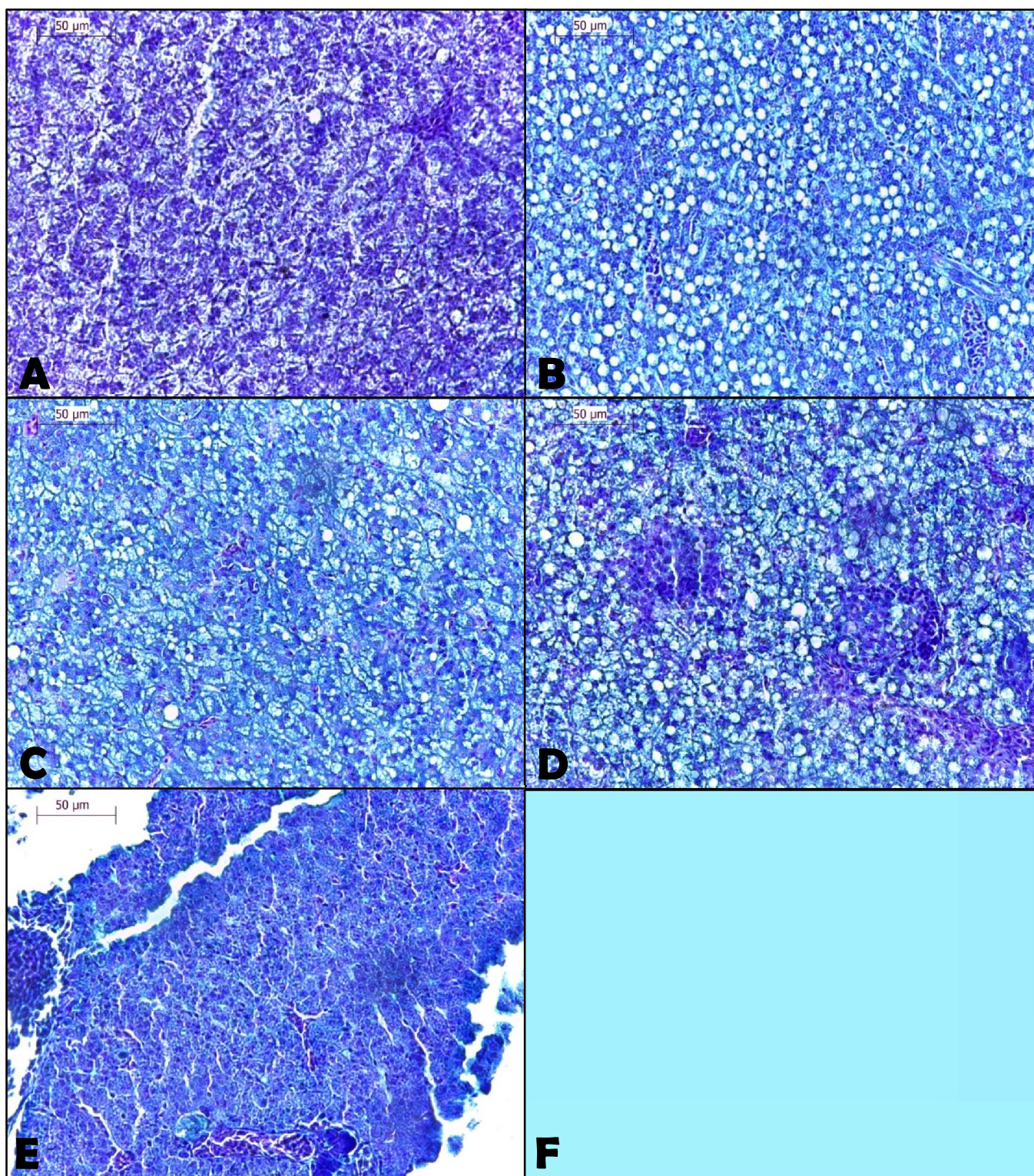
## II.3 RESULTADOS

### II.3.1. Análise histoquímica

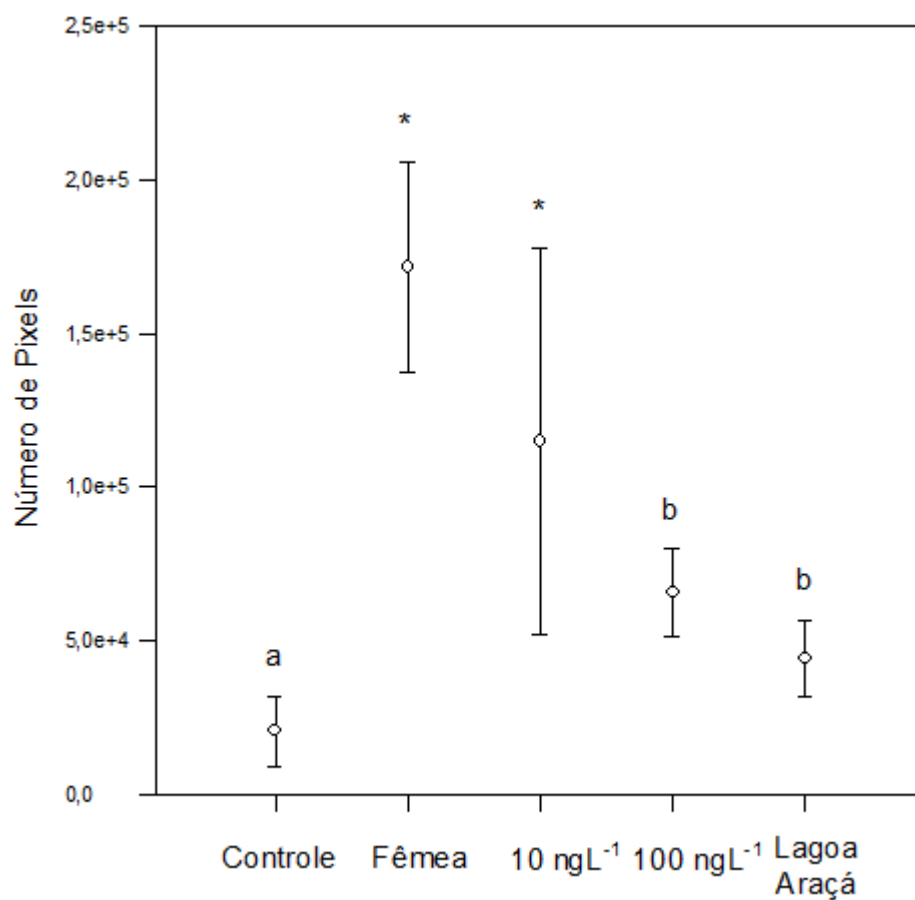
Dentre as seções de fígado analisadas, a média do número de pixels de coloração azul clara no fígado dos machos controle não expostos (Figura 6A e Figura 7) foi igual a 20.741 pixels, representando a menor média. A média máxima de 171.461 pixels foi encontrada nas fêmeas grávidas (Figura 6B e Figura 7), coerente com a suposição de uma concentração mínima de VTG em machos, e máxima em fêmeas grávidas. A média do número de pixels foi igual a 114.932 em EE10, 65.623 em EE100, e 44.191 pixels em LA, valores que são aproximadamente 7x, 3x e 2x maiores relativos ao controle, respectivamente. A comparação por ANOVA indicou diferença estatisticamente significativa relativa ao controle apenas nas fêmeas grávidas e em EE10 (Figuras 6C-E e Figura 7; ANOVA,  $F_{4,20} = 16,1$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ). Entretanto, um teste T entre os dados do controle e EE100 detecta diferença estatisticamente significativa (Teste  $t = 5,5$ ;  $p < 0,001$ ), e um teste  $t$  entre os dados do controle e LA também detecta diferença estatisticamente significativa (Teste  $t = 3,9$ ;  $p = 0,015$ ).



**Figura 6:** Cortes histológicos de fígado da espécie *Poecilia vivipara* apresentando a coloração histoquímica para fosfoproteínas no fígado. Ocorrência da coloração azul claro (painel F) indica presença de fosfoproteínas no tecido. Em A - macho controle; B ó fêmea grávida (controle positivo); C ó macho exposto a 10 ng.L<sup>-1</sup> 17 $\beta$ -etinilestradiol (EE2); D ó macho exposto a 100 ng.L<sup>-1</sup> de EE2 e E ó macho da Lagoa do Araçá (exposto ambientalmente à mistura de contaminantes).



**Figura 7:** Número de pixels de coloração azul clara (média  $\pm$  desvio padrão) nas seções de fígado analisadas de machos de *Poecilia viviparum* mantidos em água limpa (controle negativo), fêmeas grávidas (controle positivo), machos expostos em laboratório a concentrações de  $10 \text{ ngL}^{-1}$  e  $100 \text{ ngL}^{-1}$  do hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias, e de machos coletados na Lagoa do Araçá. O asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em comparação com os controles por ANOVA (ANOVA,  $F_{4,20} = 16,1$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ). Letras a e b indicam diferença estatística relativa ao controle por teste T student,  $p < 0,05$ ).



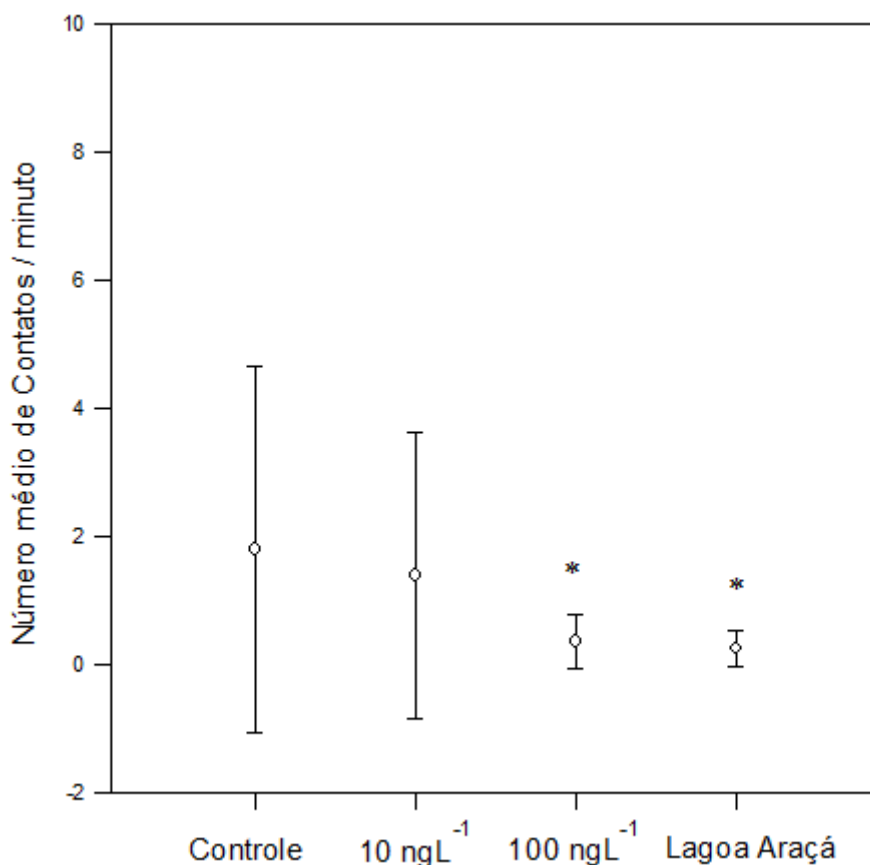


## II.3.2 Análises comportamentais reprodutivas dos casais

### II.3.2.1. Número de Contatos

O número de contatos médio entre machos e fêmeas dos casais analisados foi igual a  $1,79 \pm 2,86$  contatos  $\text{min}^{-1}$  no controle, decaindo para  $1,39 \pm 2,23$  contatos  $\text{min}^{-1}$  em EE10,  $0,35 \pm 0,42$  contatos  $\text{min}^{-1}$  em EE100, e  $0,24 \pm 0,28$  contatos  $\text{min}^{-1}$  em LA. Estes valores correspondem a reduções de 22 %, 80 % e 86 % nos tratamentos EE10, EE100 e LA, respectivamente em relação ao controle, sendo que foi verificada diferença estatisticamente significativa com relação ao controle em EE100 e LA (ANOVA,  $F_{3,80} = 3,38$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ) (Figura 8).

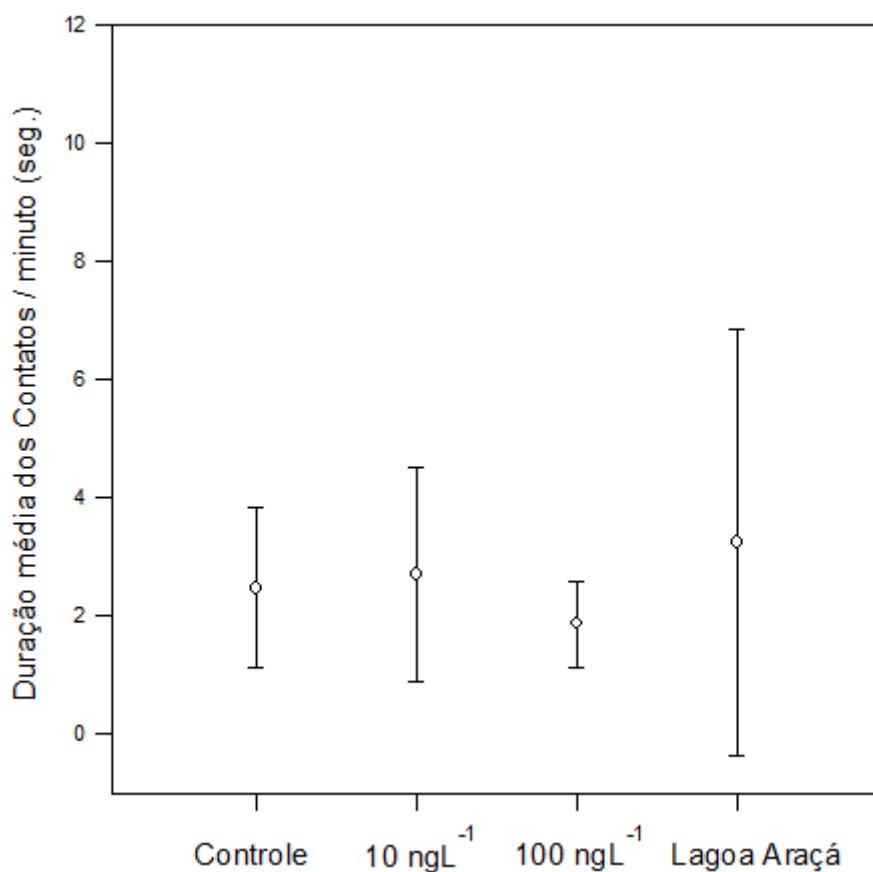
**Figura 8:** Média do número de contatos (média  $\pm$  desvio padrão) entre casais (macho e fêmea) da espécie *Poecilia vivipara* expostos em laboratório as concentrações de  $10 \text{ ngL}^{-1}$  e  $100 \text{ ngL}^{-1}$  do hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias, e trazidos do campo (Lagoa do Araçá, machos ambientalmente expostos a mistura de contaminantes). O asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{3,80} = 3,38$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ).



### II.3.2.2 Duração média dos contatos

Não foi detectada diferença significativa na duração média dos contatos entre machos e fêmeas dos casais analisados (ANOVA,  $F_{3,62} = 0,97$ ,  $p = 0,408$ ) (Figura 9). Os casais analisados apresentaram contatos com duração média de  $2,47 \pm 1,35$  s no controle,  $2,70 \pm 1,82$  s em EE10,  $1,87 \pm 0,73$  s em EE100, e  $3,24 \pm 3,59$  s em LA.

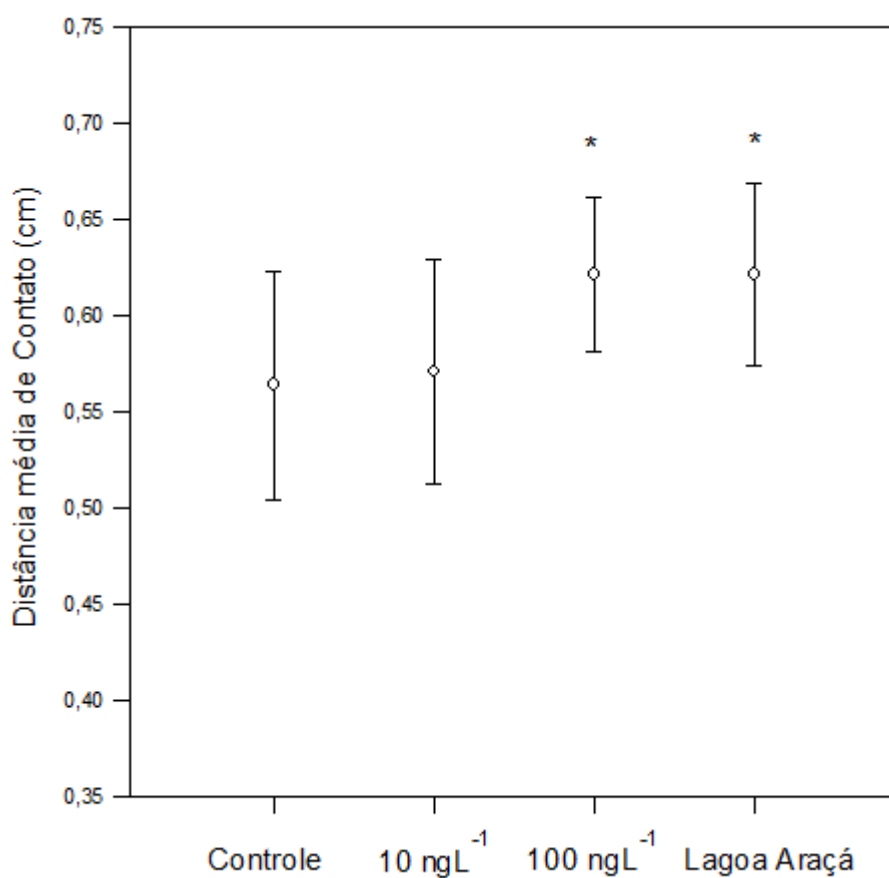
**Figura 9:** Duração média de contato (média  $\pm$  desvio padrão) entre casais (macho e fêmea) da espécie *Poecilia vivipara* expostos em laboratório as concentrações de  $10 \text{ ngL}^{-1}$  e  $100 \text{ ngL}^{-1}$  do hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias e trazidos do campo (Lagoa do Araçá, machos ambientalmente expostos a mistura de contaminantes) (ANOVA,  $P = 0,408$ ).



### II.3.2.3. Distância média por contato

A distância média por contato entre machos e fêmeas dos casais analisados aumentou em EE100 e LA, quando comparados ao tratamento controle (ANOVA,  $F_{3,62}=5,70$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ) (Figura 10). A distância média por contato entre machos e fêmeas dos casais foi igual a  $0,56 \pm 0,059$  cm nos controles,  $0,57 \pm 0,058$  cm em EE10, e  $0,62 \pm 0,040$  cm em EE100 e em LA, representando um aumento de 10,7% em EE10 e LA relativo aos controles.

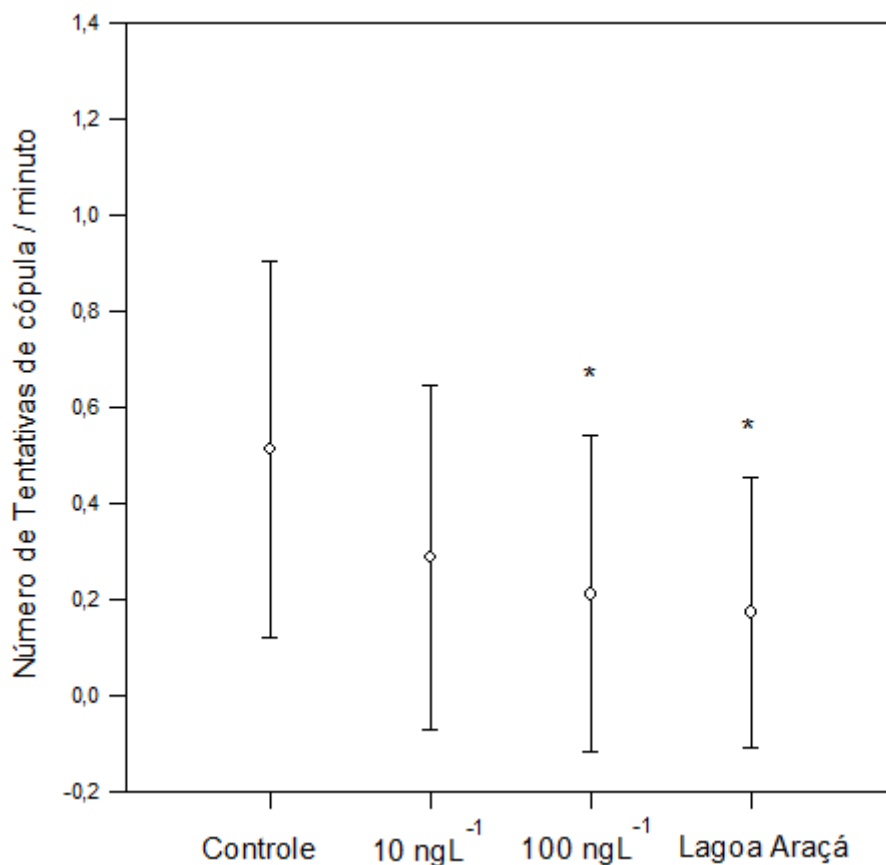
**Figura 10:** Distância de contato (média  $\pm$  desvio padrão) entre casais (macho e fêmea) da espécie *Poecilia vivipara* expostos em laboratório às concentrações de  $10 \text{ ngL}^{-1}$  e  $100 \text{ ngL}^{-1}$  do hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias e trazidos do campo (Lagoa do Araçá, machos ambientalmente expostos à mistura de contaminantes). O asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{3,62}=5,70$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ).



### II.3.2.4. Tentativa de cópula por minuto

A média do número de tentativas de cópula pelos machos dos casais analisados diminuiu de  $0,51 \pm 0,39$  tentativas  $\text{min}^{-1}$  no controle para  $0,28 \pm 0,35$  tentativas  $\text{min}^{-1}$  em EE10,  $0,21 \pm 0,33$  tentativas  $\text{min}^{-1}$  em EE100, e  $0,17 \pm 0,27$  tentativas  $\text{min}^{-1}$  em LA, representando reduções relativas ao controle de 45%, 58% e 66% em EE10, EE100 e LA, respectivamente. Entretanto, diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle foram detectadas somente em EE100 e LA (ANOVA,  $F_{3,68} = 3,50$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ) (Figura 11).

**Figura 11:** Tentativas de cópula por minuto (média  $\pm$  desvio padrão) entre casais (macho e fêmea) da espécie *Poecilia vivipara* expostos em laboratório às concentrações de  $10 \text{ ngL}^{-1}$  e  $100 \text{ ngL}^{-1}$  do hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias e trazidos do campo (Lagoa do Araçá, machos ambientalmente expostos à mistura de contaminantes). Tempo total de análise foi 25 minutos. O asterisco(\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{3,68} = 3,50$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ).



### II.3.2.5. Comparação entre o número de tentativas de cópula detectados por observador humano e o número de contatos detectados automaticamente

O software Smart (PanLab Harvard Apparatus, EUA) apresentou um percentual de acerto variando entre 0 % a 33 %, representado pela razão entre o número de contatos detectados automaticamente que foram confirmados por observador humano como tentativas de cópula, e o total de tentativas de cópula observados por humano num período de 25 min de monitoramento de casais de *P. vivipara* (Tabela 1).

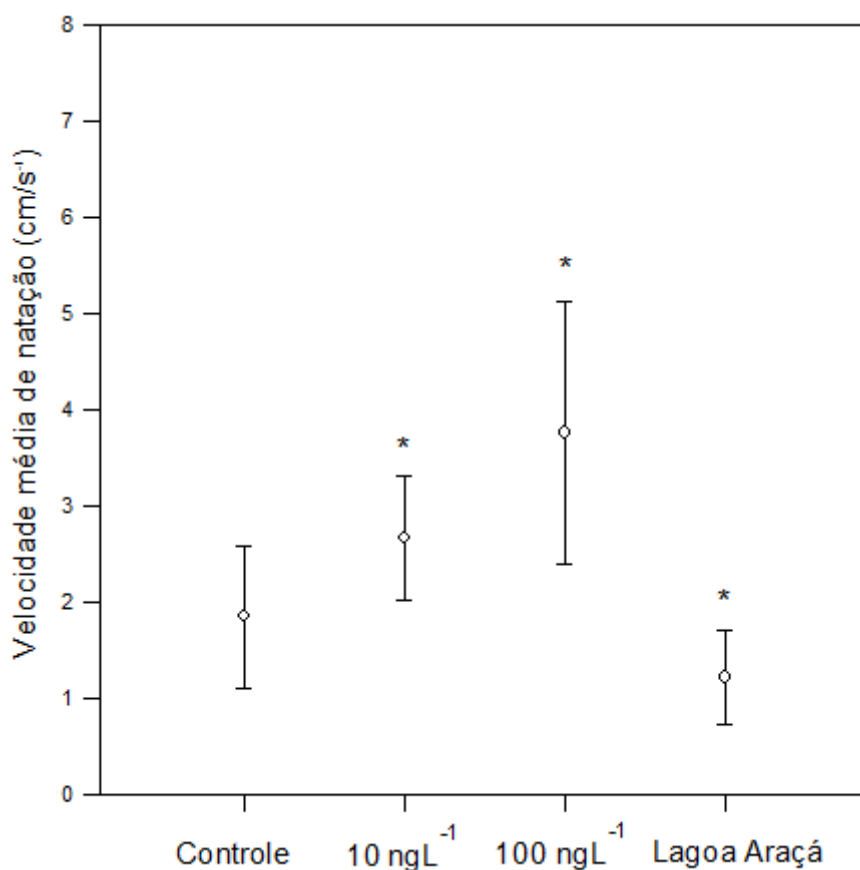
**Tabela 1** ó Percentual de acerto do número de tentativas de cópula quantificadas pelo observador humano e confirmadas pela detecção de contatos automaticamente pelo software Smart.

Casais	Nº de tentativas de cópula (observador humano)	Nº de Contatos (software)	Contatos que foram efetivas tentativas de cópula	Percentual de acerto contatos que corresponderam com tentativas de cópula/ tentativas de cópula
1	2	12	0	0 %
2	3	6	1	33 %
3	12	9	2	17 %
4	7	3	0	0 %
5	2	1	0	0 %
6	17	5	1	6 %
7	16	2	0	0 %
8	2	3	0	0 %
9	9	13	1	11%

### II.3.2.6 Velocidade natatória espontânea dos machos quando isolados

Foi detectada uma hiperatividade natatória nos machos expostos ao EE2 e uma hipoatividade natatória nos machos provenientes da Lagoa do Araçá. A velocidade natatória espontânea média dos machos quando isolados nas arenas experimentais, antes da interação com as fêmeas, foi igual a  $1,85 \text{ cm s}^{-1}$  no controle, aumentando para  $2,67 \text{ cm s}^{-1}$  em EE10,  $3,75 \text{ cm s}^{-1}$  em EE100, e decaindo para  $1,22 \text{ cm s}^{-1}$  em LA, sendo que tanto o aumento dose dependente após exposição ao EE2 quanto a diminuição nos machos provenientes de LA foram diferentes estatisticamente em relação ao controle (ANOVA,  $F_{3,56} = 24,8$ ,  $p < 0,001$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ) (Figura 12). A hiperatividade natatória levou a um aumento da velocidade relativa ao controle de 43% em EE10 e de 102 % em EE100, e a hipoatividade em LA levou a uma redução da velocidade relativa ao controle de 35%.

**Figura 12:** Velocidade média de natação de machos expostos as concentrações de  $10 \text{ ngL}^{-1}$  e  $100 \text{ ngL}^{-1}$  do hormônio 17 -etinilestradiol durante 14 dias, ou coletados na Lagoa do Araçá. Asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em comparação com os controles (ANOVA,  $F_{3,56} = 24,8$ ,  $p < 0,001$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ).

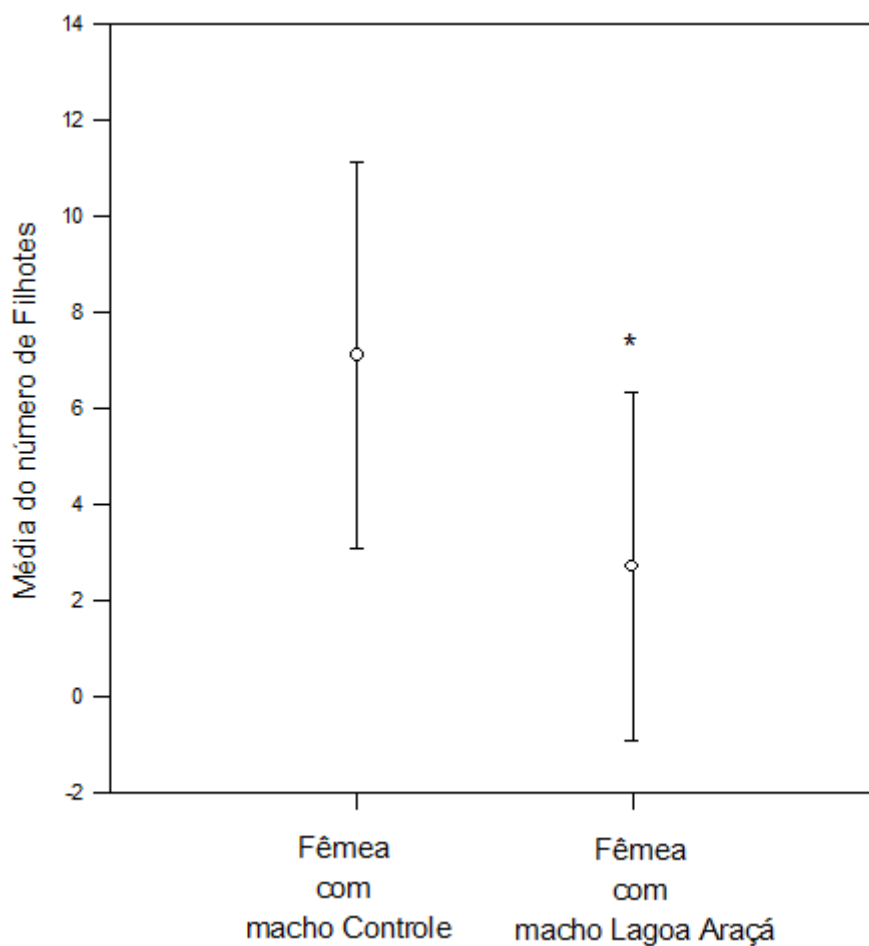


### **II.3.2.7 Produção de juvenis recém-nascidos vivos e sucesso na impregnação de fêmeas**

Machos do grupo controle apresentaram 88 % de sucesso na impregnação de fêmeas, enquanto machos provenientes da Lagoa do Araçá apresentaram 55 % de sucesso na impregnação de fêmeas (Tabela 2). Além disso, o total de juvenis produzidos pelas fêmeas foi reduzido de 57 quando pareadas com machos do grupo controle para 14 quando pareadas com machos da Lagoa do Araçá, correspondendo a um decréscimo de 75,5 % do total de juvenis produzidos (Tabela 2).

O número médio de juvenis recém-nascidos vivos gerados pelas fêmeas pareadas com machos do controle foi igual a  $7,1 \pm 4,01$  filhotes fêmea<sup>-1</sup>, diminuindo significativamente para uma média de  $2,7 \pm 3,62$  filhotes fêmea<sup>-1</sup> para as fêmeas pareadas com machos provenientes da Lagoa do Araçá (Teste T,  $t = 2,574$ ,  $p = 0,019$ ), correspondendo a uma redução de 62% na produção de juvenis por fêmea para o tratamento Lagoa do Araçá (Figura 13).

**Figura 13:** Número de filhotes nascidos (média  $\pm$  desvio padrão) de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara* grávidas do grupo Controle e do grupo Lagoa do Araçá. O asterisco (\*) indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (Teste T,  $t = 2,574$   $p = 0,019$ ;  $N=10$ ).



**Tabela 2** ó Sucesso na impregnação de fêmeas por machos do controle e da Lagoa do Araçá, média do número de juvenis gerados, e número total de juvenis gerados nos tratamentos controle e Lagoa do Araçá.

	Total de Fêmeas monitoradas	Fêmeas grávidas	Sucesso de Impregnação das fêmeas %	Número médio de Filhotes	Total de juvenis gerados
Fêmeas + Macho Controle	9	8	88 %	7,1	57
Fêmeas + Macho da Lagoa do Araçá	9	5	55 %	2,7	14



### II.3.3 Análise química de águas superficiais no Complexo Estuarino da Bacia do Pina

A análise cromatográfica por HPLC-MS das amostras de água coletadas em águas superficiais no Complexo Estuarino da Bacia do Pina e Rio Capibaribe indicou a presença dos estrógenos EE2, E1, E2, E3 e de bisfenol-A em concentrações mínimas e máximas entre 6,1 e 14 ng L<sup>-1</sup> para EE2, 3,6 e 14 ng L<sup>-1</sup> para E1, 2,8 e 5,6 ng L<sup>-1</sup> para E2, 12 e 24 ng L<sup>-1</sup> para E3, e entre 13 e 73 ng L<sup>-1</sup> para BPA (Tabela 3).

**Tabela 3** Concentração em ngL<sup>-1</sup> dos estrógenos (17 $\beta$ -etinilestradiol - EE2, Estrona - E1, Estradiol - E2, e Estriol - E3) e bisfenol-A, quantificados em águas superficiais no Complexo Estuarino da Bacia do Pina e rio Capibaribe. ND - não detectado. LA: Lagoa do Araçá; CBSP: rio capibaribe em frente ao Sport Clube; CBPI: Pier do Iate Clube Casa de banho no Porto de Recife; CBCX: rio Capibaribe na ponte sobre a Avenida Caxangá. Valores em réplicas das amostras coletadas. Valores ND não foram considerados para o cálculo das médias.

	EE2	E1	E2	E3	BPA
Amostra	Etinilestradiol	Estrona	Estradiol	Estriol	Bisfenol-A
LA 1	ND	13	ND	24	36
LA 1	ND	14	ND	12	38
LA 2	ND	16	2,8	19	17
LA 2	ND	15	3,7	18	19
CBSP 1513	6,1	13	ND	22	15
CBSP 1513	7,5	13	ND	15	16
CBPI 1513	ND	3,6	ND	ND	15
CBPI 1513	ND	4,1	ND	ND	13
CBCX 1513	6,9	14	5,6	22	23
CBCX 1513	14	13	4,8	24	52
Valor máximo	14	14	5,6	24	73
Valor mínimo	ND ó 6,1	3,6	ND ó 2,8	ND - 12	13
Média	8,6	11,9	4,2	19,5	31,8

## II.4 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou a potencialidade do estrogênio sintético 17 $\beta$ -etinilestradiol alterar aspectos relevantes da biologia reprodutiva de machos de *Poecilia vivipara*, incluindo a indução da produção de VTG pelo fígado, a perda da intenção de copular com fêmeas maduras sexualmente, juntamente com a indução de uma hiperatividade natatória. Além disso, moléculas estrogênicas detectadas em águas superficiais do Complexo Estuarino da Bacia do Pina podem ter contribuído para efeitos semelhantes detectados em machos residentes neste sistema estuarino, incluindo também a indução da produção de VTG, a perda da intenção de copular com fêmeas maduras sexualmente, juntamente com a indução de uma hipoatividade natatória, e que também resultou numa significativa redução da geração de juvenis por fêmeas que interagiram sexualmente com estes machos.

O método histoquímico utilizado neste estudo para demonstrar indiretamente a presença de VTG em seções histológicas de fígado apresenta correlação positiva com metodologias mais sofisticadas e específicas para a quantificação da vitelogenina em peixes via RNA mensageiro ou métodos baseados em anticorpos específicos para a vitelogenina (VAN DER VEN et al., 2003; ALKIMIN, 2016). Os resultados histoquímicos indicaram uma indução máxima da produção de VTG de 7x relativa aos controles em machos expostos a 10 ngL<sup>-1</sup> de EE2, sendo reduzida para 3x superior ao controle em EE100 (Teste t = 5,5; p < 0,001) e para 2x superior ao controle em LA (Teste t = 3,9; p = 0,015). Apesar da indução de VTG nos machos provenientes da Lagoa do Araçá ter sido a menor dentre os tratamentos avaliados, ela é coerente com a presença dos estrógenos E1, E2, E3 e de BPA na água da Lagoa do Araçá analisada (Tabela 3), sendo que E2 é considerado o estrógeno natural ativo em teleósteos. Apesar de o EE2, que é cerca de 11 a 27 vezes mais potente que E2 para indução de VTG em trutas (THORPE et al., 2003) não ter sido detectado nas duas amostras analisadas na Lagoa do Araçá, onde os peixes deste estudo foram coletados, a concentração média de EE2 na amostra do Rio Capibaribe CBSP foi igual a 6,8 ng L<sup>-1</sup>, na região do estuário do CEBP, e 10,4 ng L<sup>-1</sup> na amostra do Rio Capibaribe CBCX, mais a montante, que são tipicamente encontradas em ecossistemas aquáticos de áreas urbanas contaminados por esgotos domésticos, como é o caso, e podem induzir significativamente a produção de VTG em machos de peixes teleósteos (KIDD et al., 2007). Na região do Rio Atibaia, em Campinas, São Paulo, a maior concentração de EE2 detectada foi igual a 25 ng L<sup>-1</sup>, e

EE2 não foi detectado mesmo em amostra do Rio Anhumas, altamente contaminado por esgotos domésticos e industriais. Nesta mesma região do Rio Atibaia, as maiores concentrações de E1, E2, E3 e BPA detectados foram iguais a 39; 7,3; 2,3 e 84 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente (SODRÉ et al., 2010).

Entre os estrógenos presentes na entrada (esgoto sem tratamento) e na saída (efluentes) de estações de tratamento de esgoto, JOHNSON et al. (2000) detectaram E3 em maiores concentrações, com uma média de 57 ng L<sup>-1</sup> na entrada e 10 ng L<sup>-1</sup> na saída, seguido de E1, E2, e EE2. E3 é um estrógeno natural encontrado em altas concentrações em urina de mulheres grávidas, que também foi detectado nas maiores concentrações neste estudo, de até 24 ng L<sup>-1</sup> (média de 19,5 ng L<sup>-1</sup>) aproximadamente 34 % da concentração detectada na entrada de estações de tratamento de esgoto referidas acima. As concentrações detectadas neste estudo de E3 e E1 também corroboram o padrão decrescente de concentrações verificado por JOHNSON et al. (2000), sendo que E1 foi detectado em todas as amostras analisadas neste estudo com média de 11,9 ng L<sup>-1</sup>, seguido de EE2 (média 8,6 ng L<sup>-1</sup>) e E2 (média 4,2 ng L<sup>-1</sup>), sendo que EE2 e E2 foram detectados somente em 2 dos 5 locais analisados. Estrógenos e seus derivados conjugados foram detectados em águas do Rio Paraíba do Sul e outros corpos de água de regiões de alta densidade demográfica no Rio de Janeiro em concentrações menores que as detectadas neste estudo, de até 7 ng L<sup>-1</sup>, sendo que E3 foi detectado em média com 3,6 ng L<sup>-1</sup>, e E1, E2 e EE2 não foram detectados (KUSTER et al., 2009). Uma possível explicação para a menor indução de VTG no grupo LA relativa ao controle pode ser a presença de moléculas antiestrogênicas nas águas da região, uma vez que os efeitos combinados de CDEs com atividade estrogênica e antiestrogênica pode neutralizar os efeitos de estrógenos na indução de VTG (SUN et al., 2009).

O comportamento reprodutivo é considerado um parâmetro chave quando se avalia o potencial deletério de desreguladores endócrinos, tendo em vista que ele é essencial para a efetiva reprodução (LANGE et al., 2001; KRISTENSEN et al., 2005). Em poecilídeos como *Gambusia affinis* tem sido verificado que os machos tentam copular com as fêmeas numa frequência alta, pois uma pequena proporção das tentativas de cópula obtém sucesso na transferência de esperma para as fêmeas (BISAZZA et al., 1996). Desta forma, qualquer redução ou alteração no comportamento de cópula ou em algum outro que leve a realização do mesmo pode resultar em um menor sucesso reprodutivo do indivíduo (DOYLE and LIM, 2005). Neste estudo foi detectada uma redução da atividade sexual dos machos tanto pela quantificação por

observador humano das tentativas de cópula, quanto pelo número total de contatos entre machos e fêmeas após exposição dos machos ao EE2 100 ngL<sup>-1</sup> em laboratório e a misturas ambientais na LA (Figuras 8 e 11). Além disso, a detecção pelo software de um aumento da distância entre machos e fêmeas durante os contatos nestes mesmos tratamentos (Figura 10) sugere que estes contatos menos íntimos teriam menos chance de envolver a cópula. A velocidade de natação espontânea indicou hiperatividade dos machos dos tratamentos EE2-10 e EE2-100 e hipoatividade dos machos provenientes de LA (Figura 11). Ambas as alterações podem estar relacionadas à perda da intenção de copular com as fêmeas detectada em EE-100 e LA.

Para a avaliação de estudos comportamentais, tradicionalmente há o envolvimento de um observador humano, com um cérebro capaz de examinar e decodificar padrões complexos de comportamento, extraindo exatamente o comportamento de interesse. Por outro lado, o uso de softwares comportamentais é insuperável na eficiência de aquisição de uma grande quantidade de dados comportamentais quando comparados ao observador humano, tendo em vista que o software pode analisar o movimento de vários animais por longos períodos e calcular comportamentos simples, como distância percorrida, velocidade máxima e média e número de visitas a locais específicos da arena experimental (BAATRUP and BAYLEY, 1993; KANE et al., 2004). Segundo BAATRUP (2009) a maioria dos softwares comportamentais estão restritos a quantificar comportamentos relacionados com o movimento ou posição de um ou mais animais através do centróide (centro geométrico de gravidade) de cada um deles. Comportamentos complexos envolvendo 2 ou mais animais podem não ser identificados, pois envolvem além da posição relativa entre eles, sua orientação espacial e forma, combinados com variações na velocidade de deslocamento e interação dos indivíduos. Neste sentido, a cópula, apesar de ser um comportamento estereotipado em peixes poecílídeos, é um comportamento complexo, que constitui etapa essencial no processo reprodutivo para a efetiva inseminação das fêmeas pelos machos. O software Smart utilizado neste estudo não atingiu eficiência mínima desejável para quantificar comportamentos reprodutivos complexos como as tentativas de cópula entre os contatos detectados, que envolvem o monitoramento de detalhes da posição e movimentação dos machos e de seu gonopódio. Tentativas de cópula verificadas por observador humano nos vídeos analisados raramente foram contabilizadas como contatos quantificados automaticamente pelo software (Tabela 1).

Dessa maneira, o software Smart demonstrou uma capacidade limitada quanto à quantificação das tentativas de cópula em meio aos contatos detectados.

Machos de *Gambusia holbrooki* expostos a concentrações de 20, 100, e 500 ngL<sup>-1</sup> de E2 por 84 dias apresentaram reduções no número de contatos e de tentativas de cópula em 500 ngL<sup>-1</sup> (DOYLE and LIM, 2002). Machos de *Gambusia holbrooki* expostos às concentrações de 100 e 500 ng L<sup>-1</sup> de 17  $\alpha$ -estradiol durante 84 dias apresentaram uma diminuição no sucesso de impregnação de fêmeas de aproximadamente 75% nos controles para 50% e 45%, respectivamente (DOYLE and LIM, 2005). Entretanto, não houve redução do número de filhotes gerados por estas fêmeas pareadas com machos expostos ao E2.

Esse estudo demonstrou que os machos provenientes da Lagoa do Araçá tiveram sua capacidade de impregnação de fêmeas reduzida de 88 % no controle para 55%. Além da diminuição da atividade sexual dos machos como possível mecanismo para explicar a redução do sucesso na impregnação de fêmeas, também é possível que a viabilidade espermática dos machos de LA estivesse comprometida, como já foi relatado para machos de *Poecilia reticulata* e truta arco-íris expostos a E2 (BILLARD et al., 1981; TOFT and BAATRUP, 2003). As alterações no comportamento sexual dos machos da LA também estiveram associadas com uma redução de 62% no número médio de juvenis produzidos pelas fêmeas que foram pareadas com os mesmos, e de 75% no número total de juvenis produzidos, que sugere um efeito drástico na capacidade de fêmeas pareadas com estes machos de LA de gerar novos recrutas para a população residente no CEBP (Tabela 3).

Uma vez que a performance reprodutiva envolve parâmetros de relevância populacional, a investigação de parâmetros como a geração de juvenis viáveis é essencial para a proteção de populações de vida selvagem dos efeitos deletérios de misturas complexas de CDEs. Os dados apresentados neste estudo ilustram a importância de se considerar múltiplos parâmetros em diferentes níveis de organização biológica para avaliação dos efeitos de CDEs.

## II.5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho deixam claro os efeitos adversos causados pelo 17 -etinilestradiol no comportamento sexual e na reprodução de machos de *Poecilia vivipara*. Também fica evidente que indivíduos expostos ambientalmente à mistura de contaminantes na Lagoa do Araçá estão sujeitos a compostos estrogênicos, cujos efeitos neste estudo se assemelham aos efeitos bioquímicos e comportamentais causados por EE2 em laboratório. Níveis de compostos estrogênicos (E1, E2, EE2, E3 e BPA) encontrados no complexo estuarino da bacia do Pina e rio Capibaribe estão envolvidos na redução do sucesso de impregnação e do número de juvenis gerados pelas fêmeas pareadas com machos expostos a mistura ambiental de contaminantes. Este estudo quantifica pela primeira vez CDEs estrogênicos em águas da região metropolitana de Recife, e demonstra o efeito de desreguladores endócrinos como o EE2 isolado em laboratório, e de uma mistura ambiental de contaminantes incluindo CDEs estrogênicos, em biomarcadores bioquímicos, comportamentais e reprodutivos de *Poecilia vivipara*, que podem afetar a viabilidade populacional em situações ambientalmente realistas.

### III. CAPÍTULO 2: Efeitos da atrazina no comportamento reprodutivo de *Poecilia vivipara*

#### III.1 INTRODUÇÃO

Os organismos aquáticos têm sido sucessivamente expostos a uma variedade de contaminantes provenientes da atividade industrial, agrícola e de efluentes urbanos, como por exemplo, hidrocarbonetos, metais pesados, compostos desreguladores endócrinos e agrotóxicos (SCHNURSTEIN and BRAUNBECK, 2001; FERREIRA, 2012). Compostos desreguladores endócrinos (CDEs) têm atraído uma atenção substancial desde a última década, pois há evidências de que eles causam efeitos adversos na reprodução e no desenvolvimento de uma ampla variedade de espécies, principalmente espécies que estão constantemente em contato com o ambiente aquático, como os peixes por exemplo (COLBORN et al., 1996; BRINGOLF et al., 2004).

Dentre os CDEs, a atrazina destaca-se como um herbicida do grupo das triazinas bastante utilizado em todo o mundo, principalmente no controle de ervas daninhas em grandes plantações de milho, cana-de-açúcar e soja (JAVARONI et al., 1999; HECKER et al., 2005; FAN et al., 2007). Este composto é considerado moderadamente tóxico, mas devido à sua persistência relativa (meia vida de 41 a 237 dias na água) e alta solubilidade em água, a contaminação de ambientes aquáticos por este poluente tem aumentado nos últimos anos, podendo ser encontrada em elevadas concentrações tanto em águas superficiais, como em subterrâneas (SÁNCHEZ-CAMAZANO et al., 2003; SOLOMON et al., 2008; KREUTZ et al., 2012). No Brasil, a concentração máxima de atrazina recomendada em águas doces de classe I a classe III é de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), segundo a resolução 357/2005 (CONAMA, 2005). Porém, não há determinação de limite em águas estuarinas e costeiras, podendo encontrar desde concentrações baixas como  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$  até concentrações elevadíssimas de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ , em águas adjacentes a campos tratados com esse herbicida (READMAN et al., 1993; SCHOTTLER et al., 1994; GRAYMORE et al., 2001; AZEVEDO, 2013).

Em vertebrados aquáticos, efeitos letais e subletais causados pela atrazina tem sido investigados, e até hoje ainda há lacunas quanto à ação desse herbicida sobre esses organismos, principalmente em peixes (PAULINO et al., 2012). Estudos sobre os efeitos tóxicos de atrazina em peixes indicaram uma grande variabilidade nas respostas, dependendo da dose e da espécie. A maioria dos estudos fisiológicos e bioquímicos

propõe que os principais alvos da atrazina envolvem receptores do sistema endócrino reprodutivo (ROHR and MCCOY, 2010; PAPOULIAS et al., 2014). Estudos como VASANTH et al. (2015) e FAN et al. (2007) demonstraram o efeito estrogênico da atrazina, resultante pela indução da aromatase e da vitelogenina plasmática em machos. Já SHENOY (2014) percebeu que fêmeas de *Poecilia reticulata* expostas durante o período gestacional (embriões ainda na barriga das fêmeas) a concentrações de 1 a 13,5 µg.L<sup>-1</sup> de atrazina, quando adultos se tornaram menos propensos a realizar os comportamentos de cópula (display sigmóide, tentativas de cópula pelo movimento do gonopódio) quando comparados aos machos controle.

LITTLE et al. (1990) afirmam que vários estudos têm demonstrado que as funções comportamentais são as primeiras a serem alteradas e exibidas em peixes expostos a contaminantes, antes de qualquer mortalidade ficar evidente. Assim, biomarcadores comportamentais em peixes são medidas quantitativas de habilidades adaptativas que contribuem para a sua aptidão evolutiva, sendo importantes para a sobrevivência, crescimento e/ou reprodução do mesmo (BEITINGER, 1990).

Os índices organo-somáticos, como o gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) indicam quantitativamente o bem estar do peixe, refletindo condições alimentares recentes e a influência dos fatores ambientais sobre o animal (VAZZOLER, 1996). Esses índices são úteis não somente no monitoramento do estado geral do indivíduo, como também no processo de previsão das mudanças decorrentes das variações sazonais e da presença de substâncias estressantes como, por exemplo, os contaminantes químicos. Logo, esses índices vêm sendo bastante utilizados como biomarcadores, no entanto, eles devem ser utilizados com cautela, devendo ser empregados apenas quando comparam indivíduos da mesma espécie ou de espécies similares (SCHMITT and DETHLOFF, 2000).

A espécie *Poecilia vivipara* (Barrigudinho ou Guarú) Bloch & Schneider, 1801 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) é um peixe teleósteo com uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas Américas (AMARAL et al., 2001). É uma espécie eurialina e abundante na maioria dos ambientes aquáticos dulcícolas e estuarinos do Brasil (GOMES and MONTEIRO, 2008). Por apresentar um sistema de acasalamento bem característico e de fácil identificação por um observador humano, a análise desse comportamento sexual tem sido bastante utilizada como biomarcador comportamental de desregulação endócrina (BAATRUP, 2009; MELO, 2013). Devido a sua fácil manutenção em laboratório essa espécie vem sendo utilizada no Instituto Nacional de



Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática do CNPq para o desenvolvimento de metodologias de biomonitoramento de ambientes aquáticos com base nos biomarcadores de contaminação.

Os efeitos desse herbicida no comportamento reprodutivo de peixes Poecilídeos ainda são pouco conhecidos, desta maneira, esta proposta teve como principal objetivo avaliar os efeitos do desregulador endócrino atrazina em juvenis machos e fêmeas adultos da espécie *P. vivipara* envolvendo a análise de parâmetros comportamentais e reprodutivos, de modo a contribuir para o avanço científico e tecnológico no uso de biomarcadores de contaminação para o monitoramento ambiental.

## III.2 METODOLOGIA

### III.2.1 Obtenção dos organismos teste

Exemplares machos e fêmeas maduros sexualmente do barrigudinho *Poecilia vivipara* foram criados no biotério aquático do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABECOTOX) da Universidade Federal de Pernambuco. Jovens recém-nascidos foram alimentados quatro vezes ao dia, três vezes com náuplios de *Artemia sp* e uma vez com ração comercial para peixes com 45% de proteína. Indivíduos machos foram separados do grupo no início da diferenciação sexual, a partir de aproximadamente 2 meses de idade, pela verificação de desenvolvimento visível do gonopódio na nadadeira anal. Fêmeas foram mantidas em aquários separados, representadas pelos indivíduos sem desenvolvimento do gonopódio na nadadeira anal, e mantidas virgens, sem contato com machos até a experimentação. Machos e fêmeas foram mantidos separadamente por 8 a 12 meses até um tamanho adulto aproximado de 25 mm de comprimento total para os machos e de 30 mm para as fêmeas. Todos os animais foram mantidos em aquários de vidro (80 litros) com sistema de recirculação da água do mar na salinidade 25, acoplado a um sistema de filtração mecânica e biológica. Foi mantido um fotoperíodo de 12h Luz/12h escuro, e parâmetros de qualidade de água (média  $\pm$  desvio padrão) foram mensurados semanalmente com uma sonda multiparamétrica YSI Professional Plus, registrando-se temperatura de  $26 \pm 0,5$  °C, concentração de amônia total abaixo de  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ , pH  $8,2 \pm 0,1$ , e concentração de oxigênio dissolvido de  $6,0 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ .

### II.2.2 Preparo da solução de Atrazina e exposição de machos e fêmeas cultivados no laboratório

Foi pesado 0,100 g de Atrazina com 99% de pureza (Sigma Aldrich) numa balança analítica Shimadzu, sendo este posteriormente dissolvido em 25 ml de dimetil sulfoxido (DMSO) P.A. num balão volumétrico de 25ml. Esta solução estoque primária de  $4000 \text{ mg L}^{-1}$  foi diluída 10 vezes com DMSO para a preparação de uma solução secundária  $400 \text{ mg L}^{-1}$ . E a secundária também foi diluída 10 vezes para a preparação de uma solução terciária  $40 \text{ mg L}^{-1}$ . 125  $\mu\text{L}$  das soluções estoque terciária, secundária e primária foram pipetados com micropipeta de volume variável de 2 a 200  $\mu\text{L}$  para aquários com

10L de água do mar, de modo a atingir as concentrações nominais na água de  $0,5\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $5,0\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Machos e fêmeas adultos cultivados no laboratório com comprimento total médio de 25 e 30 mm, respectivamente, foram distribuídos em oito grupos em aquários de 10 L, quatro com machos e quatro com fêmeas isolados, contendo 10 indivíduos cada. Um aquário de machos e um aquário de fêmeas foi exposto a concentrações nominais do herbicida atrazina de  $0,5$ ,  $5,0$  e  $50\mu\text{g L}^{-1}$ , além de um grupo controle em água limpa do cultivo. A exposição dos peixes durou 30 dias e foi realizada num sistema semi-estático nos aquários de 15 litros, com renovação de 100% da água nas respectivas concentrações a cada 24 h. Parâmetros de qualidade de água foram mantidos nas mesmas condições da água do cultivo descrita anteriormente no capítulo 1.

### **II.2.3 Análises comportamentais reprodutivas dos casais**

Para ter uma análise mais detalhada dos possíveis efeitos do composto no comportamento reprodutivo de casais, foram realizadas duas séries de filmagens, a primeira ao término do 14º dia de exposição e a segunda ao término do 30º dia de exposição. Para ambas as séries de filmagens foram analisados quatro tratamentos experimentais para as análises comportamentais reprodutivas, incluindo machos e fêmeas dos tratamentos controle,  $0,5\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $5,0\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50\mu\text{g L}^{-1}$ . Numa primeira etapa machos e fêmeas de cada um destes tratamentos foram transferidos e mantidos isolados em aquários de vidro fosco de 20 x 15 x 15 cm (Comprimento x Largura x Altura), contendo 2L de água do mar (6,5 cm de coluna de água), sendo a atividade natatória espontânea dos mesmos monitorada por 30 min por câmeras de vídeo com lentes de 6-60 mm de distância focal, enquadrando por vista superior cada um destes aquários ou arenas experimentais. Arquivos de vídeo dos diferentes animais isolados foram criados por uma placa de captura de vídeo Geovision modelo GV- 900 num computador, para posterior análise da velocidade natatória.

Após este período de 30 min de monitoramento dos indivíduos isolados, fêmeas de mesma concentração de exposição foram transferidas para os aquários onde estavam os machos do mesmo tratamento, e o comportamento de cada casal foi monitorado pelo mesmo sistema de câmeras de vídeo por 25 minutos, sendo os arquivos de vídeo armazenados em computador para posterior análise do comportamento sexual de cada casal. Os arquivos de vídeo do monitoramento da atividade natatória espontânea dos

machos e fêmeas isolados foram analisados pelo módulo básico do software *Smart* (PanLab Harvard Apparatus, Espanha), quantificando a velocidade média de natação em  $\text{cm s}^{-1}$  de cada animal monitorado.

O comportamento sexual de cada casal foi analisado a partir da análise detalhada do respectivo arquivo de vídeo por observador humano. Nesta análise o observador quantificou:

a) o número de tentativas de cópula efetuado pelos machos de cada casal durante o período total de 25 minutos de monitoramento. Este comportamento é caracterizado pela tentativa de introdução do gonopódio no poro genital da fêmea, representando etapa essencial para a efetiva fertilização interna da fêmea, e que pode ser observado nas imagens obtidas pelo sistema utilizado. Para facilitar comparações o número de tentativas de cópula totais detectados para cada casal foi dividido pelos 25 minutos de monitoramento, sendo expresso em número de tentativas de cópula  $\text{min}^{-1}$ .

#### **II.2.4 Ovócitos maduros, IGS e IHS**

Ao término do monitoramento da interação reprodutiva de cada casal pelo sistema de vídeo, os casais foram mantidos juntos nos mesmos aquários por mais uma hora. Passado esse tempo, as fêmeas foram transferidas para redes circulares individualmente dentro de aquários de 80L, sendo acompanhadas individualmente por um período adicional de 60 dias, para quantificação do número de ovócitos maduros. O número de ovócitos foi determinado a partir da contagem do número total de ovócitos maduros contidos nos ovários de cada fêmea.

O IGS (índice gonadossomático) e o IHS (índice hepatossomático) das fêmeas foram expressos pela razão entre o peso da gônada -  $W_{\text{gônada}}$  (para o IGS) ou fígado -  $W_{\text{fígado}}$  (para o IHS), e o peso total de cada indivíduo -  $W_{\text{total}}$ . O IGS foi calculado segundo a fórmula de (VAZZOLER, 1996):

$$\text{IGS} = (W_{\text{gônada}} / W_{\text{total}}) \times 100$$

Já o IHS foi calculado segundo a fórmula de (SANTOS, 1978):

$$\text{IHS} = (W_{\text{fígado}} / W_{\text{total}}) \times 100$$

### III.2.5. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software SigmaPlot 11(Jandel Scientific, Erkrath, Germany), a um alfa de 5% para todas as análises. Para a comparação dos dados foi feita a análise de variância de um fator (ANOVA I), e após aceitas as premissas de normalidade e homogeneidade das amostras, foi feito o teste de Dunnett para avaliar diferenças entre o controle e os tratamentos. Quando não foi observada normalidade ou homogeneidade das variâncias, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste *a posteriori* de Dunn para avaliar diferenças entre o tratamento controle e os outros tratamentos.

### III.3. RESULTADOS

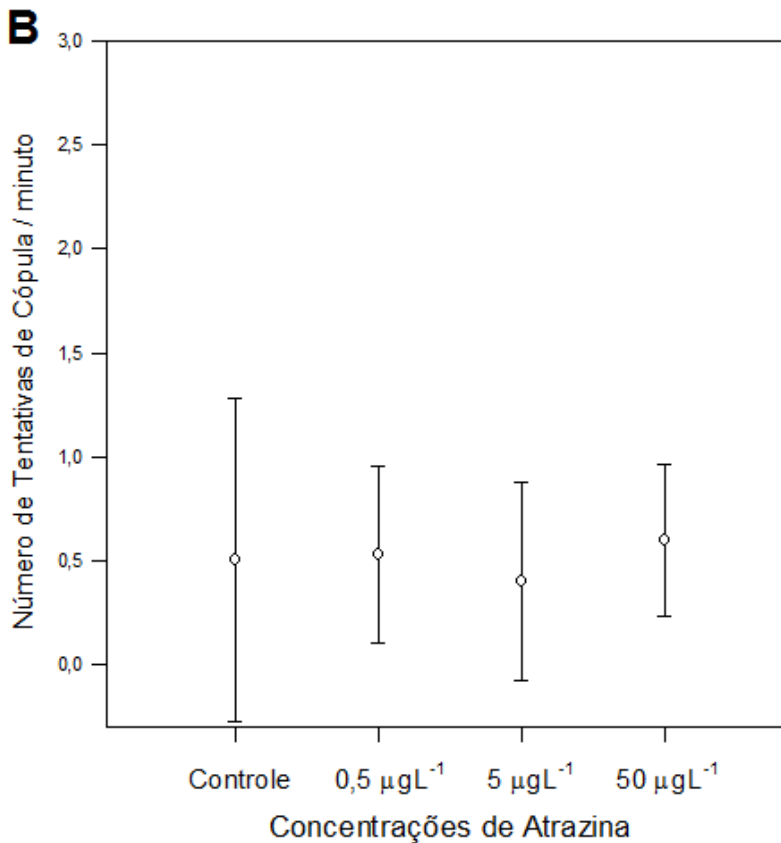
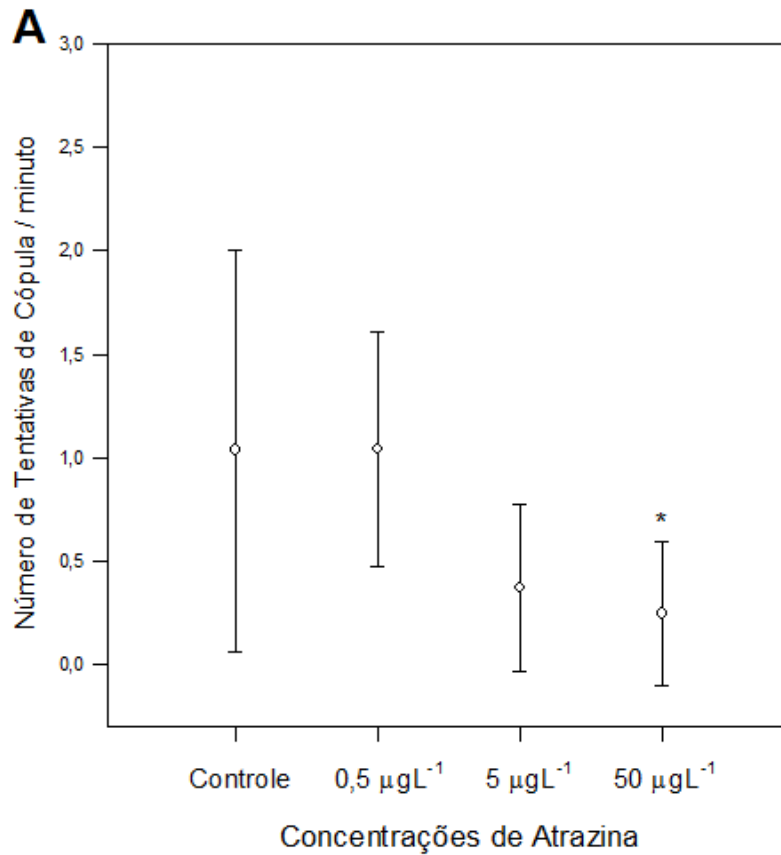
#### III.3.1 Comportamentoreprodutivo

##### III.3.1.1Tentativas de Cópula

Ao final do 14º dia de exposição, os casais apresentaram médias de 1,03; 1,04; 0,37 e 0,24tentativas  $\text{min}^{-1}$  nas concentrações Controle, 0,5, 5,0 e 50  $\mu\text{gL}^{-1}$ , respectivamente. Foram observadas reduções de 64,07% na concentração 5,0  $\mu\text{gL}^{-1}$ , e de 76,69% na concentração 50  $\mu\text{gL}^{-1}$ , sendo esta estatisticamente significativa apenas na maior concentração (ANOVA,  $F_{3,27} = 3,66$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ) (Figura 14A). No 30º dia de exposição, as médias de tentativas de cópula não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao controle (ANOVA,  $P = 0,887$ ) (Figura 14B).

**Figura 14:** Tentativas de Cópula por minuto (média  $\pm$  desvio padrão), entre os casais (macho e fêmea) de *Poecilia vivipara*, expostos a diferentes concentrações, 0,5 $\mu\text{gL}^{-1}$ ,

5,0  $\mu\text{gL}^{-1}$  e 50  $\mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 14 dias (A) (ANOVA,  $F_{3,27} = 3,66$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ) e 30 dias (B) (ANOVA,  $P = 0,887$ ). O asterisco (\*) em 14A indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle. Tempo total de análise foi 25 minutos.



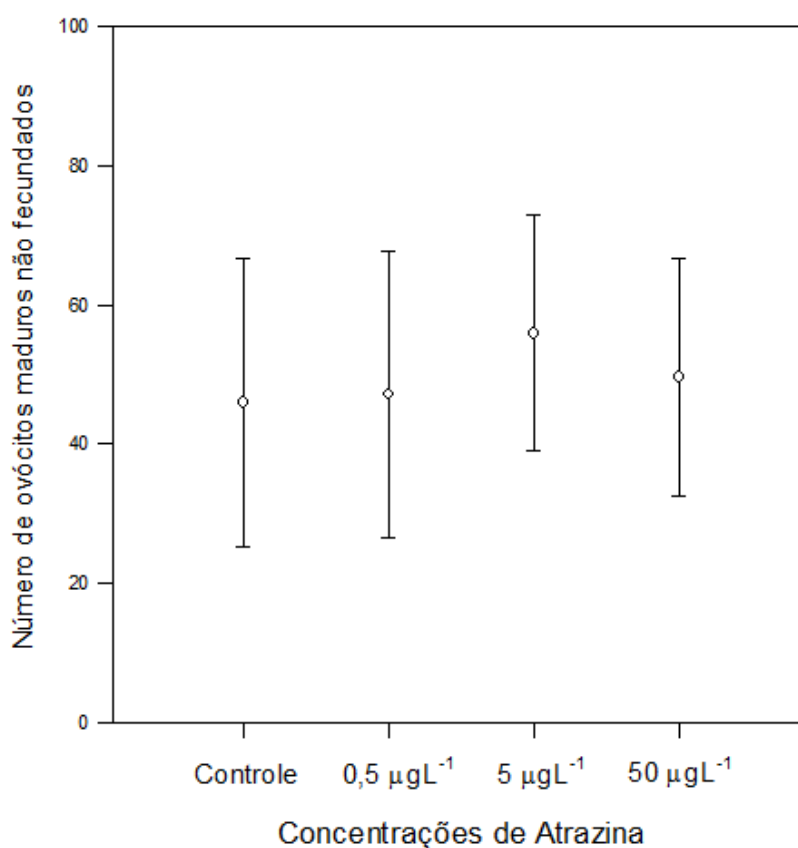
**III**

Ap  
com ovó

ntaram ovários  
e 46; 47; 55 e

49 ovócitos nas concentrações Controle,  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ , respectivamente. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos valores quando comparados ao tratamento controle (ANOVA,  $P = 0,684$ ) (Figura 15).

**Figura 15:** Número de ovócitos maduros (média  $\pm$  desvio padrão), de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara*, expostas a diferentes concentrações,  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 30 dias (ANOVA,  $P = 0,684$ ).



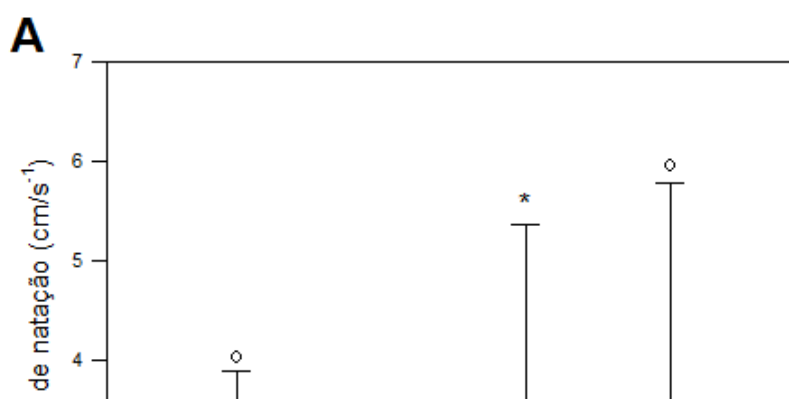
### III.3.1.3 Atividade natatória dos Machos

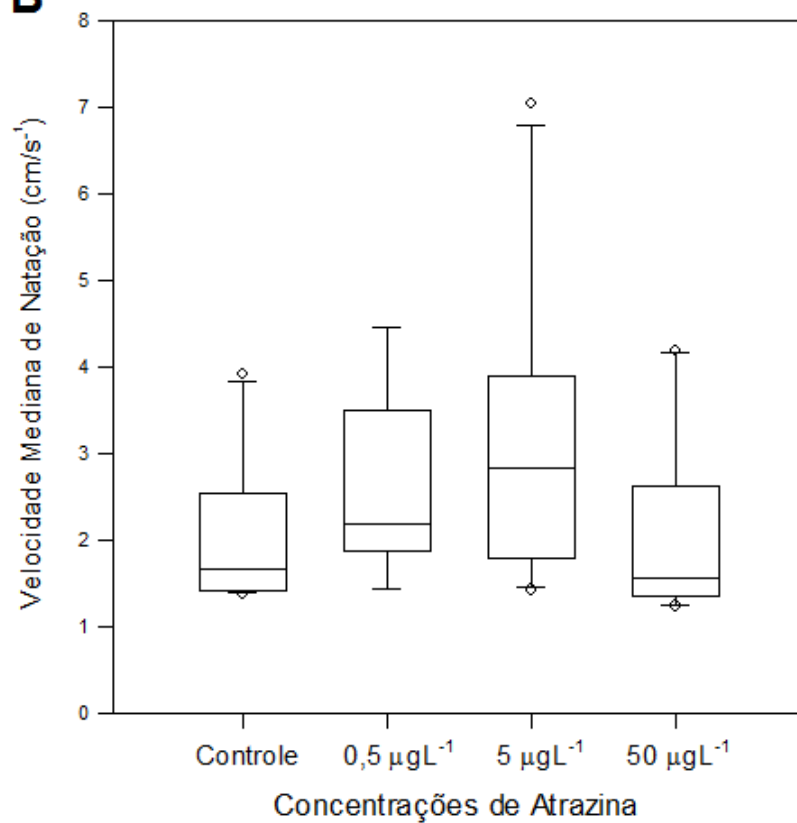
Ao término do 14º dia, foi detectada uma hiperatividade natatória nos machos expostos a atrazina. A velocidade de natação dos machos expostos à concentração de  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  foi igual a  $2,33 \text{ cm/s}^{-1}$ , representando um aumento significativo de 77% quando comparada ao controle, que apresentou uma velocidade mediana de  $1,31 \text{ cm/s}^{-1}$ . As concentrações  $0,5$  e  $50 \mu\text{gL}^{-1}$  apresentaram velocidades de  $2,46 \text{ cm/s}^{-1}$  e  $2,21 \text{ cm/s}^{-1}$ .



respectivamente, porém, estas não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao tratamento controle (ANOVA,  $F_{4,35} = 2,63$ ,  $p < 0,05$ ; Dunn,  $p < 0,05$ ) (Figura 16A). No 30º dia de exposição, em nenhuma das concentrações do herbicida foi observada diferença estatisticamente significativa (ANOVA,  $p = 0,076$ ) (Figura 16B).

**Figura 16:** Velocidade de Natação (mediana  $\pm$  desvio padrão) de indivíduos machos da espécie *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações,  $0,5\mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0\mu\text{gL}^{-1}$  e  $50\mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 14 dias (A) e 30 dias (B). O asterisco (\*) em 16A indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{4,35} = 2,63$ ,  $p < 0,05$ ; Dunn,  $p < 0,05$ ).



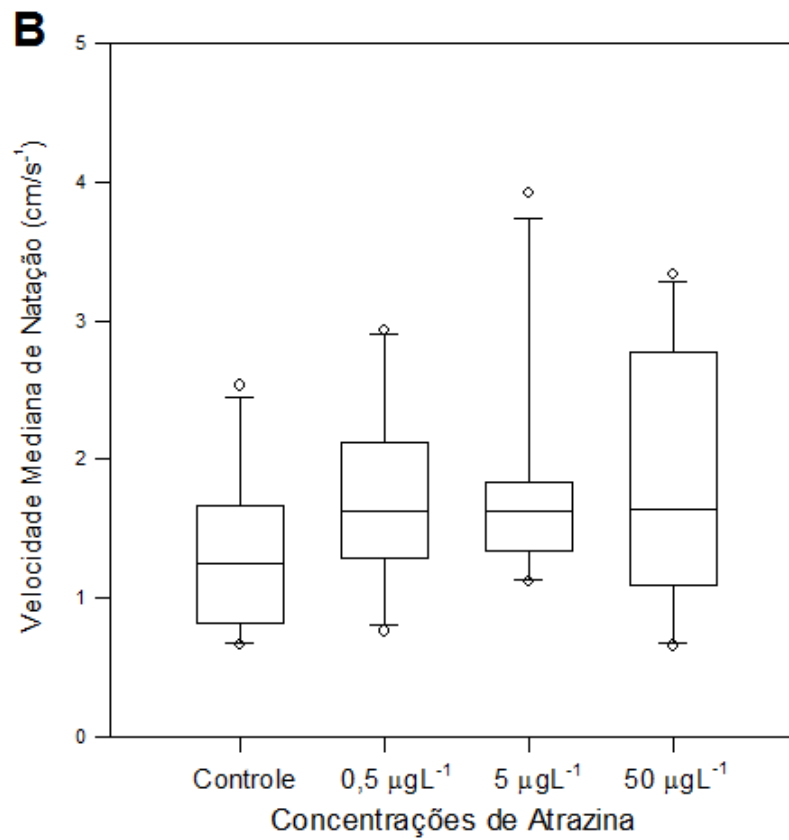
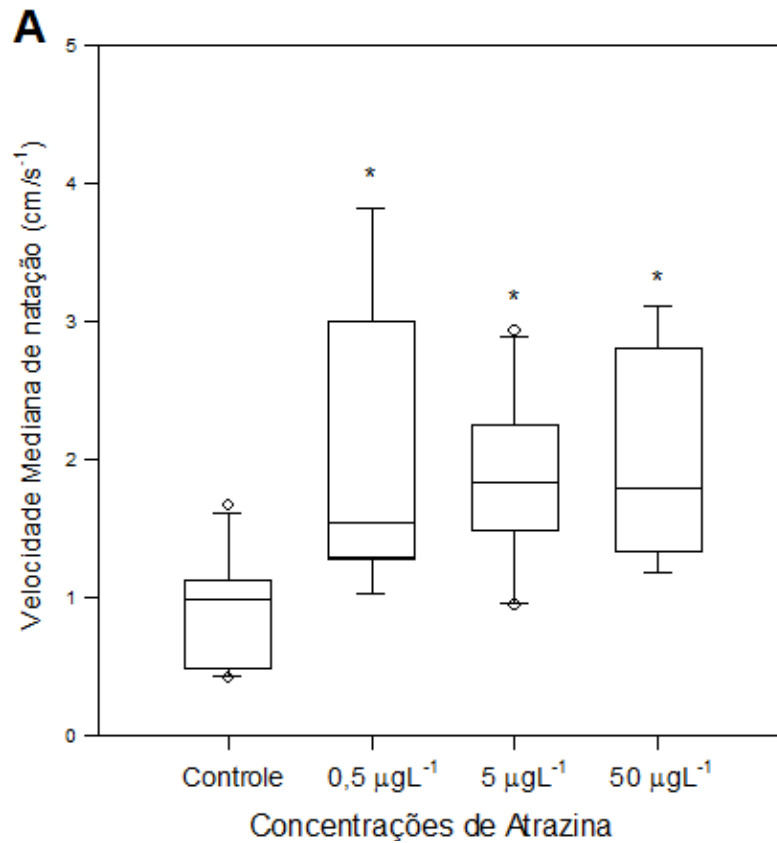
**B****III.3.**

Assi  
fêmeas exp  
foi igual a 2  
1, respectiva

tatória nas  
do 14º dia  
e 50 µgL<sup>-1</sup>  
concentrações

de exposição. Em ambas as concentrações o aumento foi significativo quando comparados ao controle, com velocidade de 0,93 cm/s<sup>-1</sup> (ANOVA,  $F_{4,34} = 5,31$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ) (Figura 17A). Ao final do 30º dia de exposição, embora as velocidades natatórias ainda fossem elevadas, estas não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao controle (ANOVA,  $P = 0,379$ ) (Figura 17B).

**Figura 17:** Velocidade de Natação (mediana  $\pm$  desvio padrão) de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara* expostas a diferentes concentrações,  $0,5\mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0\mu\text{gL}^{-1}$  e  $50\mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 14 dias (A) e 30 dias (B). O asterisco (\*) em 17A indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Controle (ANOVA,  $F_{4,34} = 5,31$ ,  $p < 0,05$ ; Dunnett,  $p < 0,05$ ).



### III.3

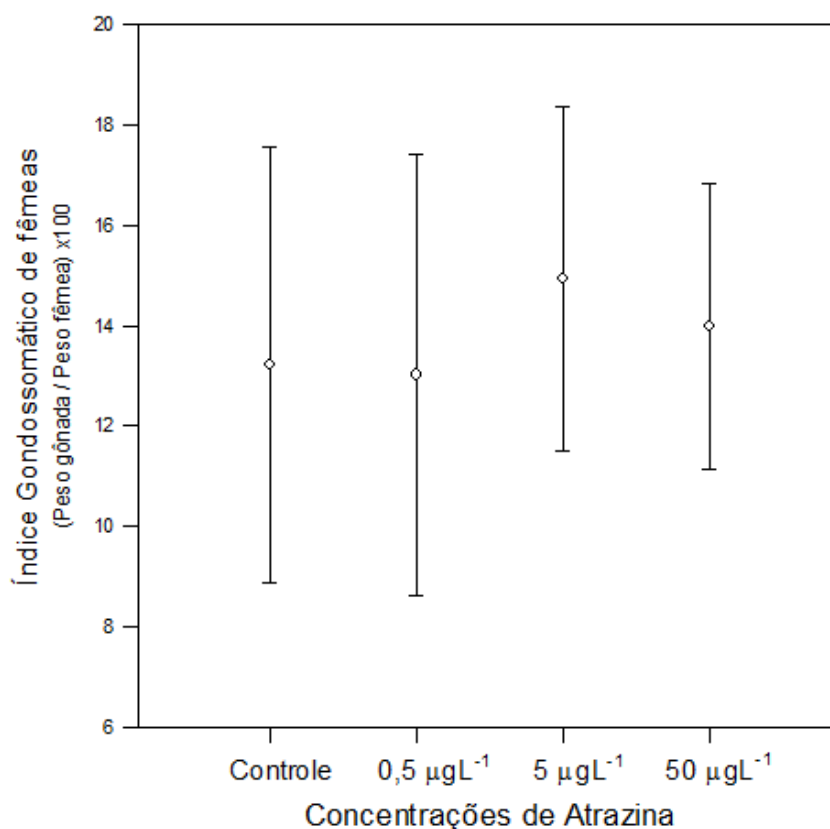
14,9

lias de 13,0;  
50 µg/L⁻¹,

respectivamente. Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa com o Controle, que obteve uma média de 13,2 foi possível observar um aumento de 12,8%

desse índice na concentração de  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  e de  $5,3\%$  em  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ , quando comparadas ao Controle (ANOVA,  $P = 0,704$ ) (Figura 18).

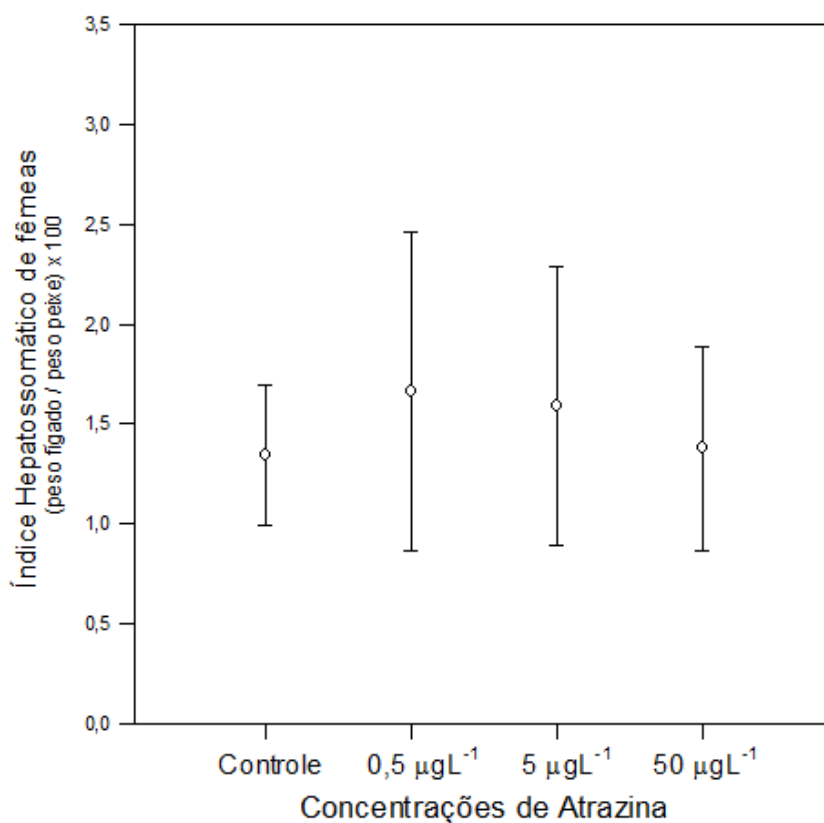
**Figura 18:** Índice Gonadosomático (média  $\pm$  desvio padrão), de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara*, expostas a diferentes concentrações,  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 30 dias (ANOVA,  $P = 0,704$ ).



### III.3.3 Índice Hepatosomático

Quanto ao índice hepatossomático, as fêmeas apresentaram médias de 1,66; 1,58 e 1,37 nas concentrações de  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0 \mu\text{gL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ , respectivamente. Quando comparados com o tratamento Controle, que obteve uma média de 1,34, não foi observado diferença estatisticamente significativa com o mesmo (ANOVA,  $P = 0,613$ ) (Figura 19).

**Figura 19:** Índice Hepatossomático (média  $\pm$  desvio padrão), de fêmeas da espécie *Poecilia vivipara*, expostas a diferentes concentrações,  $0,5\mu\text{gL}^{-1}$ ,  $5,0\mu\text{gL}^{-1}$  e  $50\mu\text{gL}^{-1}$ , do herbicida atrazina durante 30 dias (ANOVA,  $P = 0,613$ ).



### III.4. DISCUSSÃO

A capacidade de organismos para sobreviver até a idade reprodutiva exige que eles realizem respostas comportamentais adequadas às mudanças no seu ambiente. O comportamento é um determinante essencial do sucesso reprodutivo e, como tal, é um alvo importante para a seleção natural, que pode atuar no modo e na forma de comportamentos espécie-específicos (SOLOMON et al., 2008). O ambiente global está

cada vez mais carregado com produtos químicos antropogênicos derivados e seus produtos de degradação, e muitos destes compostos, incluindo os produtos contendo atrazina, têm sido indicados por afetar adversamente uma ampla variedade de organismos (CHAPMAN, 1992; NEUMAN-LEE and JANZEN, 2011). Atrazina já foi relatada demonstrando efeitos sobre o sistema reprodutivo nos quatro principais grupos de vertebrados, mamíferos (COOPER et al., 2007), anfíbios (HAYES, 2005), répteis (NEUMAN-LEE and JANZEN, 2011) e peixes (ROHR and MCCOY, 2010). Neste estudo, exploramos os possíveis impactos de níveis ambientalmente relevantes da atrazina em condições ecologicamente realistas em um conjunto de parâmetros relacionados ao comportamento reprodutivo em juvenis da espécie *Poecilia vivipara*. Duas avaliações foram realizadas durante os 30 dias de exposição, uma no 14º dia e outra ao final do 30º dia, resultando num maior esclarecimento dos parâmetros avaliados em cada grupo analisado.

A tentativa de cópula em poecilídeos é a estratégia utilizada pelo macho para a transferência de esperma. No presente estudo foram detectadas reduções dessas tentativas de cópula relativas aos controles de 64 % na concentração  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $p > 0,05$ ) e de 76 % na concentração  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). SHENOY (2012) expôs machos adultos de *Poecilia reticulata* a concentrações de 1 e  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina por aproximadamente 120 dias, e detectou uma redução no número de displays sigmóides em ambas as concentrações testadas. Entretanto, estes autores não detectaram redução nas tentativas de cópula nestas mesmas concentrações. Apesar da redução nas tentativas de cópula de 64% detectada neste estudo em  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  não ter sido estatisticamente significativa, isto sugere que *P. vivipara* seja mais sensível a atrazina que *P. reticulata* para o parâmetro tentativa de cópula, que é fundamental para a efetiva fertilização das fêmeas. Num outro estudo, SHENOY (2014) expôs filhotes de *Poecilia reticulata* durante o período gestacional (ou seja, dentro da barriga das fêmeas) a concentrações de 1 e  $13,5 \mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina, e verificou que após atingirem a idade adulta, os machos apresentaram reduções significativas no número de displays sigmóides e de tentativas de cópula em ambas as concentrações de exposição, demonstrando o potencial desse herbicida de afetar o comportamento reprodutivo de machos poecilídeos, mesmo que sejam expostos em útero na fase de desenvolvimento embrionário.

O mecanismo de ação da atrazina em peixes ainda tem sido amplamente discutido em diversos estudos, porém, uma das explicações mais aceitas sugere que a atrazina regula positivamente a produção da enzima aromatase, que em peixes é essencial para a

conversão da testosterona em estradiol (HAYES et al., 2011). Com a indução da aromatase, ocorre um aumento na taxa de conversão da testosterona em estradiol, e com isso os níveis de testosterona, no caso de peixes teleósteos da 11-ketotestosterona, reduzem podendo afetar o desenvolvimento de características sexuais secundárias e os comportamentos reprodutivos (SOLOMON et al., 2008; SHENOY, 2014), resultando na feminização ou desmasculinização dos mesmos (MILNES et al., 2006).

Em peixes, uma grande diversidade de contaminantes pode afetar o desempenho natatório e comprometer a capacidade de escapar dos predadores (LITTLE et al., 1990; WEIS et al., 2001b; ØVERLI et al., 2002; KAVITHA and VENKATESWARA RAO, 2007). Mudanças abruptas na atividade natatória podem ser avaliadas qualitativamente, já as mudanças sutis, decorrentes de exposições subletais, só podem ser detectadas através de uma análise mais detalhada desta resposta (LITTLE et al., 1990). Neste estudo, a atividade natatória de machos e fêmeas foi avaliada após 14 e 30 dias de exposição a concentrações de 0,5, 5,0 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina. Em geral, foi observado um aumento significativo, ou seja, uma hiperatividade natatória tanto nos machos quanto nas fêmeas expostas. As fêmeas apresentaram uma hiperatividade significativa em todas as concentrações de exposição. Já nos machos essa hiperatividade só foi significativa na concentração de 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A hiperatividade na atividade natatória também foi vista por DEL CARMEN ALVAREZ and FUIMAN (2005) que expôs larvas de *Sciaenops ocellatus* a concentrações de 40 e 80  $\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina por 4 dias. Em ambas as concentrações, as larvas exibiram elevadas velocidades de natação e nadaram por caminhos mais complicados que as larvas do controle. Já SAGLIO and TRIJASSE (1998) observaram aumentos significativos na natação explosiva (impulso repentino não direcionado, seguido da imobilização do peixe) e da natação de superfície (abertura da boca na superfície da coluna d'água) em *Carassius auratus* após 24 horas de exposição a concentrações de 0,5, 5,0 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina. Padrões de atividade natatória podem influenciar na predação: presas hiperativas tendem a ser mais visíveis, portanto, podem ser mais vulneráveis à predação (WEIS et al., 2001b). A hiperatividade encontrada na atividade natatória de peixes causada pela atrazina nesse estudo foi semelhante às alterações induzidas pela mesma na atividade locomotora de anfíbios (EHRSAM et al., 2016) e mamíferos (ROHR and MCCOY, 2010; BARDULLAS et al., 2011).

O índice gonadosomático (IGS) é uma expressão do peso da gônada em relação ao peso total do corpo do animal, portanto, um potencial indicador de desenvolvimento



ou anormalidades sexuais (VAN DER KRAAK et al., 2014). Assim como o IGS, o número de ovócitos maduros também é um parâmetro bastante utilizado para avaliar a capacidade reprodutiva de fêmeas. No presente estudo o IGS não foi afetado após 30 dias de exposição à atrazina em nenhuma das concentrações de exposição (0,5, 5,0 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Segundo VAN DER KRAAK et al. (2014) essa falta de resposta do IGS a atrazina já tem sido relatada para outras espécies de peixes como *Pimephales promelas* (BRINGOLF et al., 2004), *Carassius auratus* (SPANÒ et al., 2004) e *Oryzias latipes* (PAPOULIAS et al., 2014). Entretanto, PAPOULIAS et al. (2014) e TILLITT et al. (2010) evidenciaram o potencial da atrazina em causar redução na produção de ovos em fêmeas de *Oryzias latipes* e de *Pimephales promelas*, respectivamente, expondo as fêmeas a concentrações e tempos de exposição (aproximadamente 30 dias) a atrazina idênticas às utilizadas neste estudo. Este trabalho não detectou diferença na produção de ovócitos maduros nas fêmeas de *P. vivipara* expostas às mesmas concentrações, indicando uma menor sensibilidade desta espécie a este importante efeito relevante a nível populacional. Cabe salientar que as estratégias reprodutivas de *Oryzias latipes* e *Pimephales promelas* são bem distintas, sendo que ambas as espécies são ovíparas e apresentam fertilização externa, ovulando e desovando óvulos para serem fertilizados pelos machos em intervalos reduzidos, sendo que durante todo o período de exposição o processo de ovogênese estava se processando desde o estágio de ovócitos primários. Por outro lado, *P. vivipara* apresenta desenvolvimento por ovoviviparidade e fertilização interna, e é possível que as fêmeas utilizadas neste experimento, apesar de virgens e apresentarem a mesma idade, já houvessem ovulado antes ou nas fases iniciais da exposição à atrazina, e portanto, não teriam sofrido os efeitos relatados acima durante o processo de ovogênese, de redução da produção de ovos.

Dos índices orgão-somáticos, o IHS, ou índice hepatossomático, é o mais associado com a exposição de contaminantes, sendo nada mais do que o peso do fígado expresso como uma porcentagem do peso total do corpo (SCHMITT and DETHLOFF, 2000). Neste estudo o IHS das fêmeas não apresentou diferença estatística com o controle, porém, verificou-se um pequeno aumento de 23,8% e 17,8% nas concentrações 0,5 e 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina, respectivamente. Esse aumento do IHS também foi detectado por YANG et al. (2010) que expuseram machos e fêmeas de *Grobiolepis rarus* a concentrações de 3, 10, 33, 100, 333  $\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina por 28 dias.

### III.5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram efeitos adversos do herbicida atrazina no comportamento sexual de cópula entre machos e fêmeas da espécie *Poecilia vivipara*. Parâmetros reprodutivos como os índices organossomáticos (IGS e IHS) e número de ovócitos não foram significativamente alterados nas fêmeas expostas. A exposição à atrazina aumentou a velocidade natatória tanto nos machos como nas fêmeas, tornando os animais afetados hiperativos, o que pode estar relacionado à diminuição das tentativas de cópula dos machos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERNI, H.R., KLOBER, B., RUTISHAUSER, B.V., WETTSTEIN, F.E., FISCHER, R., GIGER, W., HUNGERBUHLER, A., MARAZUELA, M.D., PETER, A., SCHONENBERGER, R., VOGELI, A.C., SUTER, M.J.F., EGGEN, R.I.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 688-696.

ALKIMIN, G.D., 2016. Toxicidade de cádmio e zinco em *Danio rerio*: comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática e a potencial atuação como interferentes endócrinos. *Ciências Ambientais*. Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, p. 100.

AMARAL, M.D.C., BONECKER, A.C.T., ORTIZ, C.H.D., 2001. Activity determination of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase and Mg <sup>++</sup> ATPase enzymes in the gill of poedlia vivipara (osteichthyes, cyprinodontiformes) in different salinities. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44, 1-6.

AMORIM, L.C.A., 2003. Biomarcadores e sua avaliação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 6, 158-170.

ANGUS, R.A., STANKO, J., JENKINS, R.L., WATSON, R.D., 2005. Effects of 17 - ethynylestradiol on sexual development of male western mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140, 330-339.

ATKINSON, S.K., MARLATT, V.L., KIMPE, L.E., LEAN, D.R.S., TRUDEAU, V.L., BLAIS, J.M., 2011. Environmental factors affecting ultraviolet photodegradation rates and estrogenicity of estrone and ethinylestradiol in natural waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 1-7.

AZEVEDO, V.C., 2013. Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades. *Ciências Fisiológicas*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 88.

BAATRUP, E., 2009. Measuring Complex Behavior Patterns in Fish: Effects of Endocrine Disruptors on the Guppy Reproductive Behavior. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 53 - 62.

BAATRUP, E., BAYLEY, M., 1993. Quantitative analysis of spider locomotion employing computer-automated video tracking. *Physiol Behav* 54, 83-90.

BAATRUP, E., HENRIKSEN, P.G., 2015. Disrupted reproductive behavior in unexposed female zebrafish (*Danio rerio*) paired with males exposed to low concentrations of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2). *Aquat Toxicol* 160, 197-204.

BAATRUP, E., JUNGE, M., 2001. Antiandrogenic Pesticides Disrupt Sexual Characteristics in the Adult Male Guppy (*Poecilia reticulata*). *Environ Health Perspect* 109.

- BARDULLAS, U., GIORDANO, M., RODRIGUEZ, V.M., 2011. Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicol Teratol* 33, 263-272.
- BARTELL, S.M., BRAIN, R.A., HENDLEY, P., NAIR, S.K., 2013. Modeling the potential effects of atrazine on aquatic communities in midwestern streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 2402-2411.
- BAYLEY, M., NIELSEN, J.R., BAATRUP, E., 1999. Guppy Sexual Behavior as an Effect Biomarker of Estrogen Mimics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 68-73.
- BEITINGER, T.L., 1990. Behavioral Reactions for the Assessment of Stress in Fishes. *Journal of Great Lakes Research* 16, 495-528.
- BERGMAN, A.H.J., JOBLING, S., KIDD, K.A., ZOELLER, R.T., 2013. The state of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. In: (WHO), U.N.E.P.U.a.W.H.O. (Ed.). *Inter-organization programme for the sound management of chemicals*.
- BERTOLETTI, E., 2009. Determinação da Ecotoxicidade Crônica para *Danio rerio*. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 4, 1-7.
- BILA, D.M., DEZOTTI, M., 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova* 30, 651-666.
- BILLARD, R., BRETON, B., RICHARD, M., 1981. On the inhibitory effect of some steroids on spermatogenesis in adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Zoology* 59, 1479-1487.
- BISAZZA, A., PILASTRO, A., PALAZZI, R., MARIN, G., 1996. Sexual behaviour of immature male eastern mosquitofish: a way to measure intensity of intra-sexual selection? *Journal of fish biology* 48, 726-737.
- BREWER, S.K., LITTLE, E.E., DELONAY, A.J., BEAUVAIS, S.L., JONES, S.B., ELLERSIECK, M.R., 2001. Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Arch Environ Contam Toxicol* 40, 70-76.
- BRIAN, J.V., HARRIS, C.A., SCHOLZE, M., KORTENKAMP, A., BOOY, P., LAMOREE, M., POJANA, G., JONKERS, N., MARCOMINI, A., SUMPTER, J.P., 2007. Evidence of Estrogenic Mixture Effects on the Reproductive Performance of Fish. *Environmental Science & Technology* 41, 337-344.
- BRIDGES, C.M., 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1935-1939.

BRINGOLF, R.B., BELDEN, J.B., SUMMERFELT, R.C., 2004. Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1019-1025.

CHAMBEL, J.H.M., 2011. Contribuição para o estudo da remoção em ETAR de 17 - estradiol e de 17 -etinilestradiol no tratamento biológico. Engenharia ambiental. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

CHAPMAN, R., 1992. Horticultural pesticide residues in water : a review of the potential for water contamination by pesticides used in the vegetable industry in Victoria / R.N. Chapman, J.W. Stranger. Dept. of Food and Agriculture, [East Melbourne].

COE, T.S., SÖFFKER, M.K., FILBY, A.L., HODGSON, D., TYLER, C.R., 2010. Impacts of Early Life Exposure to Estrogen on Subsequent Breeding Behavior and Reproductive Success in Zebrafish. *Environmental Science & Technology* 44, 6481-6487.

COLBORN, T., DUMANOSKI, D., MEYERS, P., 1996. *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? A Scientific Detective Story*. Dutton Penguin Books VSA, New York.

CONAMA, 2005. Resolução n° 357/05. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. SEMA, Brasília.

COOPER, R.L., LAWS, S.C., DAS, P.C., NAROTSKY, M.G., GOLDMAN, J.M., LEE TYREY, E., STOKER, T.E., 2007. Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 80, 98-112.

CORREIA, A.D.G., GONÇALVES, R., SCHOLZE, M., FERREIRA, M., HENRIQUES, M.A.R., 2007. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347, 109-122.

DEL CARMEN ALVAREZ, M., FUIMAN, L.A., 2005. Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. *Aquat Toxicol* 74, 229-241.

DENSLOW, N.D., CHOW, M.C., KROLL, K.J., GREEN, L., 1999. Vitellogenin as a Biomarker of Exposure for Estrogen or Estrogen Mimics. *Ecotoxicology* 8, 385-398.

DESBROW, C., ROUTLEDGE, E.J., BRIGHTY, G.C., SUMPTER, J.P., WALDOCK, M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. I - Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* 32, 1549-1558.

DOYLE, C.J., LIM, R.P., 2002. The effect of 17beta-estradiol on the gonopodial development and sexual activity of *Gambusia holbrooki*. *Environ Toxicol Chem* 21, 2719-2724.

DOYLE, C.J., LIM, R.P., 2005. Sexual behavior and impregnation success of adult male mosquitofish following exposure to 17 -estradiol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 392-397.

EDSTAC, 1998. ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING AND TESTING ADVISORY COMMITTEE (EDSTAC). Final Report.

EHRSAM, M., KNUTIE, S.A., ROHR, J.R., 2016. The herbicide atrazine induces hyperactivity and compromises tadpole detection of predator chemical cues. *Environmental Toxicology and Chemistry*, n/a-n/a.

ENDLER, J.A., 1987. Predation, light intensity and courtship behaviour in *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Animal Behaviour* 35, 1376-1385.

ESCUADERO, M., 2010. Sensibilidad Química Múltiple, Enfermedad Ambiental Emergente. *Revista enfermária Castilla y León* 2, 26-40.

EVANS, J.P., PITCHER, T.E., MAGURRAN, A.E., 2002. The ontogeny of courtship, colour and sperm production in male guppies. *Journal of Fish Biology* 60, 495-498.

FAN, W., YANASE, T., MORINAGA, H., GONDO, S., OKABE, T., NOMURA, M., KOMATSU, T., MOROHASHI, K., HAYES, T., TAKAYANAGI, R., NAWATA, H., 2007. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives* 115, 720-727.

FARIA, J.C.N.M., 2009. Avaliação Histopatológica, Histoquímica e Morfométrica dos efeitos da toxicidade aguda do herbicida Roundup nas brânquias e no fígado do peixe *Poecilia vivipara*. *Biologia*. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p. 43.

FERREIRA, E.C., 2012. Identificação e análise da transcrição diferencial de genes em peixes *Poecilia vivipara* expostos ao herbicida atrazina. *Biotechnology e biociências*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 59.

FISHER, L.G.P., PEREIRA, L.E.D., VIEIRA, J.P., 2004. Peixes estuarinos e costeiros. *Série Biodiversidade do Atlântico sudoeste*. Editora Ecoscientia 126.

GHISELLI, G., 2006. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). *Instituto de Química*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p. 190 f.

GHISELLI, G., JARDIM, W.F., 2007. Interferentes Endócrinos no ambiente. *Química Nova* 30, 695-706.

GOMES, J.L., MONTEIRO, L.R., 2008. Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): test of an ecomorphological paradigm. *Biological Journal of the Linnean Society* 93, 799-812.

GRAYMORE, M., STAGNITTI, F., ALLINSON, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International* 26, 483-495.

HAYES, T.B., 2005. Welcome to the Revolution: Integrative Biology and Assessing the Impact of Endocrine Disruptors on Environmental and Public Health. *Integrative and Comparative Biology* 45, 321-329.

HAYES, T.B., ANDERSON, L.L., BEASLEY, V.R., DE SOLLA, S.R., IGUCHI, T., INGRAHAM, H., KESTEMONT, P., KNIEWALD, J., KNIEWALD, Z., LANGLOIS, V.S., LUQUE, E.H., MCCOY, K.A., MUNOZ-DE-TORO, M., OKA, T., OLIVEIRA, C.A., ORTON, F., RUBY, S., SUZAWA, M., TAVERA-MENDOZA, L.E., TRUDEAU, V.L., VICTOR-COSTA, A.B., WILLINGHAM, E., 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 127, 64-73.

HECKER, M., PARK, J., MURPHY, M.B., JONES, P.D., SOLOMON, K.R., VAN DER KRAAK, G., CARR, J.A., SMITH, E.E., DU PREEZ, L., KENDALL, R.J., GIESY, J.P., 2005. Effects of atrazine on CYP19 gene expression and aromatase activity in testes and on plasma sex steroid concentrations of male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Toxicological Sciences* 86, 273-280.

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. *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1, 106-114.

JAVARONI, R.D.C.A., LANDGRAF, M.D., REZENDE, M.O.O., 1999. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. *Química Nova* 22, 58-64.

JESUS, T.B., CARVALHO, C.E.V., 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para a avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis* 12, 680-693.

JOBLING, S., WILLIAMS, R., JOHNSON, A., TAYLOR, A., GROSS-SOROKIN, M., NOLAN, M., TYLER, C.R., VAN AERLE, R., SANTOS, E., BRIGHTY, G., 2006. Predicted Exposures to Steroid Estrogens in U.K. Rivers Correlate with Widespread Sexual Disruption in Wild Fish Populations. *Environmental Health Perspectives* 114, 32-39.

JOBLING, S.N., NOLAN, M., TYLER, C.R., BRIGHTY, G., SUMPTER, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* 32, 2498-2506.

JOHNS, S.M., DENSLOW, N.D., KANE, M.D., WATANABE, K.H., ORLANDO, E.F., SEPÚLVEDA, M.S., 2011. Effects of estrogens and antiestrogens on gene expression of fathead minnow (*Pimephales promelas*) early life stages. *Environmental Toxicology* 26, 195-206.

JOHNSON, A., BELFROID, A., DI CORCIA, A., 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment* 256, 163-173.

JURGENS, M.D., HOLTHAUS, K.I.E., JOHNSON, A.C., SMITH, J.J.L., HETHERIDGE, M., WILLIAMS, R.J., 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 480-488.

KANE, A.S., SALIERNO, J.D., BREWER, S.K., 2005. Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. In: Ostrander, G. (Ed.). *Methods in Aquatic Toxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL., pp. Chapter 32:559-590.

KANE, A.S., SALIERNO, J.D., GIPSON, G.T., MOLTEÑO, T.C.A., HUNTER, C., 2004. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. *Water Research* 38, 3993-4001.

KASUMYAN, A.O., 2001. Effects of Chemical Pollutants on Foraging Behavior and Sensitivity of Fish to Food Stimuli *Journal of Ichthyology* 41, 76-87.

KAVITHA, P., VENKATESWARA RAO, J., 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87, 182-188.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8897-8901.

KIME, D.E. (Ed.), 1998. *Endocrine disruption in fish*. Kluwer Acad. Publ., Norwell, MA, USA.

KREUTZ, L.C., BARCELLOS, L.J., DOS SANTOS, E.D., PIVATO, M., ZANATTA, R., 2012. Innate immune response of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to atrazine. *Fish & shellfish immunology* 33, 1055-1059.

KRISTENSEN, T., BAATRUP, E., BAYLEY, M., 2005. 17  $\alpha$ -Ethinylestradiol Reduces the Competitive Reproductive Fitness of the Male Guppy (*Poecilia reticulata*). *Biology of Reproduction* 72, 150-156.

KUSTER, M., AZEVEDO, D.D.A., DE ALDA, M.L., NETO, F.A., BARCELÓ, D., 2009. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environment international* 35, 997-1003.

LANGE, R., HUTCHINSON, T.H., CROUDACE, C.P., SIEGMUND, F., SCHWEINFURTH, H., HAMPE, P., PANTER, G.H., SUMPTER, J.P., 2001. Effects of the synthetic estrogen 17  $\alpha$ -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20, 1216-1227.



LARSSON, D.G.J., ADOLFSSON-ERICI, M., PARKKONEN, J., PETTERSSON, M., BERG, A.H., OLSSON, P.E., FÖRLIN, L., 1999. Ethinylloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology* 45, 91-97.

Lichota, G.B., McAdie, M., Ross, P.S., 2004. Endangered Vancouver Island marmots (*Marmota vancouverensis*): Sentinels of atmospherically delivered contaminants to British Columbia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 402-407.

LIMA, D.R.S., AFONSO, R.J.C.F., LIBÂNIO, M., AQUINO, S.F.D., 2014. Avaliação da remoção de fármacos e de desreguladores endócrinos em águas de abastecimento por clarificação em escala de bancada. 37, 783-788.

LINTELMANN, J.K., KATAYAMA, A., KURIHARA, N., SHORE, L., WENZEL, A., 2003. Endocrine Disruptors in the environment. *Pure Applied Chemistry* 75, 6316681.

LITTLE, E.E., ARCHESKI, R.D., FLEROV, B.A., KOZLOVSKAYA, V.I., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology* 19, 380-385.

LITTLE, E.E., BREWER, S.K., 2001. Neurobehavioral toxicity in fish. In: SCHLENK, D., BENSON, W.H. (Eds.). *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts New Perspectives: Toxicology and the Environment*. Taylor and Francis, London.

LITTLE, E.E., FINGER, S.E., 1990. Swimming Behavior as an Indicator of Sublethal Toxicity in Fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13-19.

LITTLE, E.E., FLEROV, B.A., RUZHINSKAYA, N.N., 1985. Behavioral Approaches in Aquatic Toxicity Investigations: A Review. In: Mehrle, P.M.J., Gray, R.H., Kendall, R.L. (Eds.). *Toxic Substances in the Aquatic Environment*. American Fisheries Society, pp. 72-98.

MAGALHÃES, D.P., FERRÃO FILHO, A.S., 2008. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomanitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* 12, 355-381.

MANDIKI, S.N.M., GILLARDIN, V., MARTENS, K., ERCKEN, D., DE ROECK, E., DE BIE, T., DECLERCK, S.A.S., DE MEESTER, L., BRASSEUR, C., VAN DER HEIDEN, E., SCHIPPO, M., Patrick KESTEMONT, P., 2014. Effect of land use on pollution status and risk of fish endocrine disruption in small farmland ponds. *Hydrobiologia* 723, 1036120.

MANRIQUE, W.G., 2009. Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o guaru (*poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático. Centro de aquicultura da UNESP. Universidade Estadual Paulista - campus de Jaboticabal, São Paulo, p. 56.

MCLACHLAN, J.A., 1980. *Estrogens in the environment*. Elsevier, New York.

MELO, L.E., 2013. Desregulação endócrina e avaliação de parâmetros comportamentais em *Poecilia vivipara* expostos a 17  $\alpha$ -ethinilestradiol. *Zoologia*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 50.

- MILNES, M.R., BERMUDEZ, D.S., BRYAN, T.A., EDWARDS, T.M., GUNDERSON, M.P., LARKIN, I.L.V., MOORE, B.C., GUILLETTE JR, L.J., 2006. Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environmental Research* 100, 3-17.
- NEUMAN-LEE, L.A., JANZEN, F.J., 2011. Atrazine exposure impacts behavior and survivorship of neonatal turtles. *Herpetologica* 67, 236-31.
- ØVERLI, Ø., KOTZIAN, S., WINBERG, S., 2002. Effects of Cortisol on Aggression and Locomotor Activity in Rainbow Trout. *Hormones and Behavior* 42, 53-61.
- PAIVA, A.C.G.D., CHAVES, P.D.T.D.C., ARAÚJO, M.E.D., 2008. Estrutura e organização trófica da ictiofauna de águas rasas em um estuário tropical. *Revista Brasileira de Zoologia* 25, 647-661.
- PAPOULIAS, D.M., TILLITT, D.E., TALYKINA, M.G., WHYTE, J.J., RICHTER, C.A., 2014. Atrazine reduces reproduction in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 154, 230-239.
- PAULINO, M.G., SAKURAGUI, M.M., FERNANDES, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86, 1-7.
- RAUT, S.A., ANGUS, R.A., 2010. Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 1287-1291.
- READMAN, J.W., ALBANIS, T.A., BARCELO, D., GALASSI, S., TRONCZYNSKI, J., GABRIELIDES, G.P., 1993. Herbicide contamination of Mediterranean estuarine waters: Results from a MED POL pilot survey. *Marine Pollution Bulletin* 26, 613-619.
- REIS FILHO, R.W., ARAÚJO, J.C., VIEIRA, E.M., 2006. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioáticos. *Química Nova* 29, 817-822.
- ROHR, J.R., MCCOY, K.A., 2010. A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environ Health Perspect* 118, 20-32.
- ROMÉO, M., GIAMBÉRINI, L., 2013. History of Biomarkers, *Ecological Biomarkers*. CRC Press, 15-44.
- SAARISTO, M., CRAFT, J.A., LEHTONEN, K.K., LINDSTRÖM, K., 2009. Sand goby (*Pomatoschistus minutus*) males exposed to an endocrine disrupting chemical fail in nest and mate competition. *Hormones and Behavior* 56, 315-321.
- SAGLIO, P., TRIJASSE, S., 1998. Behavioral Responses to Atrazine and Diuron in Goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 484-491.

- SALABERRIA, I., HANSEN, B.H., ASENSIO, V., OLSVIK, P.A., ANDERSEN, R.A., JENSSEN, B.M., 2009. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 234, 98-106.
- SALIERNO, J.D., KANE, A.S., 2009. 17 -Ethinylestradiol alters reproductive behaviors, circulating hormones, and sexual morphology in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 953-961.
- SÁNCHEZ-CAMAZANO, M., RODRÍGUEZ-CRUZ, S., SÁNCHEZ-MARTÍN, M.J., 2003. Evaluation of Component Characteristics of Soil Surfactant Herbicide System That Affect Enhanced Desorption of Linuron and Atrazine Preadsorbed by Soils. *Environmental Science & Technology* 37, 2758-2766.
- SANTOS, E.P., 1978. Dinâmica de populações aplicada à pesca e piscicultura. Hucitec/Edusp, São Paulo.
- SCHMITT, C.J., DETHLOFF, G.M., 2000. Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: Selected Methods for Monitoring Chemical Contaminants and their Effects in Aquatic Ecosystems. Technical Report Series, 81.
- SCHNURSTEIN, A., BRAUNBECK, T., 2001. Tail moment versus tail length-application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 49, 187-196.
- SCHOTTLER, S.P., EISENREICH, S.J., CAPEL, P.D., 1994. Atrazine, Alachlor, and Cyanazine in a Large Agricultural River System. *Environmental Science & Technology* 28, 1079-1089.
- SCOTT, G.R., SLOMAN, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.
- SHENOY, K., 2012. Environmentally Realistic Exposure to the Herbicide Atrazine Alters Some Sexually Selected Traits in Male Guppies. *PLoS ONE* 7, 1-10.
- SHENOY, K., 2014. Prenatal exposure to low doses of atrazine affects mating behaviors in male guppies. *Horm Behav* 66, 439-448.
- SHINN, C., SANTOS, M.M., LEK, S., GRENOUILLET, G., 2015. Behavioral response of juvenile rainbow trout exposed to an herbicide mixture. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 112, 15621.
- SODRÉ, F.F., MONTAGNER, C.C., LOCATELLI, M.A.F., JARDIM, W.F., 2007. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol* 2, 187-196.

- SODRÉ, F.F., PESCARA, I.C., MONTAGNER, C.C., JARDIM, W.F., 2010. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal* 96, 92-98.
- SOLOMON, K.R., CARR, J.A., DU PREEZ, L.H., GIESY, J.P., KENDALL, R.J., SMITH, E.E., VAN DER KRAAK, G.J., 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Crit Rev Toxicol* 38, 721-772.
- SOUZA, J.R.B., CARVALHO, P.S.M., 2009. *Bioindicadores e Biomarcadores no sistema bético*. Editora da UFPE, Recife.
- SPANÒ, L., TYLER, C.R., AERLE, R.V., DEVOS, P., MANDIKI, S.N.M., SILVESTRE, F., THOMÉ, J.-P., KESTEMONT, P., 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology* 66, 369-379.
- SUN, K., GAO, B., ZHANG, Z., ZHANG, G., ZHAO, Y., XING, B., 2010. Sorption of atrazine and phenanthrene by organic solids fractions in soil and sediment. *Environmental Pollution* 158, 3520-3526.
- SUN, L., ZHA, J., WANG, Z., 2009. Effects of binary mixtures of estrogen and antiestrogens on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic toxicology* 93, 83-89.
- TERNES, T.A., STUMPF, M., MUELLER, J., HABERER, K., WILKEN, R.D., SERVOS, M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of The Total Environment* 225, 81-90.
- THORPE, K.L., CUMMINGS, R.I., HUTCHINSON, T.H., SCHOLZE, M., BRIGHTY, G., SUMPTER, J.P., TYLER, C.R., 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ Sci Technol* 37, 1142-1149.
- THORPE, K.L., MAACK, G., BENSTEAD, R., TYLER, C.R., 2009. Estrogenic Wastewater Treatment Works Effluents Reduce Egg Production in Fish. *Environmental Science & Technology* 43, 2976-2982.
- TIAN, H., LI, Y., WANG, W., WU, P., RU, S., 2012. Exposure to monocrotophos pesticide during sexual development causes the feminization/demasculinization of the reproductive traits and a reduction in the reproductive success of male guppies (*Poecilia reticulata*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 263, 163-170.
- TILLITT, D.E., PAPOULIAS, D.M., WHYTE, J.J., RICHTER, C.A., 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* 99, 149-159.
- TOFT, G., BAATRUP, E., 2003. Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 17[beta]-estradiol and 4-tert-octylphenol during sexual development. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 228-237.

TRUHAUT, R., 1977. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1, 151-173.

TYLER, C.R., JOBLING, S., SUMPTER, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology* 28, 319-361.

TYLER, C.R., SUMPTER, J.P., KAWAUCHI, H., SWANSON, P., 1991. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes. *General and Comparative Endocrinology* 84, 291-299.

VAJDA, A.M., BARBER, L.B., GRAY, J.L., LOPEZ, E.M., WOODLING, J.D., NORRIS, D.O., 2008. Reproductive Disruption in Fish Downstream from an Estrogenic Wastewater Effluent. *Environmental Science & Technology* 42, 3407-3414.

VAN DER KRAAK, G.J., HOSMER, A.J., HANSON, M.L., KLOAS, W., SOLOMON, K.R., 2014. Effects of Atrazine in Fish, Amphibians, and Reptiles: An Analysis Based on Quantitative Weight of Evidence. *Critical Reviews in Toxicology* 44, 1-66.

VAN DER VEN, L.T.M., HOLBECH, H., FENSKE, M., VAN DEN BRANDHOF, E.J., GIELIS-PROPER, F.K., WESTER, P.W., 2003. Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: evaluation by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation. *Aquatic Toxicology* 65, 1-11.

VASANTH, S., ARUL, G., KARTHIKEYENI, S., KUMAR, T.S.V., VIGNESH, V., MANIMEGALAI, M., BUPESH, G., THIRUMURUGAN, R., SUBRAMANIAN, P., 2015. Influence of triazine herbicide exposure on guppies (*Poecilia sphenops*) aromatase activities, altered sex steroid concentration and vitellogenin induction. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 77, 156-162.

VAZZOLER, A.E.A.M., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática*. EDUEM/SBI, Maringá.

VEIGA, M.M., 2007. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. *Ciências & Saúde Coletiva* 12, 145-152.

WALKER, G.H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M., PEAKALL, D.B. (Eds.), 2005. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis, London, UK, Third Edition.

WEIS, J.S., SAMSON, J., ZHOU, T., SKURNICK, J., WEIS, P., 2001a. Prey capture ability of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a behavioral biomarker for contaminants in estuarine systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 1442-1452.

WEIS, J.S., SMITH, G., ZHOU, T., SANTIAGO-BASS, C., WEIS, P., 2001b. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences: Killifish from a contaminated site are slow to capture prey and escape predators; altered neurotransmitters and thyroid may be responsible for this behavior, which may produce population changes in the fish and their major prey, the grass shrimp. *BioScience* 51, 209-217.

WU, B., ZHANG, X.X., ZHANG, X.L., YASUN, A.S.J., ZHANG, Y., ZHAO, D.Y., 2009. Semi-volatile organic compounds and trace elements in the Yangtze River source of drinking water. *Ecotoxicology* 84, 466-50.

YACUBIAN-FERNANDES, A., DUCATI, L.G., SILVA, M.V., ABRAMIDES, D.V., PEROSA, G.B., PALHARES, A., GABARRA, R.C., GIGLIO, A., PORTELA, L., MARINELLO, J.L., PLESE, J.P., ZANINI, S.A., 2007. [Crouzon syndrome: factors related to the neuropsychological development and to the quality of life]. *Arq Neuropsiquiatr* 65, 467-471.

YANG, L., ZHA, J., ZHANG, X., LI, W., LI, Z., WANG, Z., 2010. Alterations in mRNA expression of steroid receptors and heat shock proteins in the liver of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to atrazine and p,p'-DDE. *Aquat Toxicol* 98, 381-387.

YING, G.G., KOOKANA, R.S., RU, Y.J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* 28, 545-551.

ZALA, S.M., PENN, D.J., 2004. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. *Animal Behaviour* 68, 649-664.

ZANINI, J., 2010. Estudo da remoção do herbicida atrazina por biofiltração em filtros lentos de areia e carvão ativado associada à ação microbiana. *ENGENHARIA CIVIL*. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, p. 98.