

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**PARASITOS DE PEIXES E BIOMARCADORES COMO FERRAMENTAS
PARA AVALIAÇÃO DA POLUIÇÃO EM RIOS E REPRESAS NA BACIA DO
RIO TIETÊ, ESTADO DE SÃO PAULO**

Alison Carlos Wunderlich
Orientador: Prof. Adj. Reinaldo José da Silva

Botucatu
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**PARASITOS DE PEIXES E BIOMARCADORES COMO FERRAMENTAS
PARA AVALIAÇÃO DA POLUIÇÃO EM RIOS E REPRESAS NA BACIA DO
RIO TIETÊ, ESTADO DE SÃO PAULO**

Alison Carlos Wunderlich
Orientador: Prof. Adj. Reinaldo José da Silva

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências – UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas, Área de
Concentração: Zoologia.

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Wunderlich, Alison Carlos.

Parasitas de peixes e biomarcadores como ferramentas para avaliação da poluição em rios e represas na bacia do Rio Tietê, Estado de São Paulo / Alison Carlos Wunderlich. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Reinaldo José da Silva
Capes: 21302022

1. Peixe - Parasito. 2. Indicadores (Biologia). 3. Marcadores biológicos. 4. Monitoramento biológico. 5. Toxicologia ambiental. 6. Peixe - Efeito da poluição da água. 7. Tiete, Rio (SP).

Palavras-chave: Bioindicadores; Biomarcadores; EROD; Parasitos de peixes; Rio Tietê.

***Dedico este trabalho a Érica Zica (esposa),
que foi imprescindível para este trabalho.***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Reinaldo José da Silva pela oportunidade, empenho e encorajamento nos trabalhos junto ao Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, particularmente por acreditar que este projeto poderia dar certo.

Ao meu parceiro Thiago Parente (que considero “meu coorientador”), que desde o início desde projeto tem me apoiado e me orientado nas análises da atividade da EROD com excelentes discussões e troca de ideias.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de pesquisa no país (Proc. #140359/2011-7), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela apoio concedido na forma de bolsa através do “Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior” (PDSE Proc. #13836/2013-07) e a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido na forma de auxílio (Proc. #2012/00561-0).

Aos Professores Francisco Paumgartten e Ana Cecília de-Oliveira do Laboratório de Toxicologia Ambiental da ENSP (FIOCRUZ), pela colaboração e assistências com as análises da atividade da EROD.

Aos colegas e professores Victor Vidal-Martinez, Leopoldina Aguirre-Macedo, Jorge Montero e Omar Zapata Pérez do CINVESTAV (Mérida, México), pela acolhida durante meu estágio e pela orientação nas análises dos meus dados.

Aos colegas e professor Mauro Rabelo do Laboratório BIOMA do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ), pela colaboração nas análises da atividade da EROD.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Parasitologia (Valdir, Roberto, Olga e Alessandra) pela amizade e ajuda ao longo desses anos.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (Aline Aguiar, Aline Zago, Aline Acosta, Aline “Pomba”, Lidiane Franceschini, Lidiane Firmino, Gyslaine, Heleno, Jaciara, Bel, Priscila, Maysa, Claire, Drausio, Fabrício, Fábio, Diego, Rodrigo, Luciano), pela amizade, discussões, trocas de ideais e confiança depositada ao longo desses anos.

Aos amigos e colegas Bruno, Igor, Gustavo, Danilo, Érica Boarato, César,

Geovana, Ronaldo, Ana Paulo, Hassan, Gabriela, pelo grande incentivo ao longo desses anos.

Aos colegas do Departamento de Parasitologia pela amizade e momentos de descontração.

Aos colegas e professores (Edmir *in memoriam*) do Departamento de Morfologia e do Laboratório de Biologia e Ecologia de Peixes pela amizade, apoio e momentos de descontração.

Aos funcionários da sessão de pós-graduação, pela atenção, presteza e auxílio. Sempre pude contar com vocês...obrigado!

Ao Prof. Marcelo Pinheiro pelas oportunidades e ensinamentos, que sem dúvida foram essenciais para minha formação científica. Obrigado pela confiança e amizade durante todo esse tempo.

Aos colegas, funcionários e professores do Campus Experimental do Litoral Paulista (CLP - UNESP), pelo apoio, amizade e incentivos durante minha graduação. Obrigado por transformarem a graduação num ambiente saudável e de grande motivação.

Aos meus pais Jorge e Gisela, aos irmãos Michel e Júnior, a minha “Oma” Adele, meus avôs Heinz e Ivone (*in memoriam*), aos meus tios, tias e primos, a Patrícia e minhas amáveis sobrinhas (Maria Eduarda e Helena Maria) por incentivarem sempre a percorrer meu sonho, mesmo nos momentos mais difíceis e distantes. Sem a força de vocês, certamente não teria conseguido chegar ao final dessa etapa. Grato de coração a todos!

A minha família Goiana, avô Fiuca (*in memoriam*), meus cunhados, tios, tias, primos, amigos e especialmente a Dna Vera, pelo carinho, amizade e incentivo na busca dos meus sonhos.

Aos pescadores do Rio Tietê que foram imprescindíveis para a realização deste estudo. Sem a experiência deles este trabalho certamente não seria possível.

Finalmente, agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram de alguma forma para a conquista desse título.

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
1. Introdução Geral	2
2. Referências Bibliográficas	7
Capítulo 2	16
The influence of fish size and reproductive status on ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in <i>Plagioscion squamosissimus</i> (Pisces: Sciaenidae): Implications for biomonitoring in the Tietê River, South America	16
Abstract	17
1. Introduction	18
2. Materials and methods	20
2.1 Study area	20
2.2 Fish sampling	23
2.3 Determination of maturity stages and hepatosomatic index	23
2.4 EROD activity analysis	24
2.5 Data analysis	25
3. Results	25
3.1 Water quality assessment	25
3.2 Fish morphological parameters	28
3.3 Liver EROD activity	30
4. Discussion	33
5. Conclusion	37
6. References	38

Capítulo 3	47
Parasitas de peixes como bioindicadores de impactos ambientais e moduladores da atividade da EROD em represas no Rio Tietê, Brasil	47
Abstract	48
1. Introdução	49
2. Material & Métodos	52
2.1 Área de estudo	52
2.2 Delineamento amostral	54
2.3 Coleta e processamento dos peixes	55
2.4 Coleta e identificação dos parasitos	57
2.5 Análise dos dados	58
3. Resultados	60
3.1 Análises limnológicas & qualidade da água baseado em <i>PEL-TEL</i>	60
3.2 Análises parasitológicas	62
3.2.1 <i>Plagioscion squamosissimus</i>	62
3.2.2 <i>Geophagus proximus</i>	67
3.4 Análises da EROD e sua relação com o status reprodutivo, sexo e parasitismo	70
3.4.1 <i>Plagioscion squamosissimus</i>	70
4. Discussão	73
4.1 Parasitismo e sua relação com as condições das represas	73
4.2 Parasitos de peixes como moduladores das respostas dos biomarcadores	76
5. Conclusão	78
Referências Bibliográficas	79
Capítulo 4	82
Conclusões Gerais	82

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos décadas, vários estudos têm alertado para o fato de que o acúmulo de resíduos lançados pelo homem no meio ambiente vem comprometendo gravemente a saúde dos ecossistemas aquáticos (Nriagu, 1990; Mozeto & Patella, 1997; Mozeto *et al.*, 2003; Mortatti *et al.*, 2010). Em diversas regiões brasileiras, o abastecimento de água para consumo doméstico ou industrial vem sendo seriamente comprometido, pois a maioria dos mananciais límnicos, lacustres ou fluviais apresentam-se eutrofizados e contendo substâncias tóxicas que são prejudiciais à biota e à saúde humana (Nascimento, 2003; Cetesb, 2009).

A bacia do rio Tietê é considerada a mais importante do Estado de São Paulo devido principalmente ao seu potencial hidroelétrico, o qual é bem explorado em quase toda a sua extensão de 1.100 km, desde a nascente em Salesópolis até a desembocadura no Rio Paraná (Sabesp, 2011). Com o crescimento populacional e industrial da região metropolitana de São Paulo nas últimas décadas, este rio passou a ser fortemente influenciado pela geração, sem controle, de esgotos domésticos e industriais, construção de barragens, deteriorando a qualidade de suas águas e sedimentos (Mortatti *et al.*, 2010). Como resultado disso, os metais pesados, bifenilas policloradas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas estão entre os principais poluentes das atividades industrial e agropecuária, podem ser encontrados sob diferentes formas químicas na água, sedimento e nos organismos (Elderfield *et al.*, 1990; Sholkovitz, 1992; Mortatti *et al.*, 2002, 2010). Dependendo da concentração dessas substâncias químicas no ambiente, estas podem ser tóxicas aos organismos aquáticos como peixes, crustáceos e aves, tornando-se fonte de contaminantes para o processo de bioacumulação entre os níveis tróficos (Dias & Mello, 1998; Bramorski, 2004), e também ao homem, cujo consumo de

peixes nessa bacia é muito comum (Reis *et al.* 2003; Castro-González & Méndez-Armenta, 2008).

Diante deste agravante cenário de poluição hídrica, nos últimos anos houve um aumento considerável nos estudos de ecotoxicologia no Brasil, com intuito de se compreender o efeito desta poluição sobre os ecossistemas aquáticos e sua biota, com destaque para os biomarcadores de poluição (Bainy *et al.*, 1999; Parente *et al.*, 2004; Amado *et al.*, 2006; Linde-Arias *et al.*, 2008a,b; Fonseca *et al.*, 2011; Amiard-Triquet *et al.* 2013; Santos *et al.* 2014). Esses biomarcadores tem auxiliado na avaliação da poluição e degradação dos ecossistemas aquáticos no Brasil, com destaque para os estudos de Linde-Arias *et al.* (2008a,b), Parente *et al.* (2008, 2009) e Rodrigues *et al.* (2010). A busca por métodos e técnicas mais eficientes e organismos como bioindicadores de poluição também tem despertado o interesse por parte dos pesquisadores, com destaque para o uso de parasitos de peixes (Vidal-Martínez *et al.*, 2010).

O uso de parasitos de peixes como bioindicadores de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos tem recebido considerável atenção (Poulin, 1992; Lafferty, 1997; Sures, 2004; Marcogliese, 2005; Nachev *et al.*, 2010; Vidal-Martínez *et al.*, 2010; Khan, 2011). Muitos desses estudos têm demonstrado uma estreita relação entre o parasitismo e as condições ecológicas em que os hospedeiros estão expostos, demonstrando como os parasitos podem responder as mudanças ambientais, ampliando dessa forma o conhecimento sobre a função e integridade dos ecossistemas (Hudson *et al.*, 2006; Lafferty *et al.*, 2008).

Os efeitos da poluição ambiental sobre o parasitismo podem ser tanto positivos, aumentando significativamente certas espécies de parasitos, ou negativos, sendo fatal para outros (Sures, 2008). A poluição com substâncias tóxicas tais como, metais ou bifenilas policlorados (BPCs), bem como o enriquecimento de nutrientes (eutrofização)

nos corpos hídricos, também pode afetar a ocorrência e fisiologia dos parasitos (Valtonen *et al.*, 1997; Nachev & Sures, 2009). Esses efeitos podem ser diretos (p. ex.: pela redução do número de estágios de vida livre ou do hospedeiro intermediário) ou indiretos (p. ex.: imunossupressão do hospedeiro), dependendo do tipo do poluente e ciclo de vida do parasito (Hoole, 1997; Sures, 2008; Khan, 2011). Vários estudos têm demonstrado que a poluição tóxica também causa redução da abundância e diversidade de parasitos heteroxênicos (e.g. digenéticos), embora parasitos com ciclo de vida direto (e.g. monogenoides e protozoários ciliados) sejam os menos afetados (D'Amelio & Gerasi, 1997; Diamant *et al.*, 1999). Esses últimos por serem de ciclo direto, acabam tendo mais contato com o ambiente, podendo adaptar-se mais facilmente as mudanças do meio (Valtonen *et al.*, 1997; Perez-del Olmo *et al.*, 2007). Sendo assim, as alterações da abundância e intensidade dos parasitos aquáticos, levando a mudanças na estrutura e composição da comunidade de parasitos como resposta a diferentes formas de poluição podem ser usadas com propósitos bioindicadores (Vidal-Martínez *et al.*, 2010).

Além dos parasitos de peixes, os biomarcadores de poluição também se tornaram ferramentas importantes na avaliação e monitoramento da poluição aquática, sendo considerados hoje ferramentas bem estabelecidas (Van der Oost *et al.*, 2003; Vrankovic & Slavic, 2015). De acordo com Adams (2001), as respostas dos biomarcadores podem ser observadas como efeitos ao nível molecular, bioquímico, celular e fisiológico após exposição a certos compostos tóxicos. Essas respostas ocorrem em um nível infra-individual (“*suborganismal*”), e indicam uma mudança do estado normal do organismo frente a uma contaminante químico que não poderia ser detectado em organismos saudáveis (Van Gestel & Van Brummelen, 1996).

Existem numerosos exemplos de biomarcadores de exposição que tem sido utilizado em diferentes estudos com peixes, como a indução do citocromo P450 1A

(isoenzima CYP1A) provocada pela exposição a hidrocarbonetos aromáticos (PCBs, PAHs e dioxinas) (Stegeman & Lech, 1991; Parente *et al.*, 2004; Trujillo-Jiménez *et al.*, 2011; Santos *et al.* 2014; Vrankovic & Slavic, 2015), a indução da vitelogenina plasmática devido a ação de estrogênios ambientais (Sumpter & Jobling, 1995; Weber *et al.*, 2004), a presença de compostos fluorescentes aromáticos na bile (FACs) (Linde-Arias *et al.*, 2008a), a formação de micronúcleos causados por agentes mutagênicos (Andrade *et al.*, 2004; Linde-Arias *et al.*, 2008), a indução de metalotioneínas pela exposição de metais pesados (Rodríguez-Cea *et al.*, 2006; Linde-Arias *et al.*, 2008a,b), entre outros. Uma das maneiras de medir a indução do CYP1A é pela atividade catalítica da EROD (etoxiresorufina-O-desetilase) que tem sido reconhecida como um útil biomarcador em várias espécies de peixes (Van der Oost *et al.*, 2003). Vários experimentos de laboratório e de campo tem investigado a indução da atividade da EROD em mais de 150 espécies de peixe (Whyte *et al.*, 2000), tornando-se um dos biomarcadores mais sensível e utilizado em programas de biomonitoramento ambiental no mundo (Van der Oost *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2011).

Recentemente, diversos estudos têm demonstrado que os parasitos podem modular as respostas dos biomarcadores em condições de campo e laboratório (Trubiroha *et al.*, 2009; Marcogliese *et al.*, 2010; Frank *et al.*, 2011). Dentre os biomarcadores de peixes que tiveram sua síntese modulado pelos parasitos, podemos destacar a atividade da CYP1A (Pech *et al.*, 2009), a indução da metalotioneína (Baudrimont *et al.*, 2006; Baudrimont & Montaudouin, 2007), a atividade da glutathione-S-transferase (Frank *et al.*, 2011), entre outros. Sendo assim, é importante que os estudos de ecotoxicologia que usam biomarcadores de poluição em peixes devem considerar o efeito potencial dos parasitos, além de outros fatores como idade, sexo, fase reprodutiva, temperatura, estresse, que

também podem interferir nas respostas dos biomarcadores de poluição (Whyte *et al.* 2000).

Muitos pesquisadores têm alertado para os efeitos catastróficos dos poluentes nos ecossistemas aquáticos, gerando danos irreversíveis a biota e, conseqüentemente, trazendo prejuízos econômicos aos pescadores e população ribeirinhas. Embora a bacia do rio Tietê tenha recebido um projeto bilionário de R\$ 2 bilhões para a “despoluição”, ainda de acordo com relatórios da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2013), não se registrou melhora na qualidade das águas do Rio Tietê em 2013, conforme resultados do relatório da agência ambiental paulista. Com a poluição da bacia do Rio Tietê, principalmente devido às descargas de esgoto domésticos, industriais e agropecuário, houve um significativo decréscimo da riqueza e da abundância das espécies de peixes nativos (Barrella & Petrere, 2003), sendo hoje dominada quase exclusivamente por espécies introduzidas, como tilápias (*Oreochromis niloticus*), corvinas (*Plagioscion squamosissimus*) e porquinhos (*Geophagus proximus*) (Barros *et al.*, 2012). A busca por ferramentas para avaliação dos riscos e efeitos da poluição sobre os ecossistemas e organismos é de suma importância, haja vista que o homem depende dos recursos aquáticos para sua sobrevivência (Melacon, 2003).

O uso dos parasitos e biomarcadores de peixes podem contribuir para o monitoramento dos efeitos da poluição aquática, pois atuam como sinalizadores dos efeitos causados pelos contaminantes químicos, antecipando assim possíveis danos irreversíveis nas populações e comunidades biológicas (Galloway *et al.*, 2004; Sures, 2008). O uso de biomarcadores nos programas de biomonitoramento ambiental traz inúmeras vantagens, pois representam um menor custo, maior facilidade e rapidez em relação às análises químicas tradicionais (Galloway *et al.*, 2004).

Os estudos no Brasil utilizando parasitos de peixes como bioindicadores ambientais são escassos (Madi & Ueta, 2009). Além disso, estudos que visam compreender o papel dos parasitos de peixes como moduladores das respostas dos biomarcadores ainda são raros no país, demonstrando a necessidade de mais estudos sobre esta intrincada relação parasitismo/poluição/biomarcadores.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar as condições das represas usando como métricas as comunidades de parasitos de *Plagioscion squamosissimus* e *Geophagus proximus*, a indução da atividade da EROD, bem como verificar um potencial efeito dos parasitos na modulação da atividade da EROD em *P. squamosissimus* em condições de campo, com vistas para uso dessas espécies como bioindicadores da poluição ambientais nas represas da bacia do Rio Tietê, Estado de São Paulo.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, S.M. (2001). Biomarker/bioindicator response profiles of organisms can help differentiate between sources of anthropogenic stressors in aquatic ecosystems. **Biomarkers**, 6, 33–44.
- Amado, L.L., Rosa, C.E., Leite, A.M., Moraes, L., Pires, W.V., Pinho, G.L.L., Martins, C.M.G., Robaldo, R.B., Nery, L.E.M., Monserrat, J.M. Bianchini, A., Martinez, P.E. & Geracitano, L.A. (2006). Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Marine Pollution Bulletin**, 52, 199–206.

- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S., 2013. **Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects**. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Andrade, V.M.; Silva, J.; Silva, F.R.; Heuser, V.D.; Dias, J.F.; Yoneama, M.L. & Freitas, T.R.O. (2004). Fish as Bioindicators to Assess the Effects of Pollution in Two Southern Brazilian Rivers Using the Comet Assay and Micronucleus Test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 44, 459 – 468.
- Bainy, A.C.D., Woodin, B.R. & Stegeman, J.J. (1999). Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir Sao Paulo, Brasil. **Aquatic Toxicology**, 44, 289 - 305.
- Barrella, W. & Petreire Jr., M. (2003). Fish community alterations due to pollution and damming in Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). **River Research and Applications**, 19, 59-76.
- Barros, LC.; Santos, U.; Zanuncio, JC.; Dergam, JA. (2012). *Plagioscion squamosissimus* (Sciaenidae) and *Parachromis managuensis* (Cichlidae): A Threat to Native Fishes of the Doce River in Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE** 7(6): e39138. doi:10.1371/journal.pone.0039138
- Baudrimont, M.; Montaudouin, X. & Palvadeau, A. (2006). Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): A multivariate field monitoring. **Marine Pollution Bulletin**, 52, 494–502.
- Baudrimont, M. & de Montaudouin X. (2007) Evidence of an altered protective effect of metallothioneins after cadmium exposure in the digenean parasite-infected cockle (*Cerastoderma edule*). **Parasitology**, 134 (2), 237-245.

- Bramorski, J. (2004). **Avaliação da Qualidade de sedimento dos Rios Tietê e Piracicaba nos seus compartimentos de entrada no Reservatório de Barra Bonita, SP. São Carlos** (dissertação) mestrado, EESC/USP, 145p.
- Bucheli, T.D. & Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 25, 201 - 268.
- Castro-González, M. I. & Méndez-Armenta, M. (2008). Heavy metals: Implications associated to fish consumption. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 26, 263-271.
- Companhia Ambiental do Estado do São Paulo (CETESB - São Paulo) (2009). **Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo** [recurso eletrônico] 310p. Color, Série Relatórios / CETESB, São Paulo.
<http://www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes.asp>
- Companhia Ambiental do Estado do São Paulo (CETESB - São Paulo) (2013). **Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo** [recurso eletrônico] 302p. Color, Série Relatórios / CETESB, São Paulo.
<http://www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes.asp>
- Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, 2011 (SABESP). **Projeto Rio Tietê**. http://www2.sabesp.com.br/projetotiete/rio_tiete/percurso/percurso.asp
- Diamant, A.; Banet, I.; Paperna, H. V.; Westernhagen, K.; Broeg, G.; Kruener, W.; Koerting, W. & Zander, S. (1999). The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. II. The Red Sea and Mediterranean. **Helgoland Marine Research**, 53, 195–208.
- Dias, L.E. & Mello, J.W.V. (1998). **Recuperação de áreas degradadas**. Editora Folha Viçosa Ltda. Viçosa, MG.

- D'Amelo, S. & Gerasi, L. (1997). Evaluation of environmental deterioration by analysing fish parasite populations and communities. **Parassitologia**, 39, 237–241.
- Elderfield, H.; Upstill-Goddard, R. & Sholkovitz, E.R. (1990). The rare earth elements in rivers, estuaries and coastal seas and their significance to the composition of ocean water. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 54, 971-991.
- Fonseca, V.F.; França, S.; Serafim, A.; Company, R.; Lopes, B.; Bebianno, M.J. & Cabral, H.N. (2011). Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. **Aquatic Toxicology**, 102, 216–227
- Frank, S. N.; Faust, S.; Kalbe, M.; Trubiroha, A.; Kloas, W. & Sures, B. (2011). Fish hepatic glutathione-S-transferase activity is affected by the cestode parasites *Schistocephalus solidus* and *Ligula intestinalis*: evidence from field and laboratory studies. **Parasitology**, 138, 939–944.
- Galloway, T.S.; Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B. & Depledge, M.H. (2004). A multi-biomarker approach to ecosystem management. **Marine Environmental Research**, 58, 233-237.
- Hoole, D. (1997). The effects of pollutants on the immune response of fish: implications for helminth parasites. **Parassitologia**, 39, 219–225.
- Hudson, P.J., Dobson, A.P. & Lafferty, K.D. (2006). Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? **Trends in Ecology and Evolution**, 21, 381–385.
- Khan, R.A. (2011). Chronic Exposure and Decontamination of a Marine Sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) to Polychlorinated Biphenyls Using Selected Body Indices, Blood Values, Histopathology, and Parasites as Bioindicators. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 60, 479–485.

- Lafferty, K.D. (1997). Environmental parasitology: what can parasites tell us about human impacts on the environment? **Parasitology Today**, 13, 251–255.
- Lafferty, K.D., Allesina, S., Arim, M., Briggs, C.J., De Leo, G., Dobson, A.P., Dunne, J.A., Johnson, P. T.J., Kuris, A.M., Marcogliese, D.J., Martinez, N.D., Memmott, J., Marquet, P.A., McLaughlin, J.P., Mordecai, E.A., Pascual, M., Poulin, R. & Thieltges, D.W. (2008). Parasites in food webs: the ultimate missing links. **Ecology Letters**, 11, 533–546.
- Linde-Arias, A.R.; Inácio, A.F., Novo, L.A., Albuquerque, C. & Moreira, J.C. (2008a). Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. **Environmental Pollution**, 156, 974–979.
- Linde-Arias, A.R., Inácio, A.F., De Albuquerque, C., Freire, M.M. & Moreira, J.C. (2008b). Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian river. **Science of the Total Environment**, 399, 186-192.
- Madi, R.R. & Ueta, M.T. (2009). O papel de Ancyrocephalinae (Monogenea: Dactylogyridae), parasito de *Geophagus brasiliensis* (Pisces: Cichlidae), como indicador ambiental. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 18 (2), 38-41.
- Marcogliese, D.J., Dautremepuits, C., Gendron, A.D., & Fournier, M. (2010). Interactions between parasites and pollutants in yellow perch (*Perca flavescens*) in the St. Lawrence River, Canada: implications for resistance and tolerance to parasites. **Canadian Journal of Zoology**, 88(3), 247-258. doi:10.1139/Z09-140.
- Melacon, M.J. (2003). Chapter 11. Bioindicators of Contaminant Exposure And Effect In Aquatic And Terrestrial Monitoring. In: **Handbook of Ecotoxicology**, Second

- Edition (Ed.) by David J. Hoffman, Barnett, A.; Rattner, G.; Allen Burton Jr. and John Cairns Jr. CRC Press.
- Mortatti, J.; Hissler, C. & Probst, J. L. (2010). Distribuição de Metais Pesados nos Sedimentos de Fundo ao Longo da Bacia do Rio Tietê. **Revista do Instituto de Geociências – USP, Sér. cient., São Paulo, 10 (2), 3-11.**
- Mozeto, A.A.; Silvério P.F, De Paula F.C.F, Bevilacqua J.E, Patella E. & Jardim W.F. (2003). Weakly-bound metals and total nutrient concentrations of bulk sediments from some water reservoir in São Paulo State, SE Brazil. En: MUNAWAR M. (Ed.). **Sediment Quality assessment and management: insight and progress.** Ecovision World Monograph Series. Aquatic Ecosystem Health & Management Society.
- Mozeto, A.A. & Patella, E. (1997). Como avaliar a qualidade da água de mananciais. **Ciência Hoje, 22 (127), 16-19.**
- Nachev, M. & Sures, B. (2009). The endohelminth fauna of barbel (*Barbusbarbus*) correlates with water quality of the Danube River in Bulgaria. **Parasitology, 136, 545–552.**
- Nascimento, R.D.L. (2003). **Proposição de Valores de Referência para a concentração de metais e metalóides em sedimentos límnicos e fluviais da Bacia Hidrográfica do rio Tietê, SP.** Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 142p.
- Nriagu, J.O. (1990). A history of global metal pollution. **Science, 272, 223-224.**
- Parente, T.E., De-Oliveira, A.C., Silva, I.B., Araujo, F.G. & Paumgarten, F.J., (2004). Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. **Chemosphere, 54, 1613-1618.**

- Parente, T.E., De-Oliveira, A.C. & Paumgartten, F.J., (2008). Induced cytochrome P450 1A activity in cichlid fish from Guandu River and Jacarepagua Lake, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Pollution**, 152, 233–238.
- Parente, T.E.M., De-Oliveira, A.C.A.X., Beghini, D.G., Chapeaurouge, D.A., Perales, J. & Paumgartten, F.J.R. (2009). Lack of constitutive and inducible ethoxyresorufin-O-deethylase activity in the liver of suckermouth armored catfish (*Hypostomus affinis* and *Hypostomus auroguttatus*, Loricariidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 150, 252–260.
- Pech, D. Vidal-Martínez, V.M.; Aguirre-Macedo, M.L.; Gold-Bouchot, G.; Herrera-Silveira, J.; Zapata-Pérez, O. & Marcogliese, D.J. (2009). The checkered puffer (*Spheroides testudineus*) and its helminthes as bioindicators of chemical pollution in Yucatan coastal lagoons. **Science of total Environmental**, 407, 2315 - 2324.
- Perez-del Olmo, A. (2007) Parasite communities in *Boops boops* (L.) (Sparidae) after the Prestige oil-spill: detectable alterations. **Marine Pollution Bulletin**, 54, 266–276.
- Poulin, R. (1992). Toxic pollution and parasitism in freshwater fish. **Parasitology Today**, 8, 58–61.
- Reis RE, Kullander S, Ferraris CJ Jr (2003). **Check list of the fishes of South and Central America**. Porto alegre: Edipucrs. 729 p.
- Rodríguez-Cea, A., Linde Arias, A.R., Fernández de la Campa, M.R. Costa Moreira, J. & Sanz-Medel, A. (2006). Metal speciation of metallothionein in white sea catfish, *Netuma barba*, and pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, by orthogonal liquid chromatography coupled to ICP-MS detection. **Talanta**, 69, 963–969.
- Rodrigues, A.P.C. Maciel, P.O. Pereira da Silva, L.C.C. Albuquerque, C. Inácio, A.F. Freire, M. Linde, A.R. Almosny, N.R.P. Andreato, J.V. Bidone, E.D. & Castilho,

- Z.C. (2010). Biomarkers for Mercury Exposure in Tropical Estuarine Fish. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, 5 (1), 9-18.
- Santos, D.M., Santos, G.S., Cestari, M.M., Ribeiro, C.A.O., Assis, H.C.S., Yamamoto, F., Guiloski, I.C., Marchi, M.R.R., Montone, R.C. (2014). Bioaccumulation of butyltins and liver damage in the demersal fish *Cathorops spixii* (Siluriformes, Ariidae). **Environmental Sciences of Pollution Research**, 21, 3166–3174. doi:10.1007/s11356-013-2280
- Sholkovitz, E.R. (1992). Chemical evolution of rare earth elements: fractionation between colloidal and solution phases of filtered river water. **Earth and Planetary Science Letters**, 114, 77-84.
- Stegeman, J.J., Lech, J.J. (1991). Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environmental Health Perspectives**, 90, 101 - 109.
- Sumpter, J.P. & Jobling, S. (1993). Male sexual development in a "sea of oestrogens". **Lancet** 342, 124-125.
- Sures, B. (2004). Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. **Trends in Parasitology**, 20, 170–177.
- Sures, B. (2008). Environmental parasitology: Interactions between parasites and pollutants in the aquatic environment. **Parasite**, 15, 434–438.
- Trubiroha, A., Wuertz, S., Frank, S.N., Sures, B. & Kloas, W. (2009). Expression of gonadotropin subunits in roach (*Rutilus rutilus*, Cyprinidae) infected with plerocercoids of the tapeworm *Ligula intestinalis* (Cestoda). **International Journal for Parasitology**, 39, 1465–1473.
- Trujillo-Jiménez, P., Sedeño-Díaz, J.E., Camargo, J.A. & López-López, E. (2011). Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse

- indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). **Ecological Indicators**, 11, 1636–1646.
- Valtonen, E.T.; Holmes, J.C. & Koskivaara, M. (1997). Eutrophication, pollution and fragmentation: effects on parasite communities in roach (*Rutilus rutilus*) and perch (*Perca fluviatilis*) in four lakes in Central Finland. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences**, 54, 572–585.
- Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13, 57–149.
- Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T. C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, 5 (4): 217-225.
- Vidal-Martinez, V.M., Pech, D., Sures, B., Purucker, T. & Poulin, R. (2010). Can parasites really reveal environmental impact? **Trends in Parasitology**, 26, 44–51.
- Vrankovic, J.; Slavic, M. (2015). Biomarker responses in *Corbicula fluminea* to the presence of dioxin-like polychlorinated and seasonal changes. **Ecological Indicators**, 48, 99-106.
- Weber, L.P.; Gordon, C.B.; Metcalfe, C.D. & Janz, D.M. (2004). Increased kidney, liver, and testicular cell death after chronic exposure to 17 α -ethinyl estradiol in medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, 33, 792-797.
- Whyte J.J.; Jung, R.E.; Schmitt, C.J. & Tillitt, D.E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, 30(4), 347-570.

CAPÍTULO 2

The influence of fish size and reproductive status on ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in *Plagioscion squamosissimus* (Pisces: Sciaenidae): Implications for biomonitoring in the Tietê River, South America

Abstract

Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity is considered an important biomarker for aquatic environmental contamination. Although EROD activity has been widely used as a biomarker of exposure to planar aromatic hydrocarbons in fish, this activity can be influenced in the field by spatial-, seasonal- or individual-related factors. We therefore performed a comparative study of hepatic EROD activity levels in the silver croaker *Plagioscion squamosissimus* to determine whether variations existed in enzyme activity levels, especially in relationship to reproductive status, fish size, and seasonality. For this purpose, we collected fish from three localities with different pollution levels during the early-rainy (November 2012), rainy (March 2013), and dry (July to August 2013) seasons from the Tietê River in southeast Brazil. We tested whether size and sex (males vs. females) affected EROD activity among the localities and seasons. We found a marked effect of pollution during the dry season on variation among the localities in hepatic EROD activity in *P. squamosissimus*. An analysis of covariance (ANCOVA) indicated that sex had a significant negative effect on the seasonal variability of the EROD levels at the most polluted locality (near São Paulo). A possible explanation for the statistical association between EROD activity and sex is that the reproductive status of the females influenced the EROD levels. Further support for this explanation is that there is a clear trend in the literature that EROD is suppressed in the mature females by 17 β -estradiol and that a decline in the activity of this enzyme occurred from the onset of ovulation until spawning. Our results suggest that reproductive status can be a significant confounding factor for determining EROD activity in female *P. squamosissimus* in freshwater ecosystems when compared to males.

Keywords: Biomarker, Tietê River, Pollution, Fish, Seasonality, Estradiol.

1. Introduction

Defense biomarkers in fish have been widely used to assess chemical contamination in the aquatic environment (Whyte et al. 2000; van der Oost et al. 2003; Amiard-Triquet et al. 2013). Over the past few years, a significant increase in the number of studies using this type of biochemical endpoint has been observed (Trídico et al. 2010; Nahrgang et al. 2013; Danion et al. 2014), and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) is one of the most widely used biomarkers of exposure to aquatic contaminants (van der Oost et al. 2003; Roméo and Giambérini, 2013; Santos et al. 2014). EROD activity is a useful tool for detecting the early signs of contamination by organic compounds, such as planar hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) (Goksøyr and Förlin, 1992; Roméo and Giambérini, 2013; Ratia and Oikari, 2014), and has been standardized as a core biomarker in several countries of North America, Europe, and Asia (Pampanin et al. 2006; Collier et al. 2013). Although EROD activity has been frequently used as a biomarker of exposure in fish, this activity can be influenced in the field by spatial- (Barhoumi et al. 2012), seasonal- (Gorbi et al. 2005; Nahrgang et al. 2010) and individual-related factors (e.g., gender, size and reproductive status) (Whyte et al. 2000; van der Oost et al. 2003; Gorbi et al. 2005; Koenig and Solé, 2012).

Previous studies have demonstrated that the differences between males and females are among the most important individual-related factors affecting fish EROD activity (Whyte et al. 2000), with downregulation occurring in females during the period of reproductive activity (Koegig and Solé, 2012; Chiang et al. 2012). Briefly, this downregulation has been observed in spawning females from different species (Whyte et al. 2000), in which EROD levels decrease toward the onset of ovulation and then increase, returning to basal EROD activity levels, during the postspawning period (van der Oost et al. 2003; Elskus, 2004).

Seasonality can also affect the EROD responses due to environmental variability (e.g., pH, dissolved oxygen (DO), temperature), influencing the enzymatic results obtained using this biomarker (Stegeman et al. 1992; Chiang et al. 2012; Nahrgand et al. 2013). These confounding factors (i.e., seasonality and individual-related factors) can sometimes mask the effects of contaminant-induced stress signals and prevent the correct interpretation of biomarker results (Sheehan and Power, 1999; Gagnon and Hodson, 2012).

Hence, when using biomarkers, it is important to distinguish between normal fluctuations of biological responses and fluctuations attributable to chemical stress induced by pollutants (Amiard-Triquet et al. 2013). Few studies have considered these confounding factors, analyzing EROD activity in males and females separately (Koenig and Solé, 2012) or using only sexually immature fish (Barhoumi et al. 2012). Thus, to avoid data misinterpretation and the underestimation of environmental pollutants, the relative contributions of seasonality and individual-related factors (e.g., size and reproductive status) must be determined, as all of these factors can potentially confound the EROD responses of the fish (Whyte et al. 2000; Gagnon and Hodson, 2012).

Over the past few decades, the Tietê River has been seriously altered by anthropogenic contamination caused by chemical industries and a population of nearly 20 million people in the metropolitan region of São Paulo (Mortatti et al. 2011, CESTESB, 2013). Although the water quality has progressively decreased due to runoff from the metropolitan region of São Paulo, the non-native fish species are still highly abundant and possesses a certain tolerance to environmental stressors, both natural and human induced, compared with that of native species (Fedorenkova et al. 2013). The South American silver croaker, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840), an invasive species introduced in the Paraná River basin in the 1960s (Nomura,

1984 in Carnélos and Benedito, 2002), is now widespread in the Tietê River (Moretto et al. 2008). Because of its wide geographical distribution, abundance and tolerance, the croaker *P. squamosissimus* is a good candidate as a freshwater sentinel organism, making it very useful in the design of studies involving aquatic biomarkers.

Therefore, the aim of this study was to determine whether there are differences in the EROD activity levels in the croaker *Plagioscion squamosissimus* in the Tietê River, Brazil, with respect to seasonality, contaminant levels, size, sex, and reproductive status.

2. Materials and methods

2.1 Study area

The study site, the Tietê River Basin in southeast Brazil, has a total surface area of 71,988 km², 70% of which is affected by industrial and agricultural activities, primarily involving chemical industries and sugar cane culture (Barrela and Petrere, 2003; Mortatti et al. 2011; CETESB, 2012). Eight reservoirs have been built along the 1,150-km length of the river. Sampling sites in the Tietê River Basin were selected based on their pollution levels (Fig. 1). We selected three reservoirs for this study, including two close to the metropolitan region of São Paulo (Barra Bonita and Bariri), with intense and moderate industrial activity, respectively, and one far from São Paulo (Promissão), which was used as the reference site. These reservoirs were chosen based on the “Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life” established by the Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME, 2002) and the Environmental Agency of the State of São Paulo (CETESB, 2012; 2013). These guidelines establish a criterion to classify water bodies based on the concentrations of chemical contaminants. This criterion is

based on two threshold levels, one below which aquatic life is seldom affected (TEL = threshold effect level), and one above which effects on aquatic life are likely (PEL = probable effect level) (Burton, 2002). The Barra Bonita reservoir (20°31' S and 48°32' W) is close to the metropolitan area of São Paulo city (~200 km) and is the site of the region's most intense industrial activity. Barra Bonita is contaminated with planar aromatic hydrocarbon (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and heavy metals (CETESB, 2012). The Bariri reservoir (22°09' S and 48°44' W) is located close to the Barra Bonita reservoir (~50 km), is the site of moderate industrial and agricultural activities (e.g., sugar cane culture) and is contaminated primarily by organo-chlorine pesticide residues (CETESB, 2012). The Promissão reservoir (21°19' S and 49°44' W) is located approximately 400 km west of São Paulo city and was chosen as the reference sampling site because recent studies have reported that this reservoir is still in a healthy state and is not contaminated (Rodgher et al. 2005; CETESB, 2012).

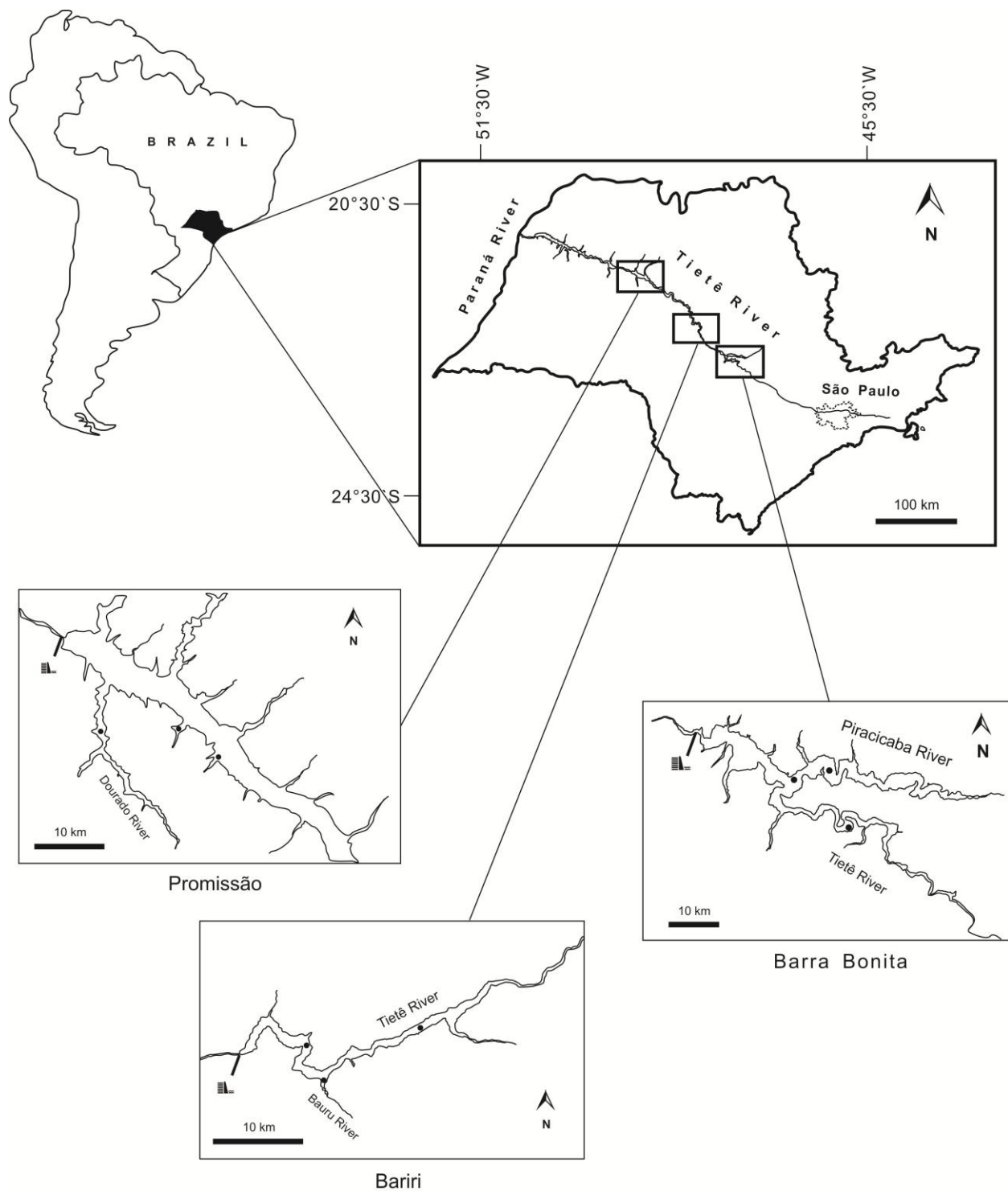


Figure 1. Distribution of the sampling sites in the Tietê River, São Paulo, Brazil. Each square is a reservoir and black dots indicate the sampling sites in each reservoir.

2.2 Fish sampling

Plagioscion squamosissimus was collected from three sites at each reservoir (Fig. 1) in the early-rainy (November 2012), rainy (March 2013), and dry seasons (July and August 2013). The fish were caught using gillnets (3-cm to 14-cm mesh between opposite knots), hand nets (mesh sizes of 3, 5, and 8 mm), and hook-and-line using living prawns or small fishes as bait to minimize the potential bias caused by size selectivity. The sample size according to the sex/season/locality was in accordance with Gagnon and Hodson (2012), who estimated a minimum number of 4-12 fish/sex/season/site to detect a 3-fold induction of EROD activity at $\alpha = 0.05$. The fish were maintained live in tanks with aeration for less than 2 h until their arrival at the field laboratory, where they were sacrificed (by a sharp blow to the head), weighed (g), measured (standard length in cm) and dissected to obtain the livers for the determination of ethoxyresorufin-O-deethylase (hepatic EROD) activity. The livers were weighed (total wet weight in milligrams), snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis. Water physico-chemical parameters, including temperature (°C), pH, dissolved oxygen (mg/ml), conductivity (mS/cm), and total dissolved solids (g/L) were measured during fish collection using a multiparameter water quality meter (Horiba model U-50, Horiba Ltd., Kyoto, Japan).

2.3 Determination of maturity stages and hepatosomatic index

The stages of female maturity were determined macroscopically according to three stages of ovarian development and classified as immature (IMM), in maturation (IMA) and mature (MA) according to Vazzoler (1996) and Barbosa et al. (2012). These stages were defined visually by the characteristics of the gonads (i.e., color, transparency and vascularization) and by the presence and diameter of oocytes at the different maturity stages (for more detail, see Barbosa et

al. 2012). The hepatosomatic index (HIS) was calculated according to the equation $HIS = LW/SW \times 100$, where LW (g) is the liver weight and SW (g) is the somatic weight.

2.4 EROD activity analysis

EROD activity was assessed in the post-mitochondrial fraction (S9) of the liver samples. To obtain the S9 fraction, the frozen liver samples were homogenized using a Polytron homogenizer (Ultra-Turrax, IKA, USA) at 4°C to prevent a loss of enzymatic activity prior to the measurement. Homogenization was performed in a buffer at pH 7.8 containing 50 mM TRIS, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose, and 20% glycerol. The homogenates were subsequently centrifuged at 9,000 g for 30 min at 4°C. Aliquots (1 ml) of the supernatant were transferred to two cryotubes and stored in liquid nitrogen prior to further biochemical analysis. EROD activity was assayed fluorometrically according to Burke et al. (1985), with modifications for 96-well plates using a microplate reader (Spectramax Gemini XS®, Molecular Devices Co., USA). Briefly, the samples of the S9 fraction were diluted to ~1.25 mg/ml in buffer (1 mM ethoxyresorufin diluted in 100 mM K₂HPO₄) and pipetted (10 µl) in triplicate into a 96-well microplate. To initiate the reaction, a regenerating system, which consisted of 0.25 mM b-NADP, 2.5 mM MgCl₂, 5 mM glucose-6-phosphate, and 0.5 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase per milliliter of incubation mixture, was added. The transformation of ethoxyresorufin to resorufin was monitored at an excitation of 535 nm, and fluorescence emission was measured at 595 nm. The EROD activity levels were expressed as pmol of resorufin produced per minute per mg total protein in the S9 fraction. The protein assay was conducted according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as the standard, and the measurements were performed using a microplate reader at an absorbance of 595 nm.

2.4 Data analysis

The data were assessed for normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Bartlett test). If the requirements of normality and homogeneity of variance were not met, nonparametric tests were used. An analysis of covariance (ANCOVA) was used to evaluate the effects of size and sex (covariates) on the EROD response among the localities and seasons. Prior to performing the ANCOVA test, the slopes of the interaction factors (size and sex) were assessed with a homogeneity test. A significant interaction effect indicated that the difference between the groups depended on the value of the covariate (Engqvist, 2005). This procedure is important for separating the effects of the differences among treatments from the differences due to covariates, such as size and sex, on the biomarker responses (Underwood, 1997; Engqvist, 2005; Koenig and Solé, 2012). Differences between males and females in size, hepatosomatic index and EROD levels among the seasons were examined with a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post-hoc test. The relationship between standard length and EROD activity level was determined using a linear regression analysis and posteriorly the curve was adjusted for the selection of the best model for the dataset. The statistical analyses were performed using Statistica software, version 7.1 (Statsoft, USA), and the graphs were plotted with R software (R Development Team; <http://www.R-project.org>). Differences were considered significant at $p < 0.05$, and the data were expressed as the mean $\pm$ standard deviation.

3. Results

3.1. Water quality assessment

The water physico-chemical parameters recorded at the three reservoirs are summarized in Table

1. The highest temperatures (above $26^{\circ}\text{C} \pm 1.2$) were recorded during the early-rainy season and

the rainy season at the three localities (Barra Bonita, Bariri and Promissão) together with the lowest dissolved oxygen values (below 7 mg/L), except for Promissão (DO above 7.7 mg/L). The water at Barra Bonita and Bariri also showed higher conductivity and total dissolved solid values than the water at Promissão (Table 1).

Table 1 Water physico-chemical parameters in the Tietê River Brazil during the sampling period.

Site	Season	Temperature (°C)	pH	Dissolved oxygen (mg/L)	Conductivity (mS/cm)	Total dissolved solid (g/L)
Barra Bonita (BB)	Early rainy	26.9±1.2	6.9±0.7	6.2±1.2	324±18.5	187±6.8
	Rainy	26.3±1.1	7.3±1.1	7.2±0.7	315±13.3	168±10.1
	Dry	21.5±1.3	7.6±1.4	7.6±1.7	244±9.8	158±9.1
Bariri (BA)	Early rainy	27.1±1.1	7.4±0.8	5.6±0.9	304±11.1	179±7.1
	Rainy	29.5±1.2	6.7±0.9	4.1±1.3	280±8.7	143±8.1
	Dry	21.2±1.4	6.9±0.5	6.1±1.2	252±8.9	166±9.1
Promissão (PR)	Early rainy	28.7±1.4	8.2±1.1	7.9±1.3	115±7.1	75±6.3
	Rainy	31.1±0.8	7.2±0.9	7.8±1.4	220±8.6	111±5.3
	Dry	24.1±1.2	7.9±1.2	7.7±0.7	148±6.7	134±7.8

3.2. Fish morphological parameters

The sample sizes, standard lengths, and hepatosomatic indices for croakers of both sexes are given in Table 2. Most of the fish were in the maturation process or matured during the early-rainy and rainy seasons rather than during the dry season. The highest numbers of mature females were found during the early-rainy season at all three localities. Among the seasons, males and females differed significantly in standard length (Kruskal-Wallis test, $H = 147.9$; $df = 17$; $p = 0.001$). The females were larger than the males (t -test, $t = 6.76$; $p < 0.001$; $n = 219$). The males differed in size among the three seasons (Table 2), while the females differed in size among the seasons only at Bariri ($F_{2,6} = 4.59$; $p = 0.029$). The hepatosomatic index for both males and females differed significantly among the seasons (Kruskal-Wallis test, $H = 108.09$; $df = 17$; $p = 0.001$), with higher values observed during the dry season.

Table 2 Seasonal variation of biological parameters and the biomarker Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) of the croaker *Plagioscion squamosissimus* in Tietê River, Brazil. Values are shown as mean $\pm$ standard deviation. Different letters denote significant differences between seasons based on Dunn's test ($P < 0.05$).

Locality	Parameter	Sex	Early-rainy (Nov)	Rainy (Mar)	Dry (Jul-Aug)
Barra Bonita (BB)	Sample size	M	17	24	18
		F	12	6	9
	Reproductive status (%)*	M	88.2	91.7	50
		F	91.7	83.3	33.3
	Size (cm)	M	19.42 $\pm$ 1.85 ^a	17.69 $\pm$ 1.10 ^b	20.99 $\pm$ 2.36 ^{ac}
		F	19.77 $\pm$ 1.84 ^a	20.87 $\pm$ 2.29 ^a	20.30 $\pm$ 2.05 ^a
	Hepatosomatic index (%)	M	0.35 $\pm$ 0.14 ^a	0.45 $\pm$ 0.08 ^a	0.73 $\pm$ 0.15 ^b
		F	0.33 $\pm$ 0.13 ^a	0.42 $\pm$ 0.07 ^a	0.73 $\pm$ 0.14 ^b
Bariri (BA)	EROD (pmol/mg protein*min)	M	70.6 $\pm$ 46.27 ^a	46.56 $\pm$ 21.39 ^{ab}	170.5 $\pm$ 153.83 ^d
		F	18.86 $\pm$ 12.89 ^{ac}	65.31 $\pm$ 19.84 ^b	157.33 $\pm$ 191.7 ^d
	Sample size	M	16	13	16
		F	5	5	7
	Reproductive status (%)*	M	75	69.2	62.5
		F	100	80	57.1
	Size (cm)	M	15.65 $\pm$ 1.57 ^a	15.65 $\pm$ 1.23 ^a	21.35 $\pm$ 3.28 ^b
		F	19.04 $\pm$ 2.78 ^a	19.32 $\pm$ 2.27 ^{ab}	22.56 $\pm$ 1.85 ^b
Promissão (PR)	Hepatosomatic index (%)	M	0.63 $\pm$ 0.29 ^a	0.51 $\pm$ 0.12 ^a	1.02 $\pm$ 0.86 ^{ab}
		F	0.50 $\pm$ 0.24 ^a	0.46 $\pm$ 0.12 ^a	0.81 $\pm$ 0.34 ^a
	EROD (pmol/mg protein*min)	M	62.25 $\pm$ 41.54 ^a	38.65 $\pm$ 25.10 ^{ab}	42.43 $\pm$ 19.65 ^{ab}
		F	38.24 $\pm$ 23.52 ^{ab}	43.59 $\pm$ 39.81 ^a	49.86 $\pm$ 20.09 ^{ab}
	Sample size	M	20	10	9
		F	6	17	9
	Reproductive status (%)*	M	95	80	66.7
		F	100	82.4	77.8
	Size (cm)	M	19.54 $\pm$ 1.62 ^a	23.44 $\pm$ 2.16 ^b	22.3 $\pm$ 2.22 ^b
		F	24.11 $\pm$ 7.02 ^a	25.88 $\pm$ 1.83 ^a	25.44 $\pm$ 3.02 ^a
	Hepatosomatic index (%)	M	0.51 $\pm$ 0.17 ^a	0.46 $\pm$ 0.09 ^a	0.74 $\pm$ 0.16 ^b
		F	0.43 $\pm$ 0.21 ^a	0.47 $\pm$ 0.13 ^a	0.71 $\pm$ 0.14 ^b
	EROD (pmol/mg protein*min)	M	35.65 $\pm$ 23.04 ^{bc}	33.19 $\pm$ 10.06 ^c	23.89 $\pm$ 11.23 ^c
		F	34.92 $\pm$ 29.01 ^{abc}	29.34 $\pm$ 17.56 ^{ac}	24.56 $\pm$ 13.24 ^c

*Percentage of individuals maturing or mature on the fish population

3.3. Liver EROD activity

Comparisons were conducted for the males and females separately because the EROD activity levels varied between the sexes among the localities and seasons. The EROD activity levels among the seasons differed significantly, especially at Barra Bonita, for both sexes (Table 2; Fig. 2). The highest EROD activity levels for the males were detected during the early-rainy season (Barra Bonita and Bariri) and the dry season (Barra Bonita) (Table 2; Fig. 2A). The females showed the highest EROD activity level only during the dry season at Barra Bonita and showed the lowest activity level during the early-rainy season (Table 2; Fig. 2B). We also observed a strong effect of seasonality on EROD activity at the most contaminated area (Barra Bonita) for the males (Kruskal-Wallis test, $H = 34.68$; $df = 8$; $p < 0.001$) (Fig. 2A) and females (Kruskal-Wallis test, $H = 26.64$; $df = 8$; $p < 0.001$) (Fig. 2B).

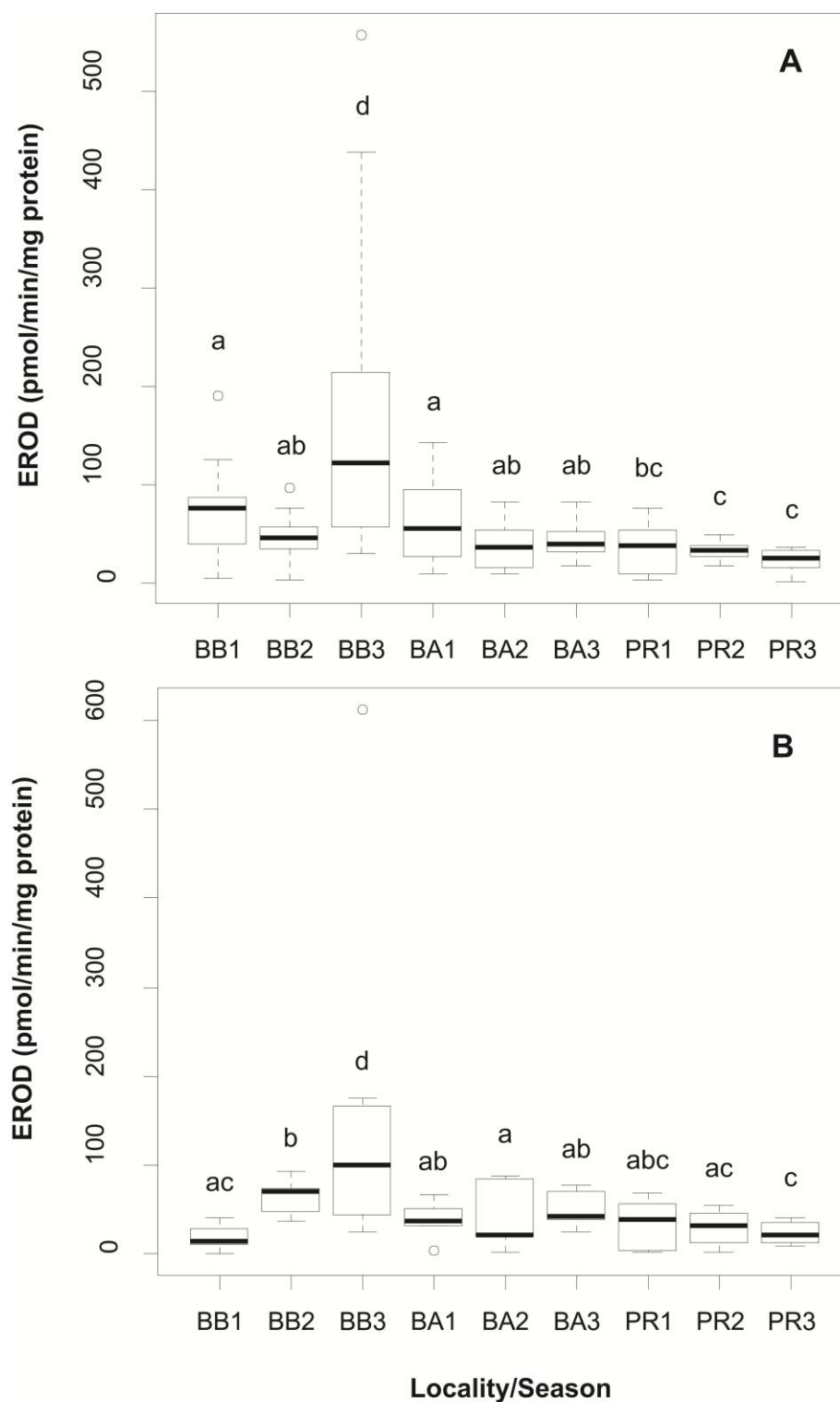


Figure 2. Box-plots of Ethoxyresorufin-*O*-deethylase activity of *Plagioscion squamosissimus* among the localities (BB = Barra Bonita; BA = Bariri; PR = Promissão), and among season (November 2012 = Early-rainy: 1; March 2013 = Rainy: 2; July and august = Dry: 3). A. Mean

Ethoxyresorufin-O-deethylase activity in males among sampling sites. B. Mean Ethoxyresorufin-O-deethylase activity in females among sampling sites. Box-plots denoted by different letters biomarker values differed significantly among seasons and localities. Line = Mean; box = Mean $\pm$ Standard Error; Wiskers = Mean $\pm$ Standard Deviation.

The ANCOVA indicated that sex ($F_{1, 178} = 4.44$; $p = 0.036$) and size ($F_{1, 179} = 4.16$; $p = 0.042$) had significant negative effects on the seasonal variability of the EROD levels (Table 3). Moreover, a linear regression analysis indicated a negative relationship between EROD activity and body size for the females ($R^2 = 0.518$; $n = 68$; $p = 0.002$), with decreased EROD activity levels occurring in the larger females (Fig. 3).

Table 3. Results of the Analysis of Covariance (ANCOVA) using sex and size (standard length) as covariates on the EROD activity levels among localities and seasons. The significant values (*) indicate that the differences found among the localities and seasons vary as a function of the covariates used in this model.

Model Factors	N	F-statistic	<i>p</i> – values
Size	213	4.44	0.036*
Sex	213	4.16	0.042*
Size*Sex	213	4.43	0.036*
Locality	213	15.03	0.001**
Season	213	6.35	0.002**
Locality*Season	213	10.57	0.001**

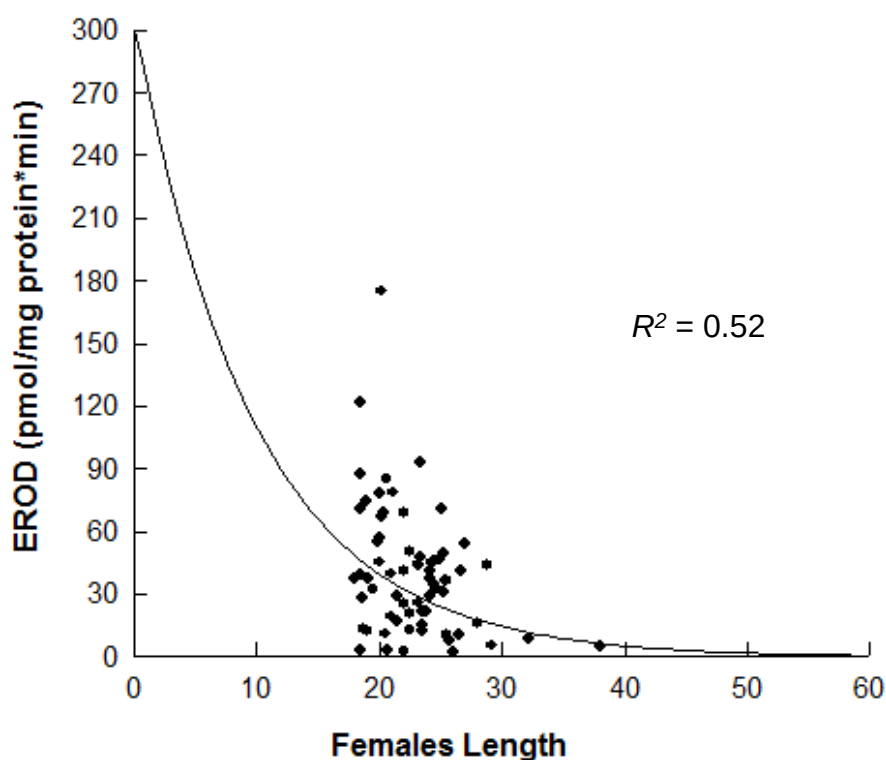


Figure 3. Relationship between EROD activity levels and standard length of the females of Tietê river. The curve was fitted by: $Y = 305.14^{*(-0.102.X)}$, Exponential regression ($R^2 = 0.518$; $n = 68$; $p = 0.002$).

4. Discussion

The differences in EROD activity levels found among the seasons at Barra Bonita suggest that sex and size had a significant negative effect on the variability of this biomarker at this highly polluted locality (near São Paulo). Our study indicated that this difference in Barra Bonita and Bariri was related to the reproductive status of the females, with EROD activity levels

downregulated in the females during the early-rainy season in comparison with the males. This downregulation was even more evident during the early-rainy season at Barra Bonita (Fig. 2B), suggesting that the reproductive status of the females (more than 90% mature females; Table 2) may potentially explain these differences.

Although mature *P. squamosissimus* females were found during all of the seasons, the peak in the number of mature females occurred during the early-rainy season (see Table 2), when spawning in this species is most intense (Petesse et al., 2007). In fact, the end of the spawning (March to April) period coincided with an increase in EROD activity in the females at Barra Bonita during the rainy and dry seasons (Fig. 2B), which reached activity levels similar to those of the males (see Fig. 2A). The decreased EROD activity observed in the females during the early-rainy season at Barra Bonita may have been due to the antagonist effects of a steroid hormone on the activity of this biomarker in the females (Whyte et al., 2000; Koenig and Solé, 2012). The mechanism for EROD downregulation in spawning females has been related to the increase in 17 β -estradiol that occurs during the reproductive cycle (Shapiro, 1982; Snowberger Gray et al. 1991; Buhler et al. 2000; Whyte et al. 2000; Elskus, 2004; Iwanowicz et al. 2009). This steroid hormone controls vitellogenin (egg yolk protein) production during gonadal recrudescence (Shapiro et al. 1982). In addition, females contain more lipids and can also release more hydrophobic contaminants during spawning than males because the quantity of eggs released is much larger than the quantity of milt (Whyte et al. 2000). Although there is strong evidence that the reproductive status of the females downregulated the EROD activity levels during the spawning period, we could not determine whether the increase in 17 β -estradiol caused the suppression of the EROD activity levels at Barra Bonita based on our data. Our results are in accordance with those reported by Gorbi et al. (2005), Kopecka and Pempkowiak (2008), Chiang

et al. (2012), and Koenig and Solé (2012), who have shown that EROD activity levels in fish species differ markedly among the seasons, especially during the spawning period. Bucheli and Fent (1995) have also found that in fish, EROD activity decreases shortly before and during spawning. According to Whyte et al., (2000), the EROD activity levels in the female fish that they studied gradually declined toward the onset of ovulation until spawning and then returned to basal levels during the postspawning period.

In the present study, effects of size were observed for the females only during the early-rainy season at Barra Bonita and Bariri, where larger individuals were at the mature stage (Table 2). However, in Promissão (the cleanest area), where the largest females examined in the study were found, the EROD activity levels were lower compared with those in Barra Bonita and Bariri, suggesting that this locality was less polluted. In addition to reproductive status, size- and age-related factors have also been shown to influence EROD enzyme activities in fish (Whyte et al. 2000; van der Oost et al. 2003). In general, an adult fish has more exposure time, during which it can accumulate more hydrophobic contaminants. This effect has been noted by Hugla et al. (1995) and Sleiderink et al. (1995) in barbel and flatfish (dab), where mature fish collected from a PCB-contaminated site had higher levels of EROD than juveniles from the same site. However, in the present study, we found an inverse pattern, with lower levels of induced EROD in the largest females (Fig. 3).

Furthermore, the highest EROD activity levels were found at Barra Bonita during the dry season, in contrast with the other localities, strongly reflecting the presence of xenobiotic chemicals in this part of the Tietê River (near São Paulo), particularly PAHs and PCBs, which have been recognized as inducers of EROD activity in fish (Whyte et al. 2000). According to the monitoring program of the Environmental Protection Agency in São Paulo (CETESB, 2012,

2013), during 2012 and 2013 (the period of study) the Barra Bonita reservoir and the Piracicaba River were contaminated by heavy metals (e.g., Cu, Cr, As, Ni > PEL), PAHs (e.g., acenaphthylene, benzo(a)anthracene, and dibenzo(a,h)anthracene, according to the TEL and PEL) and also by PCBs (e.g., total PCBs, 2-8-chlorinated biphenyls). The Bariri reservoir was also contaminated by heavy metals (Ag), PCBs (total PCBs) and some organo-chlorine pesticide residues (e.g., lindane and endrin, according to the TEL and PEL) (CETESB, 2012; CETESB, 2013). The presence of these contaminants in the water and sediment may explain the higher EROD activity levels found among the localities, especially at Barra Bonita (the more contaminated area), where the induction of this activity demonstrated that these contaminants were bioavailable to the local fish community. The highest EROD activity levels were found during the dry season at Barra Bonita, indicating that the chemical contaminants were more concentrated and were available to the fish during this season. At Promissão, EROD activity was low during all seasons (Fig. 2). This finding indicates the low levels of contamination by PCBs and PAHs in this last reservoir, strengthening the evidence that the extent of the induction of EROD activity in *P. squamosissimus* is directly proportional to the dose of these chemical compounds (van der Oost et al., 2003; Copat et al. 2012).

Many studies have demonstrated that PAHs and PCBs are responsible for the induction of EROD activity in fish (Orrego et al. 2005; Parente et al. 2008; Trídico et al. 2010); however, few studies have included confounding factors (e.g., individual-related) in their analyses (Chiang et al. 2012; Koenig and Solé, 2012). Gagnon and Hodson (2012) have stressed the importance of considering fish size and sex in biomarker studies to avoid a gender bias in reported EROD activity levels. Burger et al. (2007) have also highlighted that many studies have ignored sex (i.e., did not distinguish between the sexes), choosing to analyze only one gender or to report data according

to sex without commenting on any differences present. Moreover, assays of EROD activity in sexually maturing female fish approaching the spawning period produce inflated variances of EROD activities in mixed samples of male and female fish (Forlin and Haux, 1990; Gagnon and Hodson, 2012). In the present study, we observed that EROD activity levels were influenced by the sex of the fish. Accordingly, it is important to assume that the variance may not always be equal between the sexes (Gagnon and Hodson, 2012). Although gender-dependent EROD activity has been well documented (Whyte et al. 2000), many studies involving biomonitoring have neglected to address the effects that confounding factors have on their analyses, including sex and reproductive status, which are likely to play roles in natural environments (Mihailovic et al. 2006; Klemz et al. 2010; Balk et al. 2011). Another important point is that biomonitoring studies of EROD activity have generally used mixed populations of male and female fish (Fuentes-Rios et al. 2005; Traven et al. 2013), making it increasingly difficult to relate the causes and effects.

We suggest that future studies of EROD activity in fish should assess males and females separately. Thus, the natural variabilities (e.g., individual-related factors) of biomarkers in field conditions should be carefully considered to improve the use of these ecotoxicological responses in biomonitoring (Gorbi et al. 2005; Gagnon and Hodson, 2012).

5. Conclusion

In conclusion, our study demonstrates the importance of considering reproductive status and size for females and males separately in studies of EROD activity. The direct comparison of contamination-induced EROD activities should not be conducted without controlling for the influence of these individual-related factors (e.g., reproductive status) in each fish species.

Additionally, measurements of EROD activity levels at different times of the year would be valuable for determining whether this enzymatic process shows seasonal variation. This approach would help to avoid data misinterpretation and the underestimation of environmental contamination inducers.

We suggest that further studies should include the evaluation of 17 β -estradiol and other stressors, including varying concentrations of aromatic hydrocarbons, bile metabolites (PAHs and PCBs) and parasites, in individual fish to assess the factors promoting variability in EROD activity levels.

References

- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S., 2013. Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Balk, L., Hylland, K., Hansson, T., Berntssen, M.H.G., Beyer, J., Jonsson, G., Melbye, A., Grung, M., Torstensen, B.E., Børseth, J.F., Skarphedinsdottir, H., Klungsøyr, J., 2011. Biomarkers in Natural Fish Populations Indicate Adverse Biological Effects of Offshore Oil Production. PloS ONE 6, e19735. doi:10.1371/journal.pone.0019735
- Barbosa, N.D., Rocha, R.M., Frédou, F.L., 2012. The reproductive biology of *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) in the Pará River estuary (Amazon Estuary). J. Appl. Ichthyol. 28, 800-805. doi: 10.1111/j.1439-0426.2012.02040.x
- Barhoumi, S., Messaoudi, I., Gagnéc, F., Kerkeni, A., 2012. Spatial and seasonal variability of some biomarkers in *Salaria basilisca* (Pisces: Blennidae): Implication for biomonitoring in Tunisian coasts. Ecol. Indicators 14, 222-228. doi:10.1016/j.ecolind.2011.06.025

- Barrella, W., Petrere Jr., M., 2003. Fish community alterations due to pollution and damming in Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). *River Res. Applic.* 19: 59–76. doi: 10.1002/rra.697
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bucheli, T.D., Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25, 201-268.
- Buhler, D.R., Miranda, C.L., Henderson, M.C., Yang, Y. Lee, S., Wang-Buhler, J., 2000. Effects of 17 β -Estradiol and Testosterone on Hepatic mRNA/Protein Levels and Catalytic Activities of CYP2M1, CYP2K1, and CYP3A27 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 91–101.
- Burger, J., Fossi, C., McClellan-Green, P., Orlando, E.F., 2007. Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environ. Res.* 104, 135-152. doi:10.1016/j.envres.2006.08.002
- Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer, R.T., 1985. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* 34, 3337-45.
- Burton, G.A. Jr. 2002 Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology* 3, 65–75.
- Chiang, G., Munkittrick, K.R., Urrutia, R., Concha, C., Rivas, M., Diaz-Jaramillo, M., Barra, R., 2012. Liver ethoxyresorufin-O-deethylase and brain acetylcholinesterase in two freshwater fish

species of South America: the effects of seasonal variability on study design for biomonitoring.

Ecotoxicol. Environ. Saf. 86, 147–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.008>

Collier, T., Chiang, M.W.L., Au, D.W.T., Rainbow, P., 2013. Biomarkers Currently Used in Environmental Monitoring. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S. (Eds.), Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 385-409.

Companhia Ambiental do Estado do São Paulo (CETESB – São Paulo) (2012). Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo [recurso eletrônico] 354p. Color, Série Relatórios / CETESB, São Paulo [ISSN 0103-4103], www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes.asp

Companhia Ambiental do Estado do São Paulo (CETESB – São Paulo) (2013). Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo [recurso eletrônico] 303p. Color, Série Relatórios / CETESB, São Paulo [ISSN 0103-4103], www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes.asp

Copat, C., Brundo, M.V., Arena, G., Grasso, A., Conti, G.O., Ledda, C., Fallico, R. Sciacca, S., Ferrante, M., 2012. Seasonal variation of bioaccumulation in *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) and related biomarkers of exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 86, 31–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.006>

Danion, M., LeFloch, S., Lamour, F., Quentel, C., 2014. Effects of in vivo chronic exposure to pendimethalin on EROD activity and antioxidant defenses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 99, 21–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.024>

- Elskus, A.A., 2004. Estradiol and estriol suppress CYP1A expression in rainbow trout primary hepatocytes. *Mar. Environ. Res.* 58, 463–467.
- Engqvist, L., 2005. The mistreatment of covariate interaction terms in linear model analyses of behavioural and evolutionary ecology studies. *Anim. Behav.* 70, 967-971.
- Fedorenkova, A., Vonk, J.A., Breure, A.M., Hendriks, A.J., Leuven, R.S.E.W. 2013. Tolerance of native and non-native fish species to chemical stress: a case study for the River Rhine. *Aquat. Invasions* 8, 231–241. <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2013.8.2.10>
- Förlin, L., Haux, C., 1990. Sex differences in hepatic cytochrome P-450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. *J. Endocrinol.* 124, 207–213.
- Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gavilán, J.F., Barra, R., 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere* 61, 192–199. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.02.062
- Gagnon, M.M., Hodson, P.V., 2012. Field studies using fish biomarkers – How many fish are enough? *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2871–2876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.08.016>
- Goksøyr, A., Förlin, L., 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* 22, 287-311.
- Gorbi, S., Baldini, C., Regoli, F., 2005. Seasonal Variability of Metallothioneins, Cytochrome P450, Bile Metabolites and Oxyradical Metabolism in the European Eel *Anguilla 41arbell41* L.

(Anguillidae) and Striped Mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 49, 62-70.

Hugla, J.L., Philippart, J.C., Kremers, P., Goffinet, G., Thome, J.P., 1995. PCB contamination of the common barbel, *Barbus barbus* (Pisces, Cyprinidae), in the River Meuse in relation to hepatic monooxygenase activity and ultrastructural liver change. Neth. J. Aquat. Ecol. 29, 135-45.

Iwanowicz, L.R., Blazer, V.S., McCormick, S.D., VanVeld, P.A., Ottinger, C.A., 2009. Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. Aquat. Toxicol. 93, 70-82.
doi:10.1016/j.aquatox.2009.03.008

Klemz, C., Salvo, L.M., Bastos Neto, J.C., Bairy, A.C.D., Assis, H.C.S., 2010. Cytochrome P450 Detection in Liver of the Catfish *Ancistrus multispinis* (Osteichthyes, Loricariidae). Braz. Arch. Biol. Technol. 53, 361-368.

Koenig, S., Solé, M., 2012. Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. Mar. Environ. Res. 79, 122-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.06.005>

Kopecka, J., Pempkowiak, J., 2008. Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. Ecotoxicol. Environ. Saf. 70, 379-391. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.05.017

Mihailovic, M., Arambasic, J., Bogojevic, D., et al. 2006. Expression of CYP1a in the hepatopancreas of *Merluccius merluccius*, *Trigla lucerna*, and *Liza ramada* (Pisces) in the wider vicinity of Bar Harbor Montenegro. Arch. Biol. Sci. 58, 165-170.

- Moretto, E. M., Marciano, F. T., Velludo, M. R., Fenerich-Verani, N., Espindola E. L. G., Rocha. O., 2008. The recent occurrence, establishment and potential impact of *Geophagus proximus* (Cichlidae: Perciformes) in the Tietê River reservoirs: an Amazonian fish species introduced in the Paraná Basin (Brazil). *Biodivers. Conserv.* 17, 3013-3025. doi: 10.1007/s10531-008-9413-5
- Mortatti, J., Moraes, G.M., Probst, J.L., 2011. Heavy metal distribution in recent sediments along the Tietê River basin (São Paulo, Brazil). *Geoch. J.* 46, 13-19.
- Nahrgang, J., Brooks, J.S., Evenset, A., Camus, L. Jonsson, M., Smith, T.J., Lukina, J., Frantzen, M., Giarratano, E., Renaud, P.E., 2013. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) – Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquat. Toxicol.* 127, 21– 35. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.009
- Nahrgang, J., Camus, L., Broms, F., Christiansen, J.S., Hop, H., 2010. Seasonal baseline levels of physiological and biochemical parameters in polar cod (*Boreogadus saida*): Implications for environmental monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1336-1345. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.03.004
- Nomura, H., 1984 in Carnélos, R.G., Benedito-Cecilio, E., 2002. Reproductive strategies of *Plagioscion squamosissimus* Heckel, 1840 (Osteichthyes Scianidae) in the Itaipu Reservoir, Brazil. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 45, 317–324.
- Orrego, R., Moraga-Cid, G., González, M., Barra, R., Valenzuela, A., Burgos, A., Gavilán, J.F., 2005. Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female Rainbow Trout

(*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. Environ. Toxicol. Chem. 24, 1935–1943.

Pampanin, D.M.; Andersen, O.-K.; Viarengo, A., 2006. Background for the BEEP Stavanger workshops: biological effects on marine organisms in two common, large, laboratory experiments and in a field study: comparison of the value (sensitivity, specificity, etc.) of core and new biomarkers. Aquat. Toxicol. 78, S1-4. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.011

Parente, T.E., De-Oliveira, A.C., Paumgarten, F.J., 2008. Induced cytochrome P450 1A activity in cichlid fish from Guandu River and Jacarepagua Lake, Rio de Janeiro, Brazil. Environ. Pollut. 152, 233–238. doi:10.1016/j.envpol.2007.04.025

Pettesse, M.L., Petreire, Jr., M., Spigolon, R.J., 2007. The hydraulic management of the Barra Bonita reservoir (SP, Brazil) as a factor influencing the temporal succession of its fish community. Braz. J. Biol. 67, 433-445.

Ratia, H., Oikari, A., 2014. Vertical distribution of AhR-activating compounds in sediments contaminated by modernized pulp and paper industry. Water Res. 502, 27-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.11.036>

Rodgher, S., Espíndola, E.L., Rocha, O., Fracácio, R., Pereira, R.H., 2005. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tietê River (São Paulo, Brazil). Braz. J. Biol. 65, 697-710.

Roméo, M., Giambérini, L., 2013. History of Biomarkers. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S. (Eds.), Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 15-43.

Santos, D.M., Santos, G.S., Cestari, M.M., Ribeiro, C.A.O., Assis, H.C.S., Yamamoto, F., Guiloski, I.C., Marchi, M.R.R., Montone, R.C., 2014. Bioaccumulation of butyltins and liver damage in the demersal fish *Cathorops spixii* (Siluriformes, Ariidae). Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 3166–3174. doi:10.1007/s11356-013-2280-y

Shapiro, D., 1982. Steroid hormone regulation of vitellogenin gene expression. CRC Crit. Rev. Biochem. 12, 187–203.

Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. C 123, 193–199.

Sleiderink, H.M., Oostingh, I., Goksøyr, A., Boon, J.P., 1995. Sensitivity of cytochrome P450 1A induction in dab (*Limanda limanda*) of different age and sex as a biomarker for environmental contaminants in the southern North Sea. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 28, 423–30.

Snowberger, G.E., Woodin, B.R., Stegeman, J.J., 1991. Sex differences in hepatic monooxygenases in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and the regulation of P450 forms by estradiol. J. Exp. Zool. 259, 330–342.

Statsoft Inc, 1997. Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft. Available from: <<http://www.statsoft.com>>.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr,

Bergman, H.L. (Eds.), Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.

Traven, L., Mićović, V., Vukić Lušić, D., Smital, T., 2013. The responses of the hepatosomatic index (HSI), 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and glutathione-S-transferase (GST) activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) caged at a polluted site: implications for their use in environmental risk assessment. Environ, Monit, Assess. 185, 9009–9018. doi: 10.1007/s10661-013-3230-3

Trídico, C.P., Rodrigues, A.C.F., Nogueira, L., Silva, D.C., Moreira, A.B., Almeida, E.A., 2010. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 858–863. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.01.016

Underwood, A.J., 1997. Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance. Cambridge University Press, Cambridge.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.

Vazzoler, A. E. A., 1996: Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática [Reproduction of teleosts: theory and practice]. Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Crit. Rev. Toxicol. 30, 347-570.

CAPÍTULO 3

**Parasitos de peixes como bioindicadores de impactos ambientais e moduladores da
atividade da EROD em represas no Rio Tietê, Brasil**

ABSTRACT

Fish parasites and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity have been considered useful tools to indicate environmental impact in aquatic ecosystems. Although parasite burden and EROD activity in fish have been used as bioindicator and biomarker of environmental impact respectively, their values can be affected by seasonality, parasites burden and host related factors. We therefore examined whether the parasite burden and EROD activity of the silver croaker *Plagioscion squamosissimus* and the parasite burden of *Geophagus proximus* were affected in a pollution gradient, considering host related-factors, and seasonality. We collected fish and parasites and determined EROD levels from four localities with different pollution levels (Barra Bonita = polluted; Bariri = slightly polluted; Ibitinga = unpolluted; Promissão = unpolluted) on the early-rainy (November 2012), rainy (March 2013), and dry (July to August 2013) seasons from Tietê River, Southeast Brazil. For *P. squamosissimus* we found that the monogenean *Diplectanum piscinarius* had the highest abundance in Barra Bonita on the early-rainy and rainy seasons, with a significant decrease of this species on the dry season in all localities. The abundance of the metacercariae *Austrodiplostomum compactum* was very variable with high abundance on the early-rainy season at Barra Bonita and Bariri, while in *G. proximus* we found higher abundance of this metacercariae in Bariri and Ibitinga. No significant statistical effect on EROD activity was found with respect to the abundance of *D. piscinarius* or *Austrodiplostomum compactum* using as covariates. In contrast, we observed an influence of the higher abundance of *D. piscinarius* on EROD activity in *P. squamosissimus*, suggesting a potential modulation on this biomarker in the polluted place (Barra Bonita). Our results suggest that low parasite abundance of *Austrodiplostomum compactum* is not enough to interfere with biomarker levels in the silver croaker. A potential explanation for the high abundance of *D. piscinarius* in the polluted localities is that the pollutants could be acting as immunosuppressors in *P. squamosissimus*, enhancing parasitism. The statistical association between EROD activity and sex could be due to the reproductive status of females that downregulated the EROD levels. Our results revealed that, the higher abundances of *D. piscinarius* and the reproductive status of females in *P. squamosissimus* could be a significant confounding factor to determine EROD activity in freshwater ecosystems.

Keywords: Biomonitoring; EROD; bioindicators; parasites; Tietê River; tropical/subtropical reservoirs

1. INTRODUÇÃO

Os parasitos de peixes são parte integrante das comunidades naturais e exercem grande influência na população dos hospedeiros (Thomas *et al.*, 2005). Nas últimas décadas, surgiram muitos estudos demonstrando o papel que os parasitos tem dentro das comunidades ecológicas (Thomas *et al.* 2005; Lafferty & Kuris, 2005), com destaque para o aumento da complexidade, conectância e saúde dos ecossistemas (Hudson *et al.*, 2006; Lafferty *et al.*, 2008).

Além disso, as alterações da abundância e riqueza dos parasitos, levando a mudanças na estrutura e composição das comunidades de parasitos de peixe como resposta a diferentes formas de poluição tem sido usadas nos últimos anos como bioindicadores de impactos ambientais (Vidal-Martínez *et al.*, 2010). Essas alterações nos parasitos são geralmente causadas pelas atividades antropogênicas, pois os contaminantes atuam como imunossupressores do sistema imune dos hospedeiros, tornando-os susceptíveis a novas infecções (Lafferty & Kuris, 2005). As substâncias tóxicas, tais como metais ou bifenilas policlorados, bem como o efeito da eutrofização nos ecossistemas aquáticos também podem afetar a ocorrência e transmissão dos parasitos (Valtonen *et al.*, 1997; Nachev & Sures, 2009). Diamant *et al.* (1999), demonstraram um efeito significativo da poluição na redução da abundância e diversidade dos parasitos, principalmente nos parasitos de ciclos de vidas complexos.

Embora o uso de parasitos como indicadores de poluição ambiental tenha crescido nos últimos anos (Vidal-Martínez *et al.* 2010), alguns pesquisadores tem alertado para estudos que integram os parasitos dentro de um contexto de larga escala para compreender os diferentes fatores (e.g. variações espaciais e temporais) que influenciam sua dinâmica nos diferentes ecossistemas (Kuris *et al.* 2008). A caracterização desses fatores naturais (e.g. sazonalidade, temperatura, pH, etc.) e antropogênicos (e.g. metais pesados, bifenilas policloradas, etc.) são extremamente importantes, pois revelam uma complexa interação entre parasitos, hospedeiros e as condições ambientais (Lafferty & Kuris, 1999). As atividades antropogênicas somadas aos fatores naturais

operam através de uma variedade de vias nos ecossistemas aquáticos, o que dificulta estabelecer uma relação causal clara entre o parasitismo e as mudanças ambientais (Lafferty *et al.*, 2008). A poluição antropogênica, por exemplo, pode ainda alterar as condições ambientais com efeitos negativos diretos na sobrevivência e infectividade (e.g. cercarias de digenéticos), com significativos impactos sobre a transmissão dos parasitos aos peixes (Pietrock & Marcogliese, 2003).

Além dos parasitos de peixes, os biomarcadores de poluição também se tornaram ferramentas importantes no monitoramento da poluição aquática (Van der Oost *et al.*, 2003). Existem muitos estudos que tem utilizado biomarcadores em diferentes espécies de peixes, como a indução da CYP1A ou atividade da EROD provocada pela exposição a hidrocarbonetos aromáticos (PAH) (Stegeman & Lech, 1991; Parente *et al.*, 2004; Trujillo-Jiménez *et al.*, 2011; Santos *et al.* 2014; Vrankovic & Slavic, 2015), a indução da vitelogenina plasmática devido a ação de estrogênios ambientais (Sumpter & Jobling, 1995; Weber *et al.*, 2004), e a indução de adutos no DNA causada por PAHs (Shugart *et al.*, 1992), entre outros.

Embora esses biomarcadores sejam amplamente usados em monitoramento ambiental, alguns estudos têm demonstrado que os parasitos também podem modular as respostas destes biomarcadores de poluição, gerando resultados falsos-positivos e falsos-negativos (Frank *et al.* 2011; Minguez *et al.* 2012). Alguns estudos têm demonstrado que certos parasitos como *Apharyngostrigea* sp. (Metacercárias) (Pech *et al.*, 2009), *Trichodina* spp. (Ciliados) (Broeg *et al.*, 1999), *Lepeophtheirus pectoralis* (Copépode) e *Zoogonoides viviparus* (Digenético) (Schmidt *et al.*, 2003), podem modular as respostas da CYP1A e da atividade enzimática da EROD. A combinação dos parasitos e contaminantes, pode aumentar os efeitos subletais nos peixes, quando comparado com o efeito de um desses estressores (e.g. parasitos ou contaminante) atuando sozinho (Marcogliese *et al.*, 2010). Embora haja estudos que comprovam esta modulação, o mecanismo

pelo qual as infecções e estímulos inflamatórios modulam as atividades das CYPs (CYP1A ou EROD), ainda permanecem desconhecidos e pobremente estudados (De-Oliveira *et al.*, 2010).

Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência das condições ambientais das represas do Rio Tietê através das variações das comunidades de parasitos de *Plagioscion squamosissimus* e *Geophagus proximus*, da indução da atividade da EROD e também verificar uma possível modulação dos parasitos sobre a atividade deste biomarcador em *P. squamosissimus*.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em quatro represas com diferentes condições ambientais (e.g. nível de poluição e distância da região metropolitana de São Paulo), localizados no médio/baixo da bacia do Rio Tietê (Figura 1), Alto Rio Paraná (Sampaio, 1944), a saber: Barra Bonita ($22^{\circ}90'S$ e $48^{\circ}34'N$); Bariri ($22^{\circ}06'S$ e $48^{\circ}45'N$); Ibitinga ($21^{\circ}45'S$ e $48^{\circ}59'N$); Promissão ($21^{\circ}17'S$ e $49^{\circ}47'N$) (Figura 2).

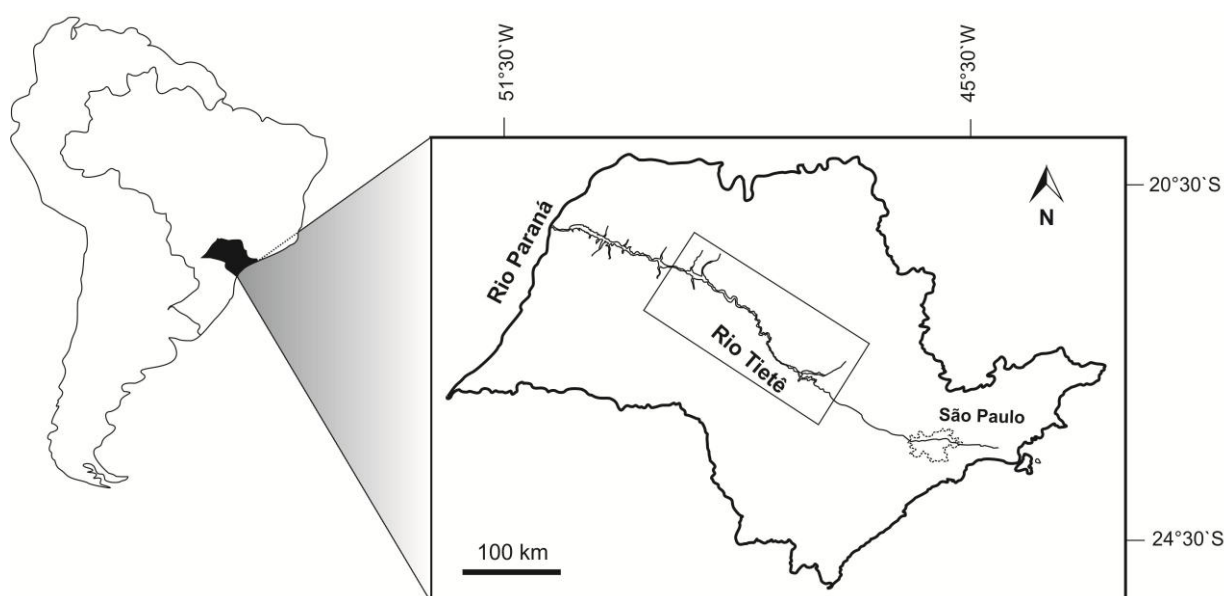


Figura 1. Mapa indicando a área de estudo (larga escala = $\sim 400\text{km}$) que compreende as quatro represas foco deste estudo no trecho médio/baixo da bacia do Rio Tietê, Estado de São Paulo.

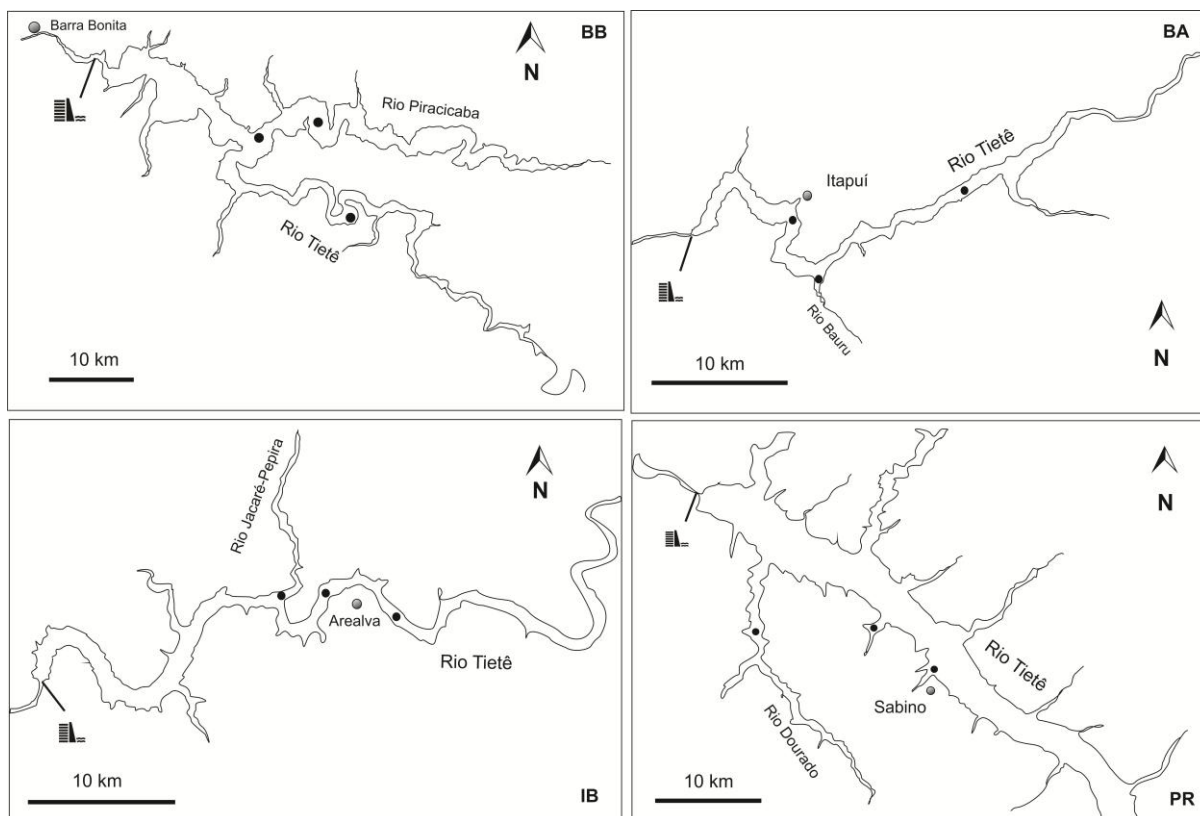


Figura 2. Localização dos pontos de coleta (pontos em pretos) nos rios tributários e nas represas de Barra Bonita (BB), Bariri (BA), Ibitinga (IB) e Promissão (PR) na bacia do Rio Tietê, Estado de São Paulo.

Essas represas foram escolhidos com base nas "Diretrizes de qualidade dos sedimentos para a proteção da vida aquática", estabelecido pelo Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente (CCME, 2002) e da Agência Ambiental do Estado de São Paulo (CESTESB, 2012; 2013). Essas diretrizes estabelecem um critério para classificar os corpos de água com base nas concentrações de contaminantes químicos (e.g. Bifenilas policloradas; BPCs). Este critério é baseado em dois níveis limite, um abaixo do qual a vida aquática é pouco afetadas (TEL = limiar do nível de efeito), e um acima do qual os efeitos sobre a vida aquática é provável, ou seja, mais de 50% de probabilidade (PEL = nível de efeito provável) (Burton, 2002).

- **Represa de Barra Bonita (BB)** – intensidade de contaminação por BPCs é considerável a muito alta (acima de PEL);
- **Represa de Bariri (BA)** - intensidade de contaminação por BPCs é considerável (entre TEL-PEL);
- **Represa de Ibitinga (IB)** – Intensidade de contaminação por BPCs é baixa (abaixo ou igual a TEL).
- **Represa de Promissão (PR)** – intensidade de contaminação por BPCs é baixa (abaixo ou igual a TEL).



Figura 3. Classificação de contaminantes químicos em cinco faixas de qualidade e sua relação com os critérios TEL e PEL. Abaixo de TEL indica ausência de risco à biota; entre TEL e PEL indicam qualidade boa e regular; acima de PEL indica uma qualidade ruim com potenciais efeitos sobre a vida aquática (adaptado de CETESB, 2013).

2.2 Delineamento amostral

Em cada localidade/represa foram estabelecidos três pontos de coleta, a saber: um nos rios tributários principais de cada represa e dois na calha/canal central da represa, totalizando 12 pontos de coletas distribuídos ao longo de 400km na bacia do Rio Tietê (Barra Bonita = 3; Bariri = 3; Ibitinga = 3 e Promissão = 3) (Figura 2).

Este delineamento foi baseado em Underwood (2000), que recomenda um número de réplicas adequadas entre sítios referência/controle e perturbado/poluído. Segundo este autor, a

comparação de sítios poluídos e não poluídos deve-se seguir um delineamento hierárquico (gradiente), com sítios replicados em cada condição (perturbado/controle), medidos simultaneamente e independentemente (Green, 1979; Underwood, 1997). Para evitar grandes interstícios entre uma localidade e outra, foi padronizado um dia de coleta para cada represa, com duração de no máximo 5 dias por estação (ver detalhes no item 2.3 abaixo).

As variáveis limnológicas foram obtidas através de um aparelho multissensor da marca Horiba (modelo U-50, Kyoto, Japão). Para obter uma média das variáveis abióticas foram feitas três medidas para representar melhor a variabilidade das condições de cada represa. Essas medidas foram feitas a uma profundidade de 1,5 m. Foram coletadas três medidas para cada ponto amostral distribuído nos rios tributários e nas represas de Barra Bonita (BB), Bariri (BA), Ibitinga (IB) e Promissão (PR) (ver pontos em pretos na Figura 2).

Para cada ponto amostral foram medidos os fatores físico-químicos da água como oxigênio dissolvido ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), pH, condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), sólidos dissolvidos totais (g/L) e transparência da água (por meio de um disco de Secchi) com auxílio de um aparelho multissensor. A profundidade local também foi verificada com um profundímetro digital juntamente com a leitura do aparelho multissensor. Em cada represa foram feitas nove mensurações (três em cada ponto da represa) para obter uma média de cada fator abiótico analisado.

2.3 Coleta e processamento dos peixes

As duas espécies de peixes foram coletadas usando redes, tarrafas e linha e anzol durante três estações/períodos, a saber: pré-chuvoso (Novembro 2012), chuvoso (Março 2013) e seco (Julho-Agosto 2013). Essas espécies foram selecionadas em função da abundância, facilidade de coleta, importância ecológica, informações prévias das espécies (parasitos, crescimento, reprodução e ecologia da espécie) e papel no ecossistema da região (posição trófica), a saber:

- *Plagioscion squamosissimus* (nome popular: Corvina, Figura 4A) – espécie introduzida com hábito alimentar carnívora e comportamento sedentária no Rio Tietê, inclusive com importância econômica para a pesca na região. Além disso, é uma espécie que já existem trabalhos parasitológicos na mesma bacia (Paes *et al.*, 2009; Lacerda *et al.*, 2012).
- *Geophagus proximus* (nome popular: Porquinho, Figura 4B) – espécie introduzida com hábito alimentar iliófago e detritívoro. É uma espécie abundante e com importância econômica para a pesca na região. Ambas as espécies apresentam abundância elevadas o que facilita a obtenção de um N amostral robusto para análises parasitológicas e de biomarcadores.

Após coletados com redes os peixes foram mantidos vivos com aeração até as necropsias, momento em que foi retirado o fígado, embrulhado em papel alumínio devidamente identificado e acondicionado em um galão portátil de nitrogênio líquido (-196°C) para a determinação da atividade enzimática da EROD (ver detalhes no Capítulo 2) no Laboratório de Toxicologia Ambiental (FIOCRUZ, Rio de Janeiro). Após a retirada do fígado, os peixes foram individualizados em sacos plásticos e congelados para as análises parasitológicas no Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Departamento de Parasitologia, UNESP, Botucatu, São Paulo.

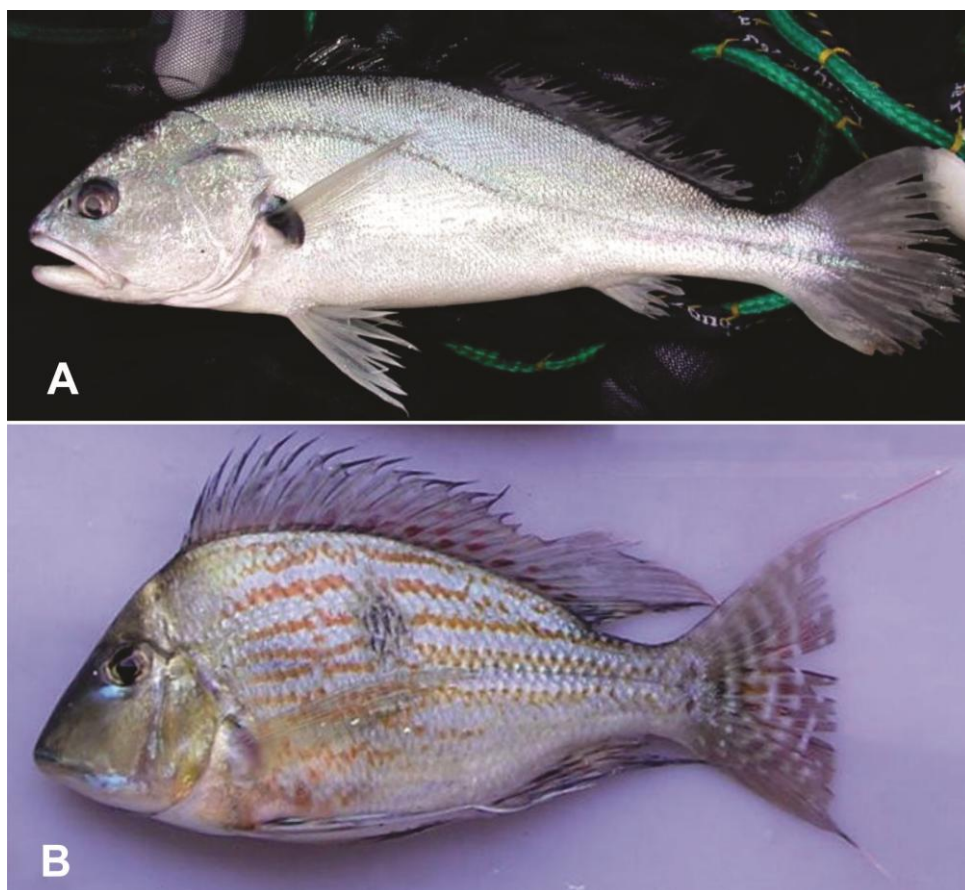


Figura 4. Exemplares de corvina *Plagioscion squamosissimus* (A) e de porquinho *Geophagus proximus* (B) coletados na bacia do Rio Tietê, São Paulo (Fonte: Ana Paulo Vidotto e Wikipeixes).

2.4 Coleta e identificação dos parasitos

Os peixes foram necropsiados e examinados quanto à presença de ectoparasitos e endoparasitos. Primeiramente, as brânquias foram coletadas e acondicionadas em frascos de vidro contendo água quente a 70-75°C. Posteriormente, os frascos foram agitados vigorosamente para separar os parasitos do tecido branquial e adicionado álcool absoluto (Boeger & Vianna, 2006).

Em relação aos endoparasitos os peixes foram dissecados com incisão ântero-posterior, ao longo da linha média ventral, tendo-se o cuidado de não provocar danos aos órgãos internos. As vísceras foram removidas e colocadas individualmente em placas de Petri com água destilada. Os órgãos examinados foram isolados da seguinte forma: olho direito, olho esquerdo, coração, baço, vesícula biliar, intestinos, rim, bexiga urinária e gônadas. Os parasitos encontrados foram

quantificados e fixados. Os parasitos pertencentes ao Filo Nematoda foram mortos em AFA aquecido, e posteriormente mantidos em frascos com álcool 70%.

Para identificação dos monogenoidea, foram montadas lâminas em Hoyer's e coradas com Tricrômico de Gomori (Humason, 1979). A coleta dos parasitos seguiu protocolos de acordo com Eiras *et al.* (2006) e a identificação baseada em Thatcher (1991, 2006), Moravec (1998), Eiras *et al.* (2010), Cohen *et al.* (2013). As técnicas de preparação e fixação dos parasitos seguiram os protocolos de Amato *et al.* (1991) e Vidal-Martínez *et al.* (2001).

Para a documentação, mensuração e identificação dos parasitos foram utilizados microscópios de contraste diferencial (DIC, Leica DM 5000 B), acoplado a um sistema computadorizado de análise de imagem (LAS versão 3.8.0).

Os parasitos foram depositados na Coleção Helminológica do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências de Botucatu (CHIBB), da UNESP, Botucatu, São Paulo.

2.5 Análise dos dados

Os parâmetros parasitológicos usados foram prevalência (P, %) e abundância média ($AM \pm DP$), seguidos do desvio padrão ($\pm DP$).

As diferenças entre machos e fêmeas em tamanho, índice hepatossomático, parasitismo e EROD entre as estações do ano foram examinados com o teste de Kruskal-Wallis não paramétrico, seguida do teste post-hoc de Dunn. A correlação entre sexo, parasitismo e atividade EROD foi determinada pelo coeficiente de correlação de Spearman e através de regressão linear e múltipla (Zar, 2010).

Os dados da atividade da EROD, status reprodutivos, sexo, tamanho e parasitismo foram verificados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade da variância (teste de Bartlett). Quando os requisitos de normalidade e homogeneidade de variância não foram atendidos, foram utilizados os testes não paramétricos para todas as análises (Zar, 2010).

A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para avaliar o efeito do tamanho, sexo e parasitismo (covariáveis) na resposta da atividade da EROD entre os locais e as estações (Sokal & Rohlf, 1995; Zar, 2010). Antes de realizar a ANCOVA propriamente dita, testaram-se o efeito dessas covariáveis sobre a variável independente (atividade da EROD) com o teste de homogeneidade. Este teste realiza uma regressão entre as covariáveis selecionadas com a variável independente (EROD). Neste caso, um efeito de interação significativo entre as covariáveis e a EROD indica que a diferença entre os grupos (ou seja, localidade e estações) depende do valor da covariáveis (Engqvist, 2005). Este procedimento é importante porque visa controlar os efeitos das covariáveis durante as comparações entre os tratamentos, ou seja, quando as covariáveis como tamanho, sexo e parasitismo (abundância e espécie) exercem influência nas respostas dos biomarcadores (Engqvist, 2005; Koenig & Solé, 2012).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica versão 7.1 (Statsoft, EUA), e os gráficos foram realizados no software R (R Development Team; <http://www.R-project.org>). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ e os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. *Análises limnológicas & qualidade da água baseado em PEL-TEL*

As variáveis abióticas foram diferentes entre as represas estudadas como demonstrada na Tabela 1. De um modo geral, as represas de Barra Bonita e Bariri apresentaram os maiores valores de condutividade em relação às demais. Os altos valores de condutividade nestas represas estão associados às descargas de poluentes, pois estão localizadas mais próximas de grandes centros urbanos (região metropolitana de São Paulo). A temperatura oscilou entre as três estações, com queda nos meses de inverno em todas as represas. O pH, sólidos dissolvidos totais e oxigênio dissolvido também variaram ao longo das estações, mas principalmente entre as represas. A profundidade variou entre 5 a 9 em Barra Bonita, 7 a 11 em Bariri, 8 a 12 em Ibitinga e 9 a 12 em Promissão. As menores profundidades foram observadas nos períodos secos (Julho-Agosto) de cada represa.

De acordo com dados recentes da CETESB (2013), a represa de Barra Bonita e o Rio Piracicaba apresentam índices de contaminação por metais pesados (Cu, Cr, As, Ni acima de PEL), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs: Benzo(a)antraceno, Dibenzo(a,h)antraceno; entre TEL-PEL) e bifenilas policloradas (PCBs totais, 2-8 bifenilas policloradas; entre TEL-PEL). A represa de Bariri tem sido contaminada por alguns metais pesados (Ag; entre TEL-PEL), bifenilas policloradas e alguns pesticidas (p. ex.: Lindano, Endrin; entre TEL-PEL). Enquanto que as represas de Ibitinga e Promissão os contaminantes registrados estão abaixo ou igual à TEL.

Tabela 1. Valores médios das variáveis limnológicas coletados para cada Represa no Rio Tietê, durante os períodos de Novembro de 2012 (pré-chuvoso), Março de 2013 (chuvoso) e Julho-Agosto de 2013 (seco).

Localidade	Estação	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Condutividade (mS/cm)	Sólidos dissolvidos totais (g/L)
Barra Bonita (BB)	Pré-chuvoso	26.9±1.2	6.9±0.7	6.2±1.2	324±18.5	187±6.8
	Chuvoso	26.3±1.1	7.3±1.1	7.2±0.7	315±13.3	168±10.1
	Seca	21.5±1.3	7.6±1.4	7.6±1.7	244±9.8	158±9.1
Bariri (BA)	Pré-chuvoso	27.1±1.1	7.4±0.8	5.6±0.9	304±11.1	179±7.1
	Chuvoso	29.5±1.2	6.7±0.9	4.1±1.3	280±8.7	143±8.1
	Seca	21.2±1.4	6.9±0.5	6.1±1.2	252±8.9	166±9.1
Ibitinga (IB)	Pré-chuvoso	26.9±1.1	7.2±1.3	7.9±1.3	254±7.7	93±5.3
	Chuvoso	29,9±0.8	7.8±0.7	7.8±1.7	234±8.9	88±5.1
	Seca	22,3±1.2	7.9±1.8	7.1±0.7	220±4.7	100±5.8
Promissão (PR)	Pré-chuvoso	28.7±1.4	8.2±1.1	7.9±1.3	115±7.1	75±6.3
	Chuvoso	31.1±0.8	7.2±0.9	7.8±1.4	220±8.6	111±5.3
	Seca	24.1±1.2	7.9±1.2	7.7±0.9	148±6.7	134±7.8

*Valores = Média±desvio padrão

3.2. Análises parasitológicas

3.2.1 *Plagioscion squamosissimus*

Foram analisados 213 exemplares da espécie *Plagioscion squamosissimus* coletados durante três períodos denominados: pré-chuvoso (Novembro/2012), chuvoso (Março/2013) e seco (Julho-Agosto/2014).

Foram encontradas parasitando *P. squamosissimus* três espécies de parasitos (Tabela 2), na bacia do Rio Tietê, a saber: metacercárias de *Austrodiplostomum compactum* (Figura 5) (Prevalência = 95,3; Abundância média = $34,15 \pm 3,12$), *Diplectanum piscinarius* (Figura 6) (Prevalência = 99,57; Abundância média = $63,29 \pm 3,31$); e larva de *Contracaecum* sp. (Encontrado apenas um exemplar).

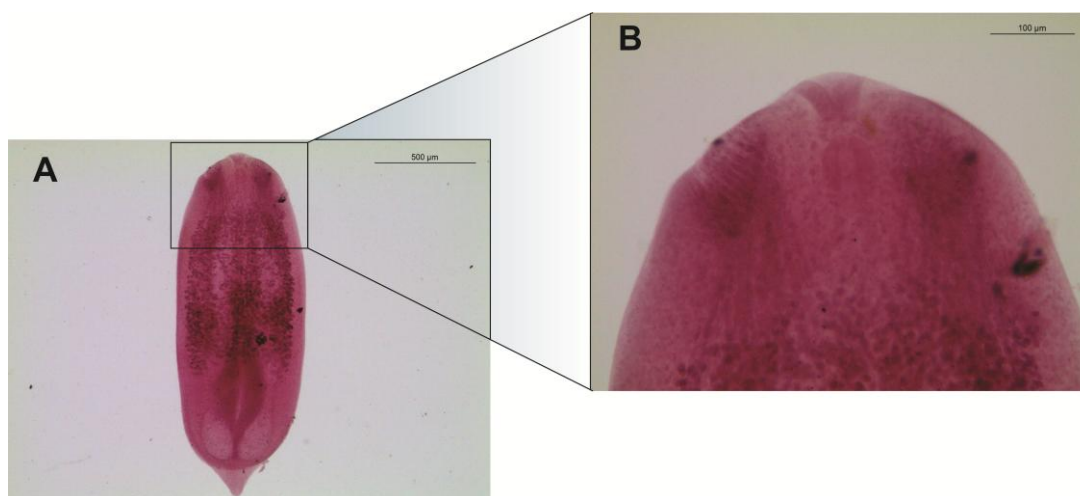


Figura 5. Morfologia de *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928). **A.** Metacercária coletada em humor aquoso; **B.** Detalhe da ventosa oral e das pseudoventosas. Escala em micrômetros (µm).

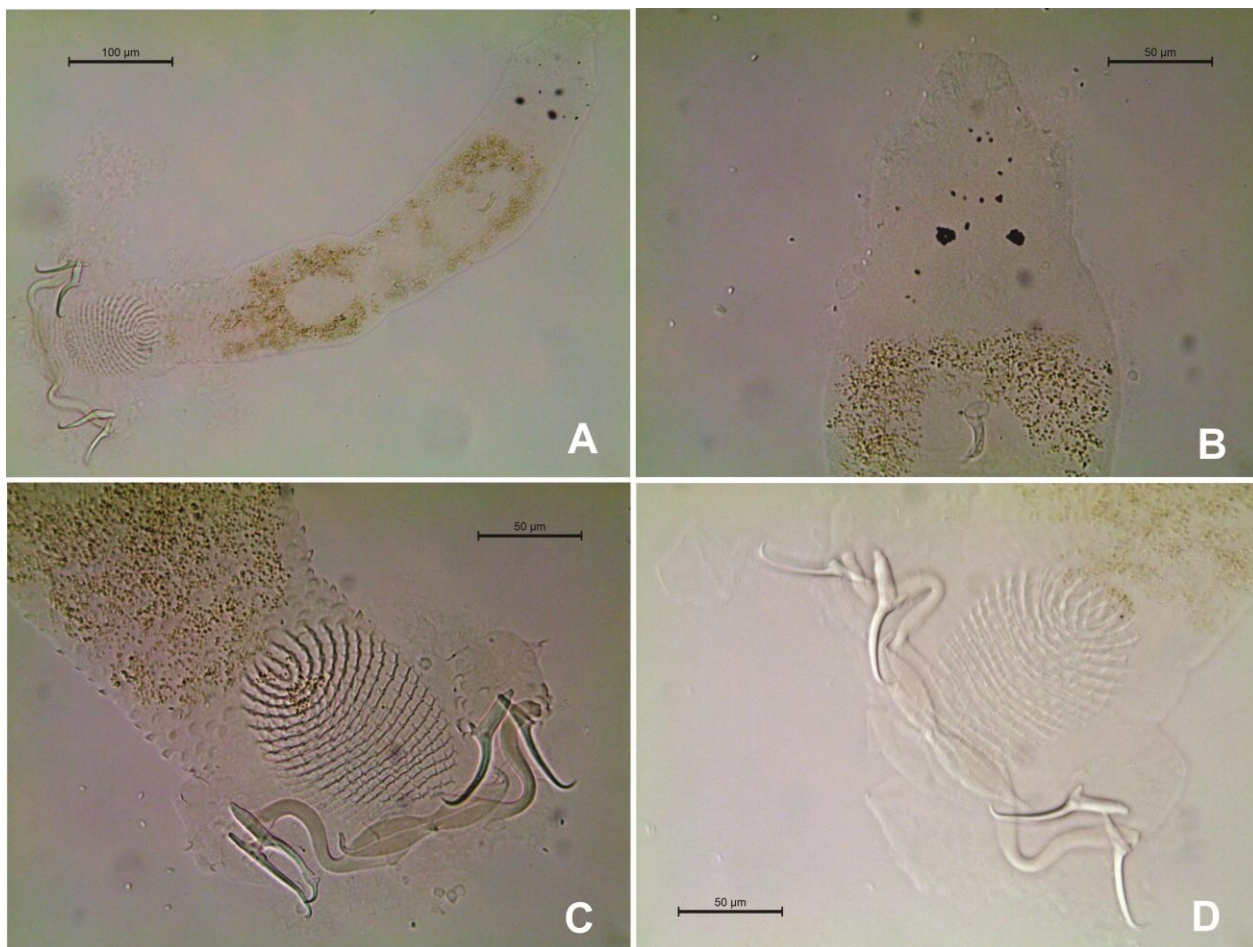


Figura 6. Morfologia de *Diplectanum piscinarius* Kritsky & Thatcher, 1984. **A.** Adulto em vista dorsal; **B.** Complexo copulatório. **C.** Haptor com detalhes das barras e esquamodiscos; **D.** Haptor com detalhes das âncoras. Escala em micrômetros (μm).

As maiores abundâncias de *D. piscinarius* estão associadas à represa de Barra Bonita nos períodos de Novembro de 2012 (Abundância média = $79,36 \pm 30,14$; $H = 5,89$; $p = 0,004$) e Março de 2013 (Abundância média = $59,10 \pm 21,53$; $H = 5,36$; $p = 0,007$), com uma diminuição significativa nos meses de Julho e Agosto (inverno) em todas as localidades ($H = 8,67$; $gl = 2$; $p = 0,013$). De um modo geral, observamos uma variação na abundância de *D. piscinarius* na área mais poluída (Barra Bonita), em relação às represas de Bariri e Promissão ($H = 6,03$; $df = 2$; $p = 0,04$).

Para metacercária *A. compactum*, as maiores abundâncias variaram entre as represas, sem um padrão claro de infecção para esta metacercária no Rio Tietê (Tabela 2). De um modo geral, as

diferenças significativas na abundância de *A. compactum* foram encontradas nos períodos pré-chuvoso e seco, enquanto que na estação chuvosa não houve diferença entre as represas ($p = 0,06$).

A análise de covariância também nos indicou que as abundâncias de *D. piscinarius* e *A. compactum* variaram significativamente entre as localidades e estações (ANCOVA, $F_{8,404} = 3,44$; $p = 0,0007$), quando controlamos a variável tamanho no modelo como covariável (ANCOVA, $F_{2,202} = 18,1$; $p < 0,0001$). Embora o tamanho influencie as variações nas abundâncias dos parasitos, a análise de covariância (ANCOVA) demonstrou diferenças entre as represas (Figura 7) e estações (Figura 8), removendo o efeito do tamanho dos peixes durante as análises.

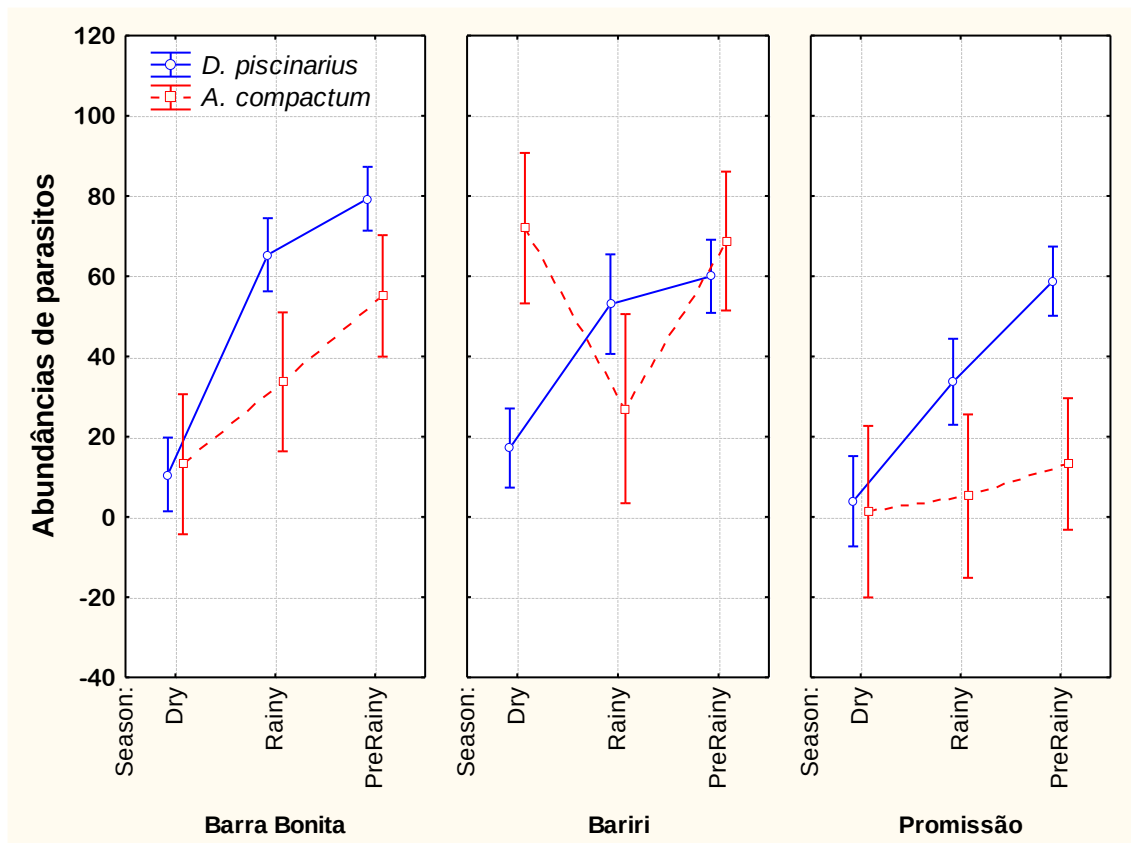


Figura 7. Gráficos mostrando a variação das comunidades de parasitos de *Plagioscion squamosissimus* entre as represas durante as três períodos (seco, chuvoso e pré-chuvoso).

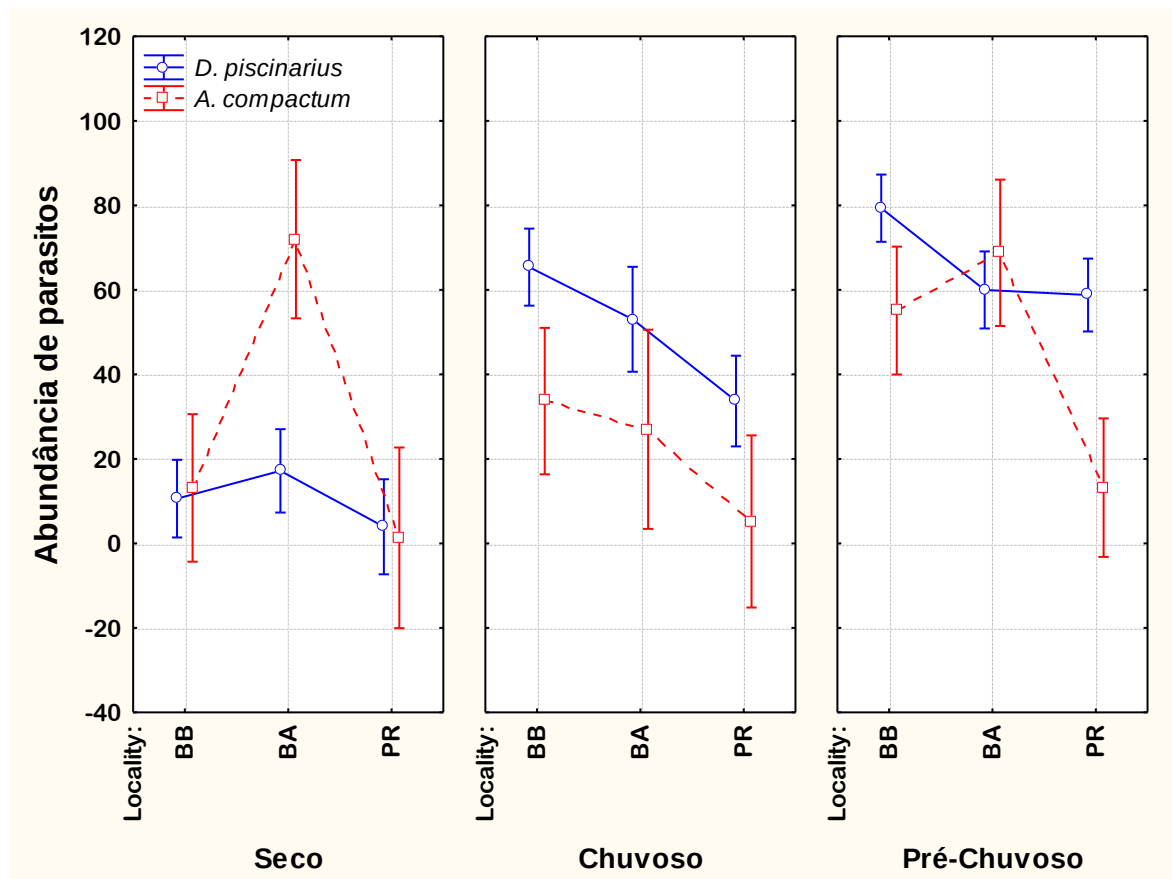


Figura 8. Gráficos mostrando a variação das comunidades de parasitos de *Plagioscion squamosissimus* entre as represas durante as três períodos (seco, chuvoso e pré-chuvoso).

Tabela 2. Dados parasitológicos da corvina *Plagioscion squamosissimus* coletadas nos reservatórios de Barra Bonita, Bariri e Promissão, durante os meses de Novembro de 2012 (Pré-Chuvosa), Março (Chuvosa) e Julho-Agosto de 2013 (Seca).

Local/Estação	<i>A. compactum</i> [#]					<i>D. piscinarius</i> [*]				
	N	NP	P (%)	AM±DP	Min-Max	N	NP	P (%)	AM±DP	Min-Max
Nov/12										
Barra Bonita	30	30	100	55,2±72,3 ^a	3-237	30	30	100	79,4±30,1 ^a	10-137
Bariri	30	30	100	45,8±37,9 ^a	1-159	30	30	100	60,3±25,6 ^b	6-109
Promissão	26	21	80,7	18,9±22,1 ^b	0-71	26	26	100	53,7±34,1 ^b	7-132
H				12,88					5,89	
p				0,002					0,004	
Mar/13										
Barra Bonita	30	28	93,3	10,7±8,8 ^a	0-30	30	30	100	59,1±21,5 ^a	15-108
Bariri	18	18	100	12,6±9,2 ^a	2-32	18	18	100	46,2±17,9 ^b	16-97
Promissão	27	27	100	36,5±40,2 ^a	1-146	27	27	100	42,6±18,9 ^b	8-92
H				5,47					5,36	
p				0,065					0,007	
Jul-Ago/13										
Barra Bonita	27	24	88,9	17,7±36,1 ^a	0-160	27	27	100	12,6±7,3 ^{ab}	3-27
Bariri	29	29	100	70,2±63,9 ^b	12-280	29	28	95,5	18,2±10,3 ^a	0-38
Promissão	18	17	94,4	24,9±48,3 ^a	0-208	18	18	100	10,4±6,1 ^b	4-25
H				30,99					8,67	
p				0,001					0,013	
TOTAL	235	224	95,3	34,15±47,8	0-280	235	234	99,6	63,29±31,6	0-137

N = número de peixes coletados; NP = peixes parasitados; P = prevalência (%); AM = abundância média; DP = desvio padrão; H = Kruskal-Wallis; Letras sobrescritas denotam diferenças significativas entre localidades em cada estação; Sítio de infecção: [#]humor aquoso; ^{*}arcos branquiais

3.2.2 *Geophagus proximus*

Foram analisados 110 exemplares da espécie *G. proximus* coletados durante dois períodos denominados: pré-chuvoso (Nov/2012) e seco (Jul-Aug/2014).

Foram encontradas parasitando *G. proximus* três espécies de parasitos (Tabela 3), na bacia do Rio Tietê, a saber: metacercárias de *Austrodiplostomum compactum* (Figura 4), *Sciadicleithrum kritskyi* (Figura 9); e *Sciadicleithrum paranaensis* (Figura 10).

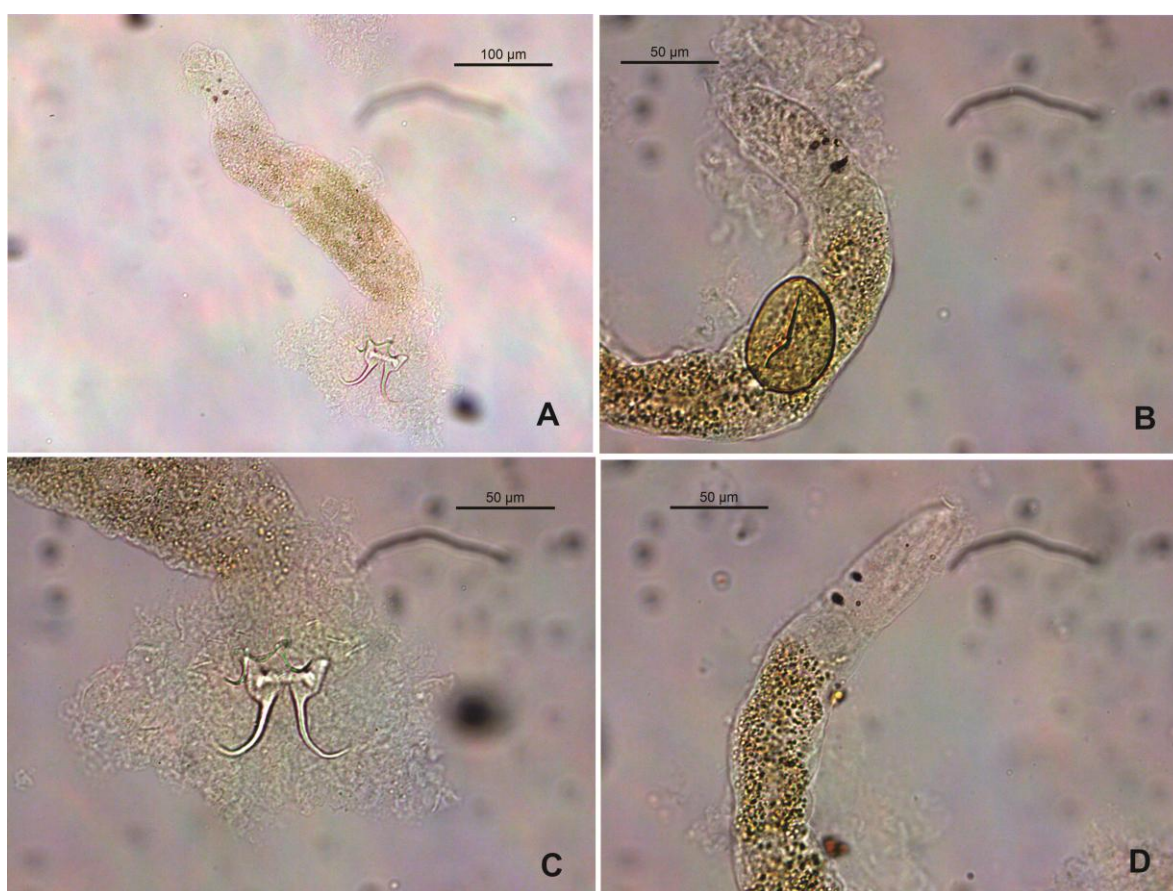


Figura 9. Morfologia de *Sciadicleithrum kritskyi* Bellay, Takemoto, Yamada & Pavanelli, 2009.

A. Adulto em vista ventral; **B.** Vista anterior com a presença de ovo. **C.** Haptor com detalhes das barras e ganchos; **D.** Vista anterior com faringe. Escala em micrômetros (µm).

Tabela 3. Dados parasitológicos do porquinho *Geophagus proximus* (N = 110) coletadas nos reservatórios de Bariri, Ibitinga e Promissão, durante os meses de Novembro de 2012 (Chuvosa) e Julho-Agosto de 2013 (Seca).

Local/Estação	<i>Austrodiplostomum compactum</i> [#]			<i>Sciadiclethrum kritskyi</i> [*]			<i>Sciadiclethrum paranaenses</i> [*]		
	P%	AM±DP	Min-Máx	P%	AM±DP	Min-Máx	P%	AM±DP	Min-Máx
Nov/12									
Bariri	60	5,4±6,6 ^a	0-24	17	0,2±0,41 ^a	0-1	-	-	-
Ibitinga	100	4,1±2,7 ^b	1-8	100	7,2±2,4 ^a	4-11	83	2,1±1,4 ^a	0-4
Promissão	40	1,8±2,6 ^b	0-7	100	39,7±15,8 ^b	20-60	100	8,3±3,5 ^b	3-12
H		3,74			15,49			14,20	
<i>p</i>		0,04			<0,001			<0,001	
Jul-Ago/13									
Bariri	100	15,4±11,3 ^a	3-28	-	-	-	-	-	-
Ibitinga	100	8,2±5,2 ^a	4-17	41	2,3±0,4 ^a	0-2	-	-	-
Promissão	29	1,1±2,6 ^b	0-7	51	6,2±1,8 ^a	0-6	29	4,2±2,8	0-4
H		9,32			8,3				
<i>p</i>		0,009			0,08				

P = prevalência (%); AM = abundância média; DP = desvio padrão; H = Kruskal-Wallis; Letras sobrescritas denotam diferenças significativas entre localidades em cada estação (Método de Dunn); Sítio de infecção: [#]humor aquoso; ^{*}arcos branquiais

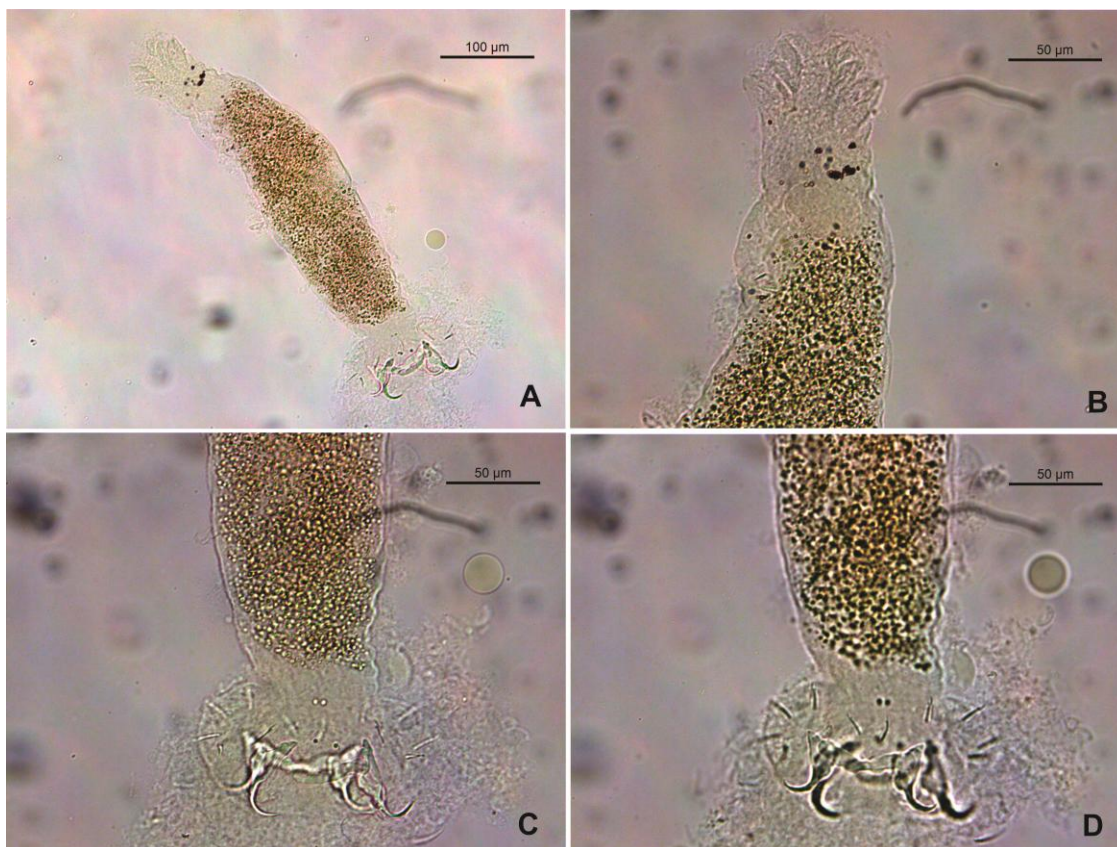


Figura 10. Morfologia de *Sciadicleithrum paranaensis* Bellay, Takemoto, Yamada & Pavanelli, 2009. **A.** Adulto em vista ventral; **B.** Vista anterior com faringe. **C.** Haptor com detalhes das ganchos; **D.** Haptor com detalhes das barras. Escala em micrômetros (μm).

Em relação as espécies de monogenoideas foram encontradas duas espécies parasitando *G. proximus*, a saber: *Sciadicleithrum kritskyi* e *S. paranaensis*. No presente estudo foi encontrado uma variação nas abundâncias dessas duas espécies entre as represas (Bariri, Ibitinga e Promissão) e entre os dois períodos do ano (chuvosa e seca), com as maiores prevalências associadas a represa de Promissão ($H = 15,49$; $p < 0,001$) (ver Tabela 3). Este padrão de variação das infracomunidades de monogenoideas em *G. proximus* foi inverso ao padrão encontrado para *P. squamosissimus*, em que as maiores prevalências e intensidades estavam associadas as represas mais poluídas (Barra Bonita

e Bariri; ver Tabela 2). Embora tenha ocorrido essa variação entre *G. proximus* e *P. squamosissimus* entre as represas, o efeito dos períodos de seca e chuvoso sobre as infracomunidades de monogenoideas das duas espécies foram similares, ou seja, apresentaram uma diminuição nas abundâncias durante o inverno (Julho-Agosto) ($H = 14,2$; $p < 0,001$), com uma drástica decréscimo na represa de Promissão (Tabela 3).

3.4. Análises da EROD e sua relação com o status reprodutivo, sexo e parasitismo

3.4.1 *Plagioscion squamosissimus*

Os níveis de atividade da EROD entre estações mostrou uma diferença significativa, especialmente em Barra Bonita para ambos os sexos (Capítulo 2; Figura 2). Os maiores valores de atividade EROD para os machos foram encontrados no início da estação chuvosa (Barra Bonita e Bariri) e seca (Barra Bonita). As fêmeas apresentaram os maiores níveis de atividade da EROD em Barra Bonita durante a estação seca (Capítulo 2; Figura 2). Observou-se também um efeito significativo da sazonalidade na atividade hepática da EROD nos machos (Kruskal-Wallis, $H = 34,68$; $df = 8$, $p < 0,001$) e fêmeas (Kruskal-Wallis, $H = 26,64$; $df = 8$, $p < 0,001$).

Além disso, a análise de covariância (ANCOVA) indicou que o sexo ($F_{1, 178} = 4,44$, $p = 0,036$) e tamanho ($F_{1, 179} = 4,16$, $p = 0,042$) (Tabela 5) tiveram um efeito positivo significativo sobre a variabilidade sazonal dos níveis da EROD na localidade mais poluída (Barra Bonita). Em relação às variáveis preditoras no modelo (localidade, estação e combinada), podemos observar que há um efeito dessas variáveis sobre a atividade da EROD, enquanto se remove os efeitos das covariáveis (sexo e tamanho). De um modo geral, foi observada uma correlação negativa entre a atividade da EROD e tamanho das fêmeas (Correlação de Spearman, $r = - 0,315$, $n = 76$, $p = 0,009$), com um aumento dos

níveis de atividade EROD nas fêmeas menores nas represas com maiores índices de poluição (Barra Bonita e Bariri).

Com respeito ao efeito do parasitismo sobre atividade da EROD não foi observado uma influência da abundância de *D. piscinarius* (ANCOVA, $F_{1,202} = 0,01$, $p = 0,91$) e *Austrodiplostomum compactum* (ANCOVA, $F_{1, 202} = 0,01$, $p = 0,91$) no modelo como covariáveis (Tabela 5). No entanto, houve uma influência de *D. piscinarius* sobre a atividade da EROD em Promissão ($r = 0,270$; $n = 67$; $p = 0,028$) e Barra Bonita ($r = -0,368$; $n = 83$; $p = 0,001$). A análise de regressão também apontou para o potencial influência de *D. piscinarius* sobre as respostas da EROD em *P. squamosissimus* ($R^2 = 56.1$; $n = 211$; $p = 0.009$), ou seja, em ambientes onde as abundâncias são elevada há uma tendência de decréscimo na atividade da EROD (Figura 11). Embora a maioria dos peixes apresentassem elevadas prevalências entre as estações e localidades, as abundâncias de *Austrodiplostomum compactum* não foram suficientes para exercer um efeito detrimental sobre a atividade da EROD.

Tabela 5. Resultados da Análise de covariância (ANCOVA) usando sexo, tamanho e parasitismo como covariáveis sobre a atividade da EROD em *P. squamosissimus* entre localidades e estações. Os valores significativos (*) indicam que as diferenças encontradas entre localidades e estações variam em função das covariáveis usadas neste modelo.

Modelo/Fator	N	F	p
<i>A. compactum</i>	213	0,013	0,909
<i>D. piscinarius</i>	213	0,557	0,813
Tamanho	213	4,44	0,036*
Sexo	213	4,16	0,042*
Tamanho*Sexo	213	4,43	0,036*
Localidade	213	15,03	0,001*
Estação	213	6,35	0,002*
Localidade*Estação	213	10,57	0,001*

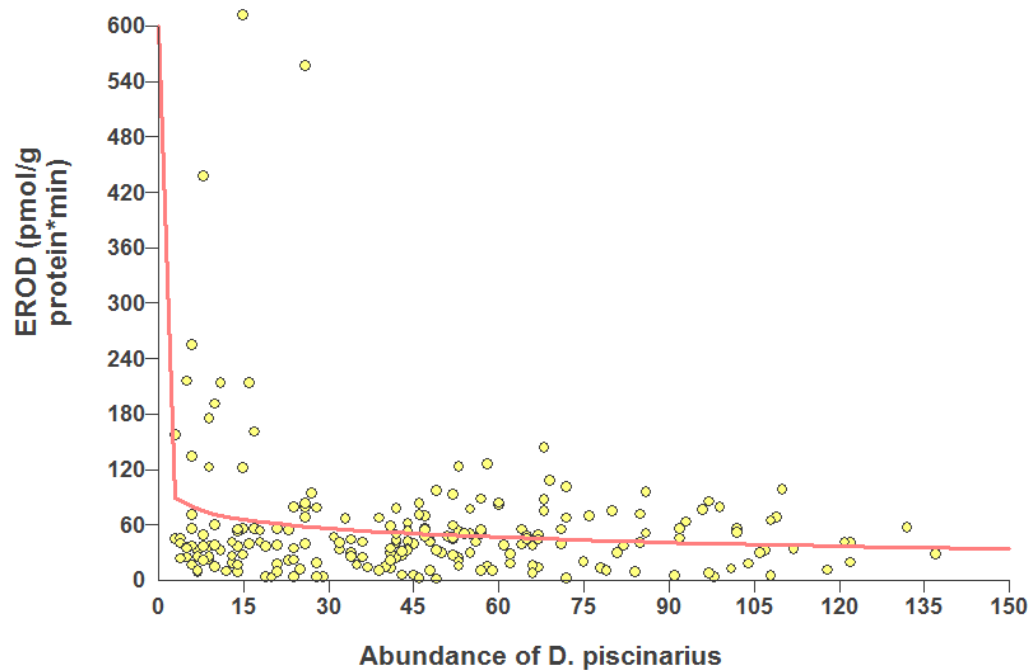


Figura 11. Resultados da regressão entre a atividade da EROD e a abundância de *Diplectanum piscinarius* em *Plagioscion squamosissimus* no Rio Tietê ($R^2 = 56.1$; $n = 211$; $p = 0.009$; com ajuste para regressão logarítmica: $Y = 104.4 - 14.1 \times \ln(x)$).

4. DISCUSSÃO

4.1 Parasitismo e sua relação com as condições das represas

As espécies de parasitos encontradas no Rio Tietê já foram anteriormente reportadas para a corvina *P. squamosissimus* em outras bacias como Rio Grande (Martins *et al.*, 2000), Rio Paraná (Tavernari *et al.*, 2005; Lacerda *et al.*, 2012), Rio Tietê (Paes *et al.*, 2009) e Rio Paranapanema (Ramos *et al.*, 2013). A prevalência elevada de *D. piscinarius* também foi observada por Tavernari *et al.* (2005), no Rio Paraná (97%), enquanto que Martins *et al.* (2000), encontrou uma prevalência mais baixa (52 %) para *P. squamosissimus* no Reservatório de Volta Grande, Rio Grande, MG. Com relação à prevalência de metacercárias de *A. compactum*, Lacerda *et al.* (2012), também encontrou valores altos no Rio Paraná, tanto para prevalência (88,9%), quanto para intensidade média (87,5), corroborando os resultados encontrados no presente estudo (Tabela 2).

Uma potencial explicação para as altas abundâncias de *D. piscinarius* na represa de Barra Bonita é que os contaminantes neste local poderiam estar atuando como imunossupressores em *P. squamosissimus* e com isso, aumentando os níveis de parasitismo durante os meses de novembro 2012 e março de 2013 (CESTESB, 2013).

Em relação a espécie *Geophagus proximus*, ambas as espécies de monogenoideas (*Sciadiclethrum kritskyi* e *S. paranaenses*) foram descritas recentemente neste mesmo hospedeiro na bacia do Rio Paraná (Bellay *et al.* 2009). Embora o número de peixes neste estudo tenha sido baixo (N = 9), Bellay *et al.* (2009), encontraram altas prevalências de *S. kritskyi* (Prevalência = 100%) em comparação com *S. paranaenses* (Prevalência = 44,4%). Segundo Zago *et al.* (2013), que estudou essa mesma espécie de ciclídeo na bacia do rio São José dos Dourados, encontraram uma riqueza muito maior a que foi observada no presente estudo, embora tenha avaliado somente os endoparasitos.

O parasitismo por metacercária de *Austrodiplostomum compactum* em *Geophagus proximus* conhecido como “porquinho” ou “acará tinga” foi relatado em outros estudos na bacia do Rio Tietê (Zica *et al.*, 2010) e no Rio São José dos Dourados, um tributário do Rio Paraná (Zago *et al.*, 2013). Ambos trabalhos tem registrado altas prevalências no Rio Tietê (Prevalência = 97%) e no Rio São José dos Dourados (Prevalência = 58,6%), o que corrobora com os encontrados no presente estudo.

Embora estes estudos tenham relatados altas prevalências, nenhum deles avaliou a variação das infracomunidades de metacercária de *A. compactum* em relação ao efeito da poluição e variação sazonal. Foi encontrado uma clara variação das infracomunidades de *A. compactum* em relação as represas e períodos do ano, indicando uma maior prevalência e intensidade nas represas com índices de poluição mais elevados. Uma potencial explicação para estas altas intensidades de infecções nas área mais poluídas, é a presença de altas densidades dos hospedeiros intermediários (p. ex. moluscos) (Voutilainen *et al.*, 2009) que são favorecidos pelo incremento da matéria orgânica pela ação antropogênica nesses dois reservatórios (Bariri e Ibitinga).

De acordo com Hoole *et al.* (1997; 2003), os contaminantes podem exercer um efeito letal aos estágios larvais de certos parasitos que tem seus ciclos expostos a água como (p. ex. cercárias), resultando em um efeito na interação hospedeiro/parasite. Além disso, as altas cargas de matéria orgânica encontradas nas represas mais poluídas e eutrofizadas podem favorecer as abundâncias de caramujos (hospedeiros intermediários para digenéticos), aumentando com isso a disponibilidade de estágios infectantes (cercárias) para os peixes (Valtonen *et al.*, 1997).

Embora esses trabalhos tenham registrados uma variação na prevalência e abundância desses parasitos em *P. squamosissimus* e *G. proximus*, nenhum deles levou em consideração a influência da poluição (gradiente de poluição), bem como da variação

espaço-temporal (e.g. estações seca e chuvosa) ou os dois fatores combinados (gradiente de poluição + sazonalidade) sobre a estrutura das comunidades de parasitos. Neste sentido, o presente estudo sugere um potencial efeito da poluição combinada com as variações temporais e espaciais (entre os períodos de seca e chuva) sobre a estrutura das infracomunidades e comunidades componentes de parasitos da corvina e porquinho ao longo de um trecho de 400 km nos rios e represas da bacia do Rio Tietê.

Vários estudos têm demonstrado que a poluição por contaminantes como metais pesados PCBs e PAHs pode causar redução na abundância e na diversidade de parasitos heteroxênicos, embora parasitos com ciclo de vida diretos (p. ex. monogenoideas) sejam menos afetados (Diamant *et al.*, 1999; Sures, 2004; Vidal-Martínez *et al.*, 2010). Esses últimos acabam tendo mais contato com o ambiente, podendo adaptar-se mais facilmente as mudanças do meio (Valtonen *et al.*, 1997; MacKenzie, 1999; Perez-del Olmo *et al.*, 2007).

Além disso, os contaminantes podem atuar como imunossupressores, favorecendo o incremento de novas infecções nos peixes expostos as condições de poluição, como demonstrado em *P. squamosissimus*. No entanto, para *G. proximus* foi encontrado um padrão inverso, com altas intensidades de monogenoideas nos peixes no sítio referência (Promissão). Neste caso, a poluição poderia estar afetando as novas infestações das infrapopulações dessas duas espécies de monogenoideas. Sendo assim, as alterações da abundância e intensidade dos parasitos aquáticos, levando a mudanças na estrutura e composição da comunidade de parasitos como resposta a diferentes formas de poluição podem ser usadas como bioindicadores de impactos ambientais (MacKenzie *et al.*, 1995; Vidal-Martínez *et al.*, 2010).

No entanto, é importante ressaltar, que antes de propor o uso de parasitos de peixes como eficientes bioindicadores de impactos ambientais é necessário um mais estudos com

séries temporais de dados de mais de um ano para estabelecer uma relação causal clara entre a variação das comunidades de parasitos e a presença de contaminantes (Pech *et al.*, 2009; Vidal-Martínez *et al.*, 2010). Ou seja, é importante distinguir o efeito das flutuações naturais do ambiente em comparação com as atribuídas à poluição. Embora no presente estudo nós tenhamos encontrado uma variação significativa das comunidades de parasitos entre os gradientes de poluição (represas), não podemos ainda estabelecer uma relação causal atribuída somente à poluição, mas um efeito combinado entre essa variável (estresse químico) e as variações abióticas (temperatura) e sazonais (estações chuvosa e seca).

De acordo com Vidal-Martínez (2010), os estudos com bioindicadores devem levar em conta a variação ambiental (sazonalidade, poluição, biomarcadores, etc.), para estabelecer uma tríade de fatores, bem como o uso de experimentos (bioensaios) para testar de forma controlado as variáveis em questão. Embora os experimentos sejam muito úteis para testar hipóteses como as levantadas aqui neste estudo, eles não refletem as condições reais que ocorrem no campo, onde as variáveis do hospedeiro (status reprodutivos, sexo, tamanho), sazonalidade (períodos chuvosos e secos) e poluição (p. ex. gradiente de poluição), geralmente se combinam para exercer um efeito aditivo, sinérgico ou antagônico sobre a saúde dos peixes e também sobre a estrutura e composição das comunidades de parasitos.

4.2 Parasitos de peixes como moduladores das respostas dos biomarcadores

O papel dos parasitos como moduladores das respostas dos biomarcadores de poluição tem sido investigados no campo e laboratório em vários organismos aquáticos, como molusco (Baudrimont *et al.*, 2006), crustáceos (Gismondi *et al.*, 2012), e principalmente peixes (Sures *et al.*, 2004; 2008). Embora o presente trabalho tenha

encontrado uma potencial modulação do monogenoidea *D. piscinarius* sobre as respostas deste biomarcadores em ambientes poluídos (e.g. Barra Bonita e Bariri), ainda é cedo concluir para este efeito, haja vista que em condições de campo temos grande variabilidade, tornando difícil estabelecer uma única causa.

Embora tenha ocorrido uma ausência de efeito de infecção de *A. compactum* sobre a atividade da EROD em *P. squamosissimus*, alguns estudos com outras espécies de peixes já têm demonstrado que certos parasitos como *Apharyngostrigea* sp. (Metacercárias) (Pech *et al.*, 2009), *Trichodina* spp. (Ciliados) (Broeg *et al.*, 1999), *Lepeophtheirus pectoralis* (Copépoda) e *Zoogonoides viviparus* (Digenético) (Schmidt *et al.*, 2003), podem afetar a resposta da EROD. Neste sentido, no que diz respeito à espécie *A. compactum*, sugerimos que deve haver um limite no número de parasitos a partir do qual um efeito significativo nos níveis da atividade da EROD deve tornar-se evidente.

Essa modulação exercida pelos parasitos sobre as respostas dos biomarcadores, pode também interferir com o mecanismo natural de proteção dos organismos (e.g. processo de biotransformação), o que aumenta os efeitos da exposição aos contaminantes (Sures, 2008). Em alguns casos, os efeitos dos parasitos não é detectável em ambientes controle (e.g. sítios de referências), mas tornar-se patogênico em águas poluídas (Marcogliese *et al.*, 2010; Marcogliese & Pietrock, 2011).

De acordo com De-Oliveira *et al.* (2010), o mecanismo pelo qual as infecções e estímulos inflamatórios modulam as CYPs (CYP1A ou atividade da EROD), ainda permanecem desconhecidos e pobremente estudados. Neste sentido, há necessidade de mais estudos que investigue o papel das infecções nos organismos alvos de biomonitoramento, para evitar resultados equivocados e subestimados.

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que as variações nas abundâncias dos parasitos de peixes na bacia do rio Tietê são dirigidas por um conjunto de variáveis naturais e relacionada a poluição de cada represa, tornando difícil estabelecer uma única causa para as mudanças nos parâmetros parasitológicos. Esses resultados refletem a necessidades de estudos de longa duração para efetivamente compreender a dinâmica dos parasitos num contexto natural e perturbado.

Além disso, os resultados também sugerem que os parasitos podem modular a atividade da EROD num contexto de campo, embora haja a necessidade de testar em laboratório essa modulação em peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boeger, W.A. & Vianna, R. T. (2006). Monogenoidea; p. 42-116. In V.E. Thatcher (ed.). **Amazon Fish Parasites**. Sofia: Pensoft Publishers.
- Broeg K, Zander S, Diamant A, Körting W, Krüner G, Paperna I, von Westernhagen H. The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. I. North Sea. **Helgoland Marine Research**. 1999;53:171–194.
- Diamant, A.; Banet, I.; Paperna, H. V.; Westernhagen, K.; Broeg, G.; Kruener, W.; Koerting, W. & Zander, S. (1999). The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. II. The Red Sea and Mediterranean. **Helgoland Marine Research**, 53, 195–208.
- Engqvist, L., 2005. The mistreatment of covariate interaction terms in linear model analyses of behavioural and evolutionary ecology studies. **Animal Behaviors**, 70, 967-971.
- Hoole, D. (1997). The effects of pollutants on the immune response of fish: implications for helminth parasites. **Parassitologia**, 39, 219–225.
- Koenig, S., Solé, M. 2012. Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. **Marine Environmental Research** 79, 122-131.
- Kritsky D.C., Thatcher V.E. (1984). Neotropical monogenea. 6. Five new species of *Diplectanum* (Diplectanidae) from freshwater teleosts, *Plagioscion* spp. (Sciaenidae), in Brazil. **Proceedings of Biological Society of Washington**, 97 (2): 432-441.
- Lacerda AC, Takemoto RM, Tavares-Dias, M, Poulin, R, and Pavanelli, G.C. (2012). Comparative parasitism of the fish *Plagioscion squamosissimus* in native and invaded river basins. **Journal of Parasitology**, 98 (4): 713-7.

- Martins, M.L.; Fujimoto, R.Y.; Moraes, F.R. (2000). Prevalence and seasonality of *Diplectanum piscinarius* Kritsky and Thatcher, 1984 (Monogenoidea) in the gills of *Plagioscion squamosissimus* Heckel, 1840 (Sciaenidae) from Volta Grande Reservoir, MG, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 2, 105-107.
- Paes, J.V.K., Carvalho, E.D. & Silva, R.J. (2009). Infection levels of *Austrodiplostomum compactum* (Digenea, Diplostomidae) metacercariae in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Sciaenidae) from the Nova Avanhandava reservoir, São Paulo State, Brazil. **Journal of Helminthology**, 84, 284–291.
- Pech, D. Vidal-Martínez, V.M.; Aguirre-Macedo, M.L.; Gold-Bouchot, G.; Herrera-Silveira, J.; Zapata-Pérez, O. & Marcogliese, D.J. (2009). The checkered puffer (*Spheroides testudineus*) and its helminthes as bioindicators of chemical pollution in Yucatan coastal lagoons. **Science of total Environmental**, 407, 2315 - 2324.
- Ramos I.P, Franceschini L, Zica EOP, Carvalho ED, and Silva, RJ (2013). The influence of cage farming on infection of the corvine fish *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes: Sciaenidae) with metacercariae of *Austrodiplostomum compactum* (Digenea: Diplostomidae) from the Chavantes reservoir, São Paulo State, Brazil. **Journal of Helminthology**, doi:10.1017/S0022149X13000229
- Schmidt, V. *et al.* 2003. Parasites of the flounder *Platichthys flesus* (L.) from the German Bight, North Sea, and their potential use in ecosystem monitoring. A. Infection characteristics of potential indicator species. **Helgoland Marine Research**, 57: 236–251.
- Statsoft Inc, 1997. **Statistica for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft. Available from: <<http://www.statsoft.com>>.

- Tavernari, FC., Bellay, S., Takemoto, RM., Guidelli, GM., Lizama, MAP. and Pavanelli, GC., 2005. Ecological aspects of *Diplectanum piscinarius* (Platyhelminthes, Monogenea) parasite of gills of *Plagioscion squamosissimus* (Osteichthyes, Sciaenidae) in the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Acta Scientiarum**, vol. 27, no. 3, p. 225-229.
- Valtonen, E.T.; Holmes, J.C. & Koskivaara, M. (1997). Eutrophication, pollution and fragmentation: effects on parasite communities in roach (*Rutilus rutilus*) and perch (*Perca fluviatilis*) in four lakes in Central Finland. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences**, 54, 572–585.
- Voutilainen A, Van Ooik T, Puurtinen M, Kortet R, Taskinen J. Relationship between prevalence of trematode parasite *Diplostomum* sp. and population density of its snail host *Lymnaea stagnalis* in lakes and ponds in Finland. **Aquat Ecol** 2009; 43(2) 351-357.
- Whyte J.J.; Jung, R.E.; Schmitt, C.J. & Tillitt, D.E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, 30(4), 347-570.
- Zar, J.H. (1999). **Biostatistical analysis**. 4^aed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc., 663p. + 212App.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Uso de parasitos de peixes e biomarcadores como indicadores de impactos ambientais

O uso dos parasitos de peixes como bioindicadores de impactos ambientais tem crescido nos últimos anos, demonstrando um grande potencial para estudos de biomonitoramento ambiental.

Os resultados obtidos neste estudo nos indicam um possível efeito das condições das represas sobre as comunidades de parasitos, principalmente em relação às abundâncias de *D. piscinarius* em *Plagioscion squamosissimus* nas represas de Barra Bonita e Bariri (sítios mais poluídos segundo dados da CETESB, 2012 & 2013) durante as estações pré-chuvosa e chuvosa. Em relação a espécie *Geophagus proximus*, podemos observar que houve uma variação nas três espécies de parasitos, com destaque para as espécies *Sciadicleithrum kritskyi* e *S. paranaensis* que apresentaram as maiores prevalências e intensidades na represa de Promissão. Embora tenha se observado uma possível influência da poluição sobre a variação das abundâncias de *D. piscinarius*, *S. kritskyi* e *S. paranaensis* vimos também que a sazonalidade exerce um efeito significativo sobre essas comunidades parasitárias. Portanto, o uso de parasitos como bioindicadores de impactos ambientais devem considerar também o papel que as componentes espaciais e sazonais têm sobre as comunidades de parasitos, para evitar interpretações errôneas e equivocadas. Vale ressaltar que, para o uso efetivo dos parasitos como ferramentas de monitoramento são necessários mais estudos de longa duração, bem como a realização de experimentos que possam controlar melhor as variáveis testadas.

Outro aspecto importante é que a elevada indução da atividade da EROD nos sítios mais poluídos indica que os contaminantes da classe dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), se encontram biodisponíveis para as comunidades de peixes locais (biota).

Além disso, nós observamos uma regulação do status reprodutivos nas fêmeas sobre a atividade da EROD em Barra Bonita e Bariri durante novembro de 2012 e março de 2013. Uma possível explicação para a associação entre a atividade da EROD e o sexo é que o estado reprodutivo das fêmeas influenciou os níveis da EROD. Alguns trabalhos têm sugerido que a supressão dos níveis de EROD nas fêmeas maduras é devido ao hormônio 17 β -estradiol (Whyte *et al.*, 2000; van der Oost *et al.* 2003), que exerce uma modulação dessa enzima (EROD) durante o início da ovulação até a desova. Nossos resultados revelaram que, o estado reprodutivo das fêmeas é um fator importante em relação aos machos que deve ser considerado em estudos com a EROD.

2. Parasitos como moduladores da atividade da EROD em peixes

Nos últimos anos, vários estudos tem alertado para o efeito dos parasitos como moduladores das respostas dos biomarcadores de poluição. Com respeito à modulação de *D. piscinarius* sobre a atividade da EROD em *P. squamosissimus* em Promissão (correlação positiva) e Barra Bonita (correlação negativa), podemos concluir que os parasitos podem influenciar significativamente as respostas deste biomarcador. No caso de Promissão, o incremento da abundância de *D. piscinarius* causa aumento da atividade da EROD, enquanto que em Barra Bonita (sítios mais poluídos), ocorreu o inverso. Em Barra Bonita, os parasitos exercem um declínio sobre a resposta da EROD, o que poderia gerar resultados falsos positivos ou negativos. Embora a atividade da EROD seja

específica aos contaminantes da classe PAHs e PCBs, vimos neste estudo que os parasitos podem interferir com essas respostas, sugerindo que os estudos de biomarcadores com EROD, devem levar em consideração o fator parasitismo. No que diz respeito a ausência de modulação de *A. compactum* sobre a atividade da EROD, sugerimos que deve haver um limite no número destas metacercárias, ou seja, altas abundâncias, a partir do qual um efeito significativo nos níveis da atividade da EROD deve tornar-se evidente.

De um modo geral, este estudo sugerem:

- Altas intensidades de parasitos e alterações hormonais em peixes podem modular esse biomarcador em áreas poluídas;
- Parasitos podem interferir com os mecanismos de proteção do hospedeiro (processo de biotransformação), levando a um aumento do efeito da exposição a contaminantes;
- A variação sobre a atividade EROD é devido ao efeito combinado em áreas mais poluídas = parasitos + hormônios reprodutivos + sazonalidade + biodisponibilidade de química indutores;
- Finalmente, alterações hormonais e parasitos devem ser levados em conta na interpretação dos efeitos da poluição e outros estressores ambientais no campo de estudos com biomarcadores e bioindicadores.