

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ÁGUA CONTAMINADA POR CHUMBO
DURANTE A FERTILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO
INTERFERE NA QUALIDADE DE GAMETAS E
LARVAS DE LAMBARI-DO-RABO AMARELO
(*Astyanax lacustris*)?**

Julia Pohl Altafin

Jaboticabal – São Paulo

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ÁGUA CONTAMINADA POR CHUMBO
DURANTE A FERTILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO
INTERFERE NA QUALIDADE DE GAMETAS E
LARVAS DE LAMBARI-DO-RABO AMARELO
(*Astyanax lacustris*)?**

Julia Pohl Altafin

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Letícia Madeira Sanches**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal – São Paulo

2024

A465a

Altafin, Julia Pohl

Água contaminada por chumbo durante a fertilização e incubação interfere na qualidade de gametas e larvas de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*)? / Julia Pohl Altafin. -- Jaboticabal, 2024

41 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal

Orientador: Eduardo Antônio Sanches

Coorientadora: Ana Letícia Madeira Sanches

1. Ecotoxicology. 2. Heavy metals. 3. *Astyanax*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Água contaminada por chumbo durante a fertilização e incubação interfere na qualidade de gametas e larvas de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*)?

AUTORA: JULIA POHL ALTAFIN

ORIENTADOR: EDUARDO ANTÔNIO SANCHES


COORIENTADOR: ANA LETÍCIA MADEIRA SANCHES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, pela Comissão Examinadora:



Assinado de forma digital por
EDUARDO ANTONIO
SANCHES:05482916910
Dados: 2024.02.29 19:08:41 -03'00'

Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO SANCHES (Participação Presencial)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / FCAVR/Unesp, Registro-SP

Documento assinado digitalmente
 **DIOGENES HENRIQUE DE SIQUEIRA SILVA**
Data: 28/02/2024 10:42:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. DIÓGENES HENRIQUE SIQUEIRA SILVA (Participação Virtual)
Faculdade de Biologia / Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - UNIFESSPA

Sergio Ricardo Batlouni:14422020846
Assinado de forma digital por Sergio
Ricardo Batlouni:14422020846
Dados: 2024.02.29 14:20:08 -03'00'

Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI (Participação Virtual)
Laboratório de Reprodução de Peixes / Centro de Aquicultura da Unesp Caunesp, Jaboticabal-SP

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2024.

DEDICATÓRIA

*À minha querida avó **Thereza Panaia**
Altafin, por todo apoio, incentivo e
ensinamentos. Todo meu amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches por toda orientação, dedicação, apoio, correções e confiança. Agradeço ainda pela participação em outros projetos e experiências vividas.

Ao Prof. Dr. Felipe Alexandre Lisboa de Miranda Daros por toda compreensão, paciência, apoio e incentivo ao longo desse período. Sou grata pela amizade construída e por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Eduardo A. Sanches – UNESP pela ajuda na realização desse trabalho, em especial ao Paulo Sérgio Alves Lima Filho por toda parceria, dedicação, companheirismo, empenho e cuidado.

Aos meus amigos da república Rancho Pescador, pelo acolhimento, risadas e apoio, obrigada pelas felicidades compartilhadas e por se tornarem minha segunda família.

Aos amigos Ana Regina Seabra de Souza, Felipe Bordignon Beranek, Janaína Sayuri Imafuko Valandro e Vinicius Mecca Zabotto pelos momentos compartilhados, por toda ajuda e por se tornarem minha base durante os anos de graduação e mestrado.

A Universidade Estadual Paulista pela disponibilidade dos materiais e do laboratório de Aquicultura para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) pelos ensinamentos transmitidos durante esses 2 anos de pós-Graduação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Astyanax lacustris</i> . Foto: Eduardo A. Sanches	14
Figura 2. Representação do ensaio 1. Pipetas e aquários coloridos representam as diferentes concentrações de chumbo na água.....	19
Figura 3. Larva normal (a); larva com deformidade morfológica (b) e larvas que apresentaram dificuldade para romper o córium (c).....	20
Figura 4. Representação do ensaio 2. Pipetas coloridas representam as diferentes concentrações de chumbo na água.	21
Figura 5. Percentual de fertilização (a) e larvas normais (b) de <i>A. lacustris</i> em diferentes concentrações de chumbo.....	23
Figura 6. Curvas de motilidade espermática obtidas entre 10 e 50 segundos pós ativação em diferentes concentrações de chumbo utilizada na solução ativadora dos espermatozoides de <i>Astyanax lacustris</i>	24
Figura 7. Velocidade curvilínea obtida em 10 segundos (a) e 50 segundos (b) pós ativação em diferentes concentrações de chumbo utilizada na solução ativadora dos espermatozoides de <i>Astyanax lacustris</i>	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros reprodutivos das fêmeas de <i>A. lacustris</i>	18
Tabela 2. Qualidade de água (média \pm desvio padrão) ao longo do período experimental.....	22
Tabela 3. Parâmetros espermáticos (média \pm desvio padrão) em 10 segundos pós ativação de machos de <i>Astyanax lacustris</i> utilizando diferentes concentrações de chumbo.....	25
Tabela 4. Parâmetros espermáticos (média \pm desvio padrão) em 50 segundos pós ativação de machos de <i>Astyanax lacustris</i> utilizando diferentes concentrações.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO GERAL.....	15
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1.1. Acomodação e seleção dos reprodutores.....	16
3.1.2. Indução hormonal.....	16
3.1.3. Extrusão.....	17
3.1.4. Exposição e concentração de Pb na água.....	17
3.2. Delineamento experimental.....	18
3.2.1. Ensaio 1: Efeito do chumbo nos zigotos.....	18
3.2.2. Ensaio 2: Efeito do chumbo na cinética espermática.....	19
3.3. Análise Estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Parâmetros físico-químicos.....	22
4.2. Fêmeas.....	23
4.3. Machos.....	24
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

RESUMO

Sabe-se que a poluição no meio aquático pode afetar o potencial reprodutivo de diversas espécies. Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos causados pela água enriquecida com nitrato de chumbo utilizada na ativação espermática, fertilização artificial e incubação de embriões de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*). Foram realizados dois ensaios, ambos em delineamentos experimentais inteiramente casualizados, testando cinco concentrações de chumbo (T1: 0,00; T2: 0,15; T3: 0,30; T4: 0,45; T5: 0,60 mg Pb L⁻¹), com cinco e oito repetições, para o primeiro e segundo ensaio, respectivamente. No primeiro ensaio, a água enriquecida foi utilizada na fertilização e na incubação artificial dos embriões, e no segundo ensaio, as diferentes concentrações foram utilizadas para ativação espermática. Para os parâmetros avaliados das fêmeas foi observado diferença ($p < 0,05$) nas taxas de fertilização e percentual de larvas normais, a partir do qual se verificou diminuição dos parâmetros conforme o aumento da concentração de contaminante na água. No segundo ensaio, observou-se diminuição na motilidade espermática e velocidade curvilínea somente 10 segundos pós-ativação conforme o aumento da concentração de chumbo na água, não apresentando efeito para os outros tempos, sendo assim, verificamos que mesmo nas concentrações mais baixas o chumbo interfere na qualidade reprodutiva e causa deformidades larvais.

Palavras-chave: Cinética espermática, metal pesado, normalidade larval, toxicidade.

* Artigo escrito sob as normas da Revista *Environmental Pollution*

ABSTRACT

It is known that pollution in the aquatic environment can affect the reproductive potential of several species. Therefore, the aim was to evaluate the effects caused by water enriched with lead nitrate used in sperm activation, artificial fertilization process and in the embryos initial incubation of yellow-tailed lambari (*Astyanax lacustris*). Two trials were carried out, both in completely randomized experimental designs, testing five lead concentrations (T1: 0.00; T2: 0.15; T3: 0.30; T4: 0.45; T5: 0.60 mg Pb L⁻¹), with five and eight repetitions, for the first and second test, respectively. In the first test, enriched water was used in fertilization and artificial incubation of embryos, and in the second test, different concentrations were used for sperm activation. For the evaluated parameters of females, a difference ($p < 0.05$) was observed in fertilization rates and percentage of normal larvae, from which a decrease in parameters was observed as the concentration of contaminant in the water increased. In the second test, a decrease in sperm motility and curvilinear velocity was observed only 10 seconds post-activation as the lead concentration in the water increased, with no effect for other times, therefore, we verified that even at the lowest concentrations lead interferes with reproductive quality and causes larval deformities.

Keywords: Sperm kinetics, heavy metal, larval normality, toxicity.

1. INTRODUÇÃO

O uso e ocupação do solo vem se transformando ao longo do tempo, passando de uma ocupação particularmente agrícola ao surgimento das cidades. As atividades humanas, denominadas econômicas, alteram o meio ambiente e sua capacidade de resiliência, dificultando o seu potencial de absorção de impactos (Silva, 2017). Atualmente, a mineração e o agronegócio são as atividades econômicas básicas da economia mundial (Fernandes e Araújo, 2016), sendo a mineração uma das bases do PIB nacional e tratada pelo Estado brasileiro como uma atividade de interesse público, visto o retorno econômico que proporciona (Cândido, 2018).

No ano de 2021, o setor mineral apresentou aumento de 62% no faturamento em relação à 2020 (IBRAM, 2022), e no primeiro semestre de 2023, foi registrado um aumento de 6% no faturamento considerando o mesmo período de 2022, totalizando 120 bilhões de reais (IBRAM, 2023), evidenciando a importância dessa atividade para a economia brasileira. Além disso, a mineração é a principal atividade econômica em muitos países em desenvolvimento (Jhariya e Choraia, 2010), produzindo grande quantidade de poluentes, causando diversos danos ambientais ao redor do mundo (Sumi *et al.*, 2001; Kitula, 2005; Jhariya e Thakur, 2016; Soares *et al.*, 2019), assim como aconteceu com a região do Vale do Ribeira.

A atividade mineradora teve seu início em São Paulo, no Vale do Ribeira (Germani, 2002), região que durante muitos anos foi conhecida nacionalmente como a maior produtora de chumbo no país, sendo responsável pela produção de todo o minério de chumbo gerado no Brasil na década de 1950 (Cunha, 2003). Ao longo de todo o seu desenvolvimento, percebe-se que pouco foi feito para conciliar a mineração com a conservação dos ecossistemas naturais. A mineração foi desenvolvida de forma intensa e incipiente em toda a região do Vale do Ribeira, sem restrições legais e nem delineamento adequado, gerando uma degradação excessiva em toda a bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape (UGRHI 11 – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos – São Paulo), visto que os lançamentos de resíduos de mineração eram despejados diretamente nos rios (Cassiano, 2017).

A extração de minerais metálicos influencia fortemente na degradação do meio ambiente, por produzir resíduos enriquecidos, como os metais potencialmente tóxicos e intensificar a liberação destes elementos no meio ambiente (Salomons, 1995). Algumas empresas brasileiras de mineração depositaram, por

aproximadamente 40 anos no Rio Ribeira de Iguape, resíduos do tratamento de minério (Guimarães, 2007), e segundo a CETESB (1986), aproximadamente 5,5 toneladas de elementos tóxicos como o chumbo, cobre, cromo, zinco e cádmio eram lançadas no ambiente todos os meses.

Os principais problemas causados pela mineração remetem a poluição da água, poluição do ar, sonora, e subsidência do terreno, afetando fauna, flora e comunidades locais direta e indiretamente (Farias, 2002). Os metais potencialmente tóxicos representam os elementos mais prejudiciais que podem ser incorporados e acumulados na biota (Morgano *et al.*, 2005), atribuindo-lhes muitas vezes, as propriedades de bioacumulação, biomagnificação na cadeia alimentar, persistência no ambiente e distúrbios metabólicos dos seres vivos (Parini, 2017), podendo causar alterações fisiológicas, estruturais e ultraestruturais, prejudicando diversas espécies (de Cristo, 2017).

Dentre os diversos mecanismos de ação ligados à nocividade desses poluentes, destaca-se a capacidade de desregulador do sistema endócrino (Zhang *et al.*, 2018), causando distúrbios hormonais e alterações em diversos processos fisiológicos que possuem mecanismos influenciados por hormônios (Schlumpf *et al.*, 2004; Hutchinson *et al.*, 2006; Shahjahan *et al.*, 2022). Alguns metais, como por exemplo o chumbo, são classificados como metaloestrógenos, pois interferem em hormônios estrogênicos, agindo como agonistas nas ligações dos receptores (Darbre, 2006). Outros metais possuem a capacidade de interagir diretamente no eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, liberando hormônios luteinizantes (Thomas e Khan, 1997). De modo geral, acabam interferindo desde o nível molecular até o nível sistêmico (Yan *et al.*, 2012; Dzieweczynski & Hebert, 2013; Javed e Usmani, 2019).

Diante disso, a poluição no meio aquático afeta também o desenvolvimento reprodutivo de diversas espécies (Kime, 1995). Nos peixes teleósteos com fertilização externa, assim que ocorre a desova, os gametas são lançados no ambiente para que aconteça a fertilização. Nesse momento, os gametas estão expostos a diversos tipos de contaminantes presentes na água, entre eles, alguns elementos tóxicos como o chumbo e outros metais pesados. Desse modo, é possível que ocorra a interação entre os poluentes da água com a micrópila dos oócitos, impedindo que o espermatozoide penetre no oócito (Kime e Nash, 1999). Outros problemas são observados para a morfologia e a motilidade espermática, os quais interferem

diretamente nos valores das taxas de fertilização (Kime *et al.*, 1996; Kime *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2008).

Visto que diversas minas despejaram rejeitos na bacia do Rio Ribeira de Iguape, em toda sua extensão, do início ao fim de suas atividades (Cassiano, 2017), e que mesmo após cessar as atividades mineradoras, o rejeito permanece no meio por décadas em um cenário de áreas degradadas (Salomons, 1995; Cunha, 2003), diversas espécies estão sujeitas à contaminação por esses elementos atualmente.

Dentre as espécies presentes na UGRH 11 que estão sujeitas à essa contaminação, está o lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) sinonímia de *A. altiparanae* (Figura 1) (Lucena e Soares *et al.*, 2016). O grupo dos lambaris apresenta um importante papel ecológico na cadeia alimentar dos ecossistemas de águas interiores, pois são predadores essenciais para as larvas de insetos e um dos principais constituintes da dieta de peixes carnívoros, de modo que a diminuição desse recurso pesqueiro, provoque a diminuição das populações de espécies carnívoras (Garutti, 2003).



Figura 1. Exemplar adulto de *Astyanax lacustris*. Foto: Eduardo A. Sanches

Astyanax lacustris pertence à família Characidae, é a maior na ordem Characiformes, totalizando 65% das espécies nesta ordem, com ampla distribuição na Bacia do Alto Rio Paraná (Langeani *et al.*, 2007). É uma espécie de pequeno porte, com grande plasticidade trófica e com amplas possibilidades de mercado, destacando o litoral paulista em relação às demais regiões, visto que a demanda por isca-viva para

a pesca esportiva local cresce cada vez mais, principalmente no ápice do verão em que o turismo da pesca aumenta, além de possuir mercado para o consumo humano (Silva *et al.*, 2011a; 2011b; Yasui *et al.*, 2020).

Diversos trabalhos relatam a influência dos metais pesados na reprodução de peixes (Kime, 1995; Sumpter, 1997; Yamaguchi *et al.*, 2007; Boyle *et al.*, 2008; Hilbig *et al.*, 2008; Celino *et al.*, 2009), fazendo menção às influências dos contaminantes sobre a qualidade dos gametas (Kime *et al.*, 1996; Lahnsteiner *et al.*, 2004), sobre a fertilização dos oócitos (Rurangwa *et al.*, 1998; Witeck, 2011), qualidade das larvas (Jeziarska *et al.*, 2000; Sarnowski, 2004) e nos diferentes estágios de desenvolvimento dos embriões (Johnson *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012; Witeska *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020).

Entretanto, poucos estudos utilizam o chumbo como contaminante (Jeziarska *et al.*, 2000; Lahnsteiner *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2007; Hilbig *et al.*, 2008) e, segundo Taslima *et al.*, (2022), ainda não há estudos sobre a influência do chumbo na reprodução de *A. lacustris* e devido à sua importância econômica para a região do Vale do Ribeira, se faz necessário conhecer os níveis de toxicidade no processo de reprodução da espécie, visando uma melhor fiscalização quanto aos níveis de contaminação toleráveis e suas consequências ao meio ambiente. O presente estudo avaliou os efeitos da toxicidade do chumbo na água para reprodução do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros reprodutivos do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) em água enriquecida por nitrato de chumbo em diferentes concentrações.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar efeito do chumbo na qualidade espermática de *A. lacustris*.
- Avaliar os efeitos nas taxas de fertilização dos oócitos, eclosão de embriões e normalidade larval.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Generalidades

3.1.1. Acomodação e seleção dos reprodutores

Foram adquiridos exemplares de *A. lacustris* provenientes de uma piscicultura comercial do município de Cananeia, São Paulo, Brasil, e posteriormente levados para a Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira (FCAVR) da Unesp, Registro, São Paulo, Brasil.

Os exemplares adquiridos foram mantidos em um tanque de 10 m³ contendo bioflocos, localizado no interior de uma estufa com o intuito de evitar perda de calor. O sistema era composto por aeração contínua, temperatura controlada com uso de resistência elétrica de cobre (2000 W) e uma lâmpada fluorescente para controle de horas de luz (13h dia⁻¹). Os animais foram alimentados diariamente com dieta comercial na forma extrusada (36% de PB, 2,6 mm), até a saciedade aparente.

Após cinco meses nesse sistema de criação, 54 exemplares (41 machos e 13 fêmeas) foram selecionados baseando-se nas características de maturação secundárias, sendo, abdômen abaulado e macio para as fêmeas e espículas na nadadeira anal para os machos. Posteriormente foram transportados para o Laboratório de Aquicultura da FCAVR, onde foram pesados e separados por sexo em caixas d'água circulares (0,5 m³, com 1,24m de diâmetro), contendo aeração constante por meio de sopradores de ar, e temperatura controlada por termostatos 100W.

3.1.2. Indução hormonal

Todos os exemplares foram submetidos ao protocolo de indução hormonal utilizando o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). Para o preparo da solução do EBHC, as hipófises foram diluídas em soro fisiológico (NaCl 0,9% - 0,5 mL kg⁻¹). As fêmeas receberam duas dosagens hormonais de forma intramuscular na base da nadadeira peitoral, sendo a primeira dose preparatória de 0,5 mg de EBHC kg⁻¹ de peso vivo e, após doze horas, a dosagem final de 5,0 mg EBHC kg⁻¹ de peso vivo (Abreu *et al.*, 2021). Os machos receberam dose única de 2,5 mg de EBHC kg⁻¹, que ocorreu duas horas antes da segunda dosagem das fêmeas, possibilitando a coleta dos gametas masculinos antes da coleta dos oócitos, com o objetivo de minimizar a

perda da viabilidade dos oócitos após a coleta (Sanches *et al.*, 2011).

3.1.3. Extrusão

Após 180 horas-grau, os exemplares foram anestesiados em água contendo eugenol (50 mL L^{-1}), contidos e secos com papel toalha (Bombardelli *et al.*, 2006). Em seguida, realizou-se a extrusão dos machos e fêmeas, através de massagem na região ventral no sentido encéfalo-caudal para a coleta dos gametas masculinos e femininos.

A coleta de sêmen foi realizada com o auxílio de uma micropipeta automática ($10 \mu\text{L}$), e em seguida foram acondicionados em microtubos ($1,5 \text{ mL}$) contendo $20 \mu\text{L}$ de solução salina balanceada de Hank's (INLAB Ltda.) na concentração de $9,5 \text{ g.L}^{-1}$ (diluïdor), com o intuito de evitar possíveis contaminações com urina e água conforme metodologia adaptada de Yasui *et al.* (2015). Considerando que o sêmen perde qualidade se estocado *in natura* em longo prazo, o mesmo foi coletado e estocado em caixas de isopor contendo gelo e em seguida manipulados para formação do *pool* (Sanches *et al.*, 2013).

Os oócitos foram coletados de cada fêmea separadamente em placas de Petri envolvidas com plástico filme, a fim de evitar a aderência ao vidro. Em seguida foi realizada a pesagem ($\pm 0,01 \text{ g}$) dos oócitos de cada fêmea. Amostras de $0,1 \text{ g}$ foram fixadas em formol 10% para posteriores cálculos de produtividade por fêmea. Os primeiros oócitos, assim como a primeira gota de sêmen, foram descartados para evitar possível contaminação por urina e fezes (Brooks *et al.*, 1997).

3.1.4. Exposição e concentração de Pb na água

As concentrações de chumbo na água seguiram o proposto por Hilbig *et al.*, (2008), e para isso foi preparada uma solução-mãe com 13 mg de nitrato de chumbo $(\text{PbNO}_3)_2$ diluído em 1 litro de água do sistema (ABNT/NBR 15499/2015). Em seguida, foram retirados 94 mL , 188 mL , 282 mL e 376 mL e transferidos para os aquários, alcançando as concentrações de $0,15$, $0,30$, $0,45$ e $0,60 \text{ mg Pb L}^{-1}$, respectivamente.

A quantificação do chumbo na água foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica pelo Laboratório A3Q Ltda. O método consiste na técnica espectroanalítica para determinar quantitativamente elementos baseados na absorção da radiação por átomos livres no estado gasoso (Welz e Speling, 2008).

3.2. Delineamento experimental

3.2.1. Ensaio 1: Efeito do chumbo na fertilização dos zigotos

Neste ensaio, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado composto por cinco tratamentos (T1 = 0,0 mg Pb L⁻¹, T2 = 0,15 mg Pb L⁻¹, T3 = 0,30 mg Pb L⁻¹, T4 = 0,45 mg Pb L⁻¹ e T5 = 0,60 mg Pb L⁻¹) e cinco repetições, representadas pelas incubadoras (peneira plástica - Ø 0,5 mm) contendo 0,05 mL de oócitos. As diferentes concentrações de chumbo foram utilizadas na água empregada para a fertilização dos oócitos e também para a sua incubação artificial.

Para isso, foram utilizados 15 reprodutores, sendo 12 machos e 3 fêmeas. Ambos foram alocados previamente em caixa d'água de 500 L isenta de contaminante, com aeração constante e temperatura controlada. Após a indução hormonal, foi coletado um *pool* de oócitos proveniente das fêmeas e um *pool* de sêmen proveniente de todos os machos que apresentaram, durante análise subjetiva prévia, motilidade acima de 50%.

As fêmeas utilizadas no pool de fertilização apresentaram peso médio de 13,29 g ± 1,17 e um total de 7,29 g de oócitos (Tabela 1). Os parâmetros reprodutivos nesse estudo, obtiveram valores de fecundidade relativa esperados para a espécie (Sato *et al.*, 2006; Pinheiro, 2017; Bailly *et al.*, 2018).

Tabela 1. Parâmetros reprodutivos das fêmeas de *A. lacustris*.

Fêmea	Peso (g)	Peso dos oócitos (g)	Quantidade de oócitos em 0,5 g	Fecundidade Relativa	Fecundidade Absoluta
1	12,14	1,99	298	488,5	5930,2
2	14,47	2,41	281	468,0	6772,1
3	13,25	1,94	274	401,2	5315,6
Méd.±DP	13,29 ± 1,17	2,11 ± 0,26	284,33 ± 12,34	452,56 ± 45,66	6005,97 ± 731,20

Fecundidade Relativa: (quantidade de oócitos/ grama de fêmea); Fecundidade absoluta: (oócitos/fêmeas); Méd. ± DP = média ± desvio padrão.

Foi coletado 0,05 mL de oócitos para fertilização com uma quantidade de 20 µL de sêmen para todas as amostras (Pereira-Santos *et al.*, 2017). Após a fertilização, foi realizada a ativação dos oócitos com 5 mL de água proveniente de cada tratamento e posteriormente, foram transferidos para incubadoras individuais alocadas em aquários de

7 L (volume útil de 5 L) com um sistema de aeração constante, temperatura controlada em água também enriquecida por chumbo (Figura 2).

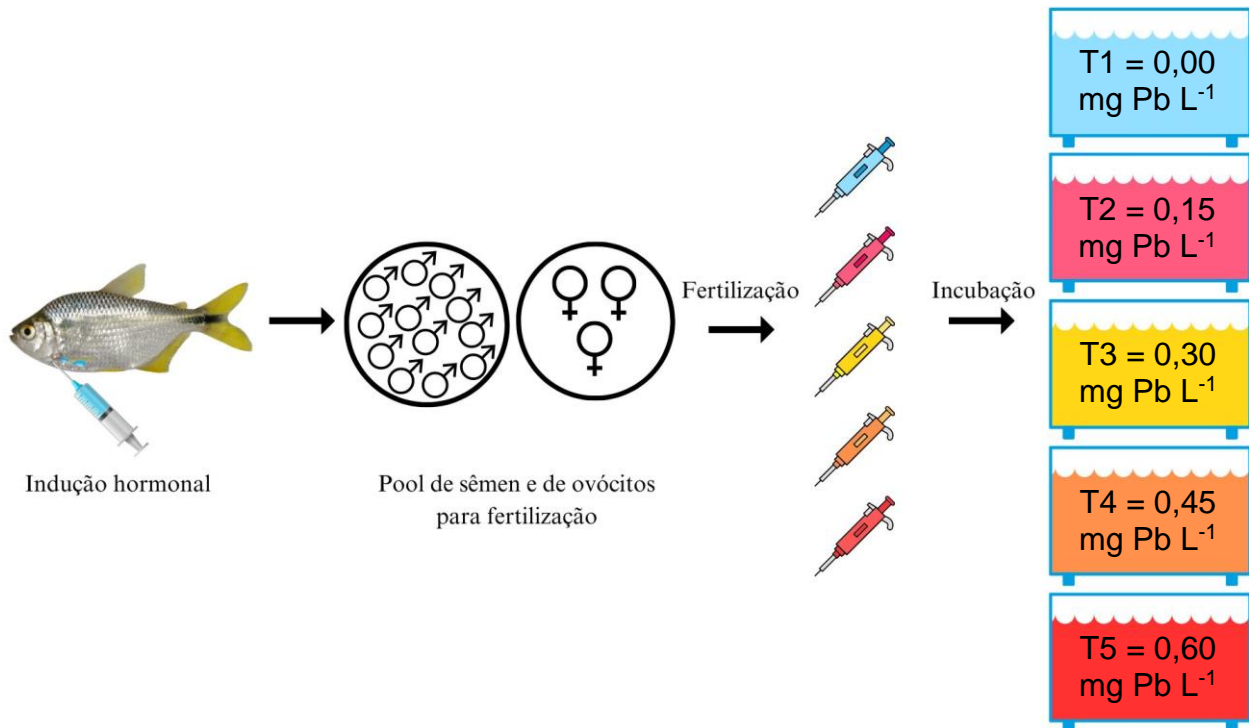


Figura 2. Representação do ensaio 1. Pipetas e aquários coloridos representam as diferentes concentrações de chumbo na água.

Oito horas após a fertilização (fechamento do blastóporo – 26 °C), todos os embriões de todas as incubadoras foram retirados para estimativa das taxas de fertilização (228 ± 21 embriões/incubadora). Os embriões foram transferidos para câmaras de vidro e classificados em embriões viáveis (EV) e embriões não viáveis (EN), considerando os embriões viáveis fertilizados como os translúcidos que apresentavam desenvolvimento embrionário normal, e os embriões não viáveis, aqueles com coloração esbranquiçada ou opaca. Os percentuais das taxas de fertilização (TF) foram calculados através da fórmula: $TF (\%) = 100 * (EV / (EV + EN))$.

Após a eclosão, todas as larvas (LA) foram retiradas das peneiras e transferidas para a câmara de vidro para contagem em estereomicroscópio binocular (objetiva de 10x), em que foi estimada a taxa de eclosão (TE), através da fórmula: $TE (\%) = 100 * (LA / \text{Número total de embriões de cada incubadora})$ e taxa de eclodibilidade (TEO), em que $TEO (\%) = 100 * (LA / EV)$. Foi realizada a classificação em relação à sua morfologia, considerando larvas normais (LN) as que não

apresentaram nenhum tipo de alteração morfológica e larvas defeituosas (Figura 3a) (LD) as que apresentaram alguma deformidade (Figura 3b), dificuldade na movimentação ou dificuldade de romper o córium (Figura 3c). O percentual da larvas normais foi realizado através da fórmula: $LN (\%) = 100 * (LN / (LN + LD))$.

Os parâmetros físico-químicos como: temperatura ($^{\circ}C$), pH, amônia ($mg L^{-1}$), nitrito ($mg L^{-1}$) e oxigênio dissolvido ($mg L^{-1}$), foram medidos duas vezes ao dia na água utilizada na fertilização e incubação dos embriões.



Figura 3. Larva normal (a); larva com deformidade morfológica (b) e larvas que apresentaram dificuldade para romper o córium (c).

3.2.2. Ensaio 2: Efeito do chumbo na cinética espermática

Este ensaio também foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos (concentrações de Pb na água) e oito repetições, representada pelos machos. As diferentes concentrações foram utilizadas como soluções ativadoras da motilidade espermática. Para isso, os machos foram previamente alocados em uma caixa de 500 litros isenta de chumbo, com aeração constante e temperatura controlada ($26^{\circ}C \pm 0,4$).

Os exemplares foram induzidos hormonalmente e em seguida foi realizada a extrusão dos gametas. O sêmen foi ativado individualmente com as diferentes concentrações de chumbo (Figura 4) e os parâmetros espermáticos foram avaliados pelo método computadorizado, utilizando um software de código aberto (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007).

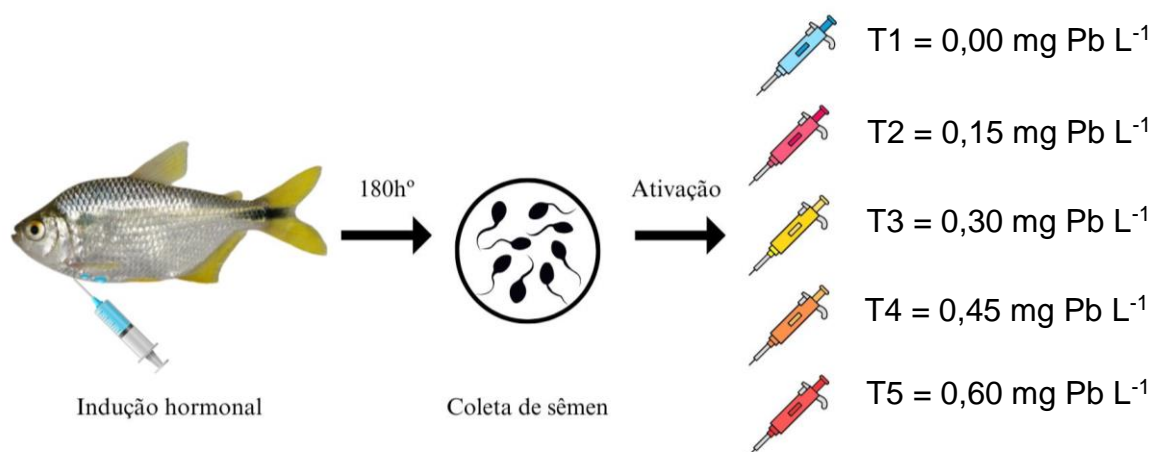


Figura 4. Representação do ensaio 2. Pipetas coloridas representam as diferentes concentrações de chumbo na água.

Os vídeos foram gravados com auxílio de uma câmera digital Basler acA640-120gc (<http://www.baslerweb.com>). Para tal, o sêmen ativado foi levado rapidamente a um microscópio biológico trinocular (SolaristBel) em objetiva de 10x, conectado ao computador (CPU Intel (R) Core (TM) i5-10210U @ 1,60 GHz, 2,11 GHz, 8 GB de Ram) com sistema operacional Microsoft Windows 11[®]. As análises foram realizadas conforme procedimentos detalhados por Sanches *et al.* (2010; 2013), entre 10s e 50s pós ativação em 1s de vídeo (100 frames) por meio do software livre ImageJ/plugin CASA. Os parâmetros avaliados foram: percentual de motilidade espermática (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), oscilação (WOB), progressão (PROG) e frequência do batimento transversal (BCF). As configurações utilizadas no programa para avaliação foram adaptadas de Sanches *et al.* (2013) e Pinheiro *et al.* (2021), sendo os valores de 1, 6 e 15 $\mu\text{m s}^{-1}$ para VSL, VAP e VCL, respectivamente, utilizadas como velocidades mínimas para considerar uma célula móvel.

Para a avaliação e mensuração das taxas e alterações morfológicas, uma amostra de sêmen de cada tratamento foi fixada 1:1000 (sêmen:formol salino tamponado - 4,6%) contendo 10 μL de rosa de Bengala (adaptado de Streit Jr. *et al.*, 2004; 2006; Bombardelli *et al.*, 2010). Em seguida, foi realizado o processamento das lâminas (Sanches *et al.*, 2016), e foram avaliadas três áreas com 200 células cada. A análise foi realizada em microscópio de luz objetiva de 60x e as células foram

classificadas em espermatozoides normais e defeituosos (Streit Jr. *et al.*, 2009).

3.3. Análise Estatística

Todos os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (*one-way* ANOVA) a 5% de significância. Os pressupostos de homogeneidade dos resíduos (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Levene) foram checados. Em caso de efeito significativo, foi aplicada a análise de comparação de médias de Duncan ao mesmo nível. Conforme o comportamento dos dados, foram utilizadas análises de regressão linear e em caso de dados não paramétricos (heterocedástico e não homogêneos), foi realizado teste de comparação de Kruskal-Wallis. Dados considerados *out-liers* (distância de cook >4/n) não foram considerados nas análises conforme Cook (1977) e Altman e Krzywinski (2016). Para os dados da taxa de motilidade ao longo do tempo, aplicou-se análise de regressão não linear pelo modelo senoidal ($y=1/(1-a*\exp(-x*b))$). Para os dados de taxas de fertilização, aplicou-se análise de regressão segmentada ($y=constant-slope1*x-slope2*(x-Breakpnt)*(x>Breakpnt)$).

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros físico-químicos

As características da água permaneceram estáveis durante o experimento ($p<0,05$), apenas valores de amônia encontrados aumentaram conforme a concentração de chumbo na água, apresentando efeito na comparação das médias (Tabela 2).

Tabela 2. Qualidade de água (média \pm desvio padrão) ao longo do período experimental.

Tratamento	Temp. (°C)	pH	O.D (mgL ⁻¹)	NH ₃ N (mgL ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mgL ⁻¹)
Controle	26,4 \pm 0,15	7,9 \pm 0,02	6,0 \pm 0,04	0,5 \pm 0,10 ^a	5,0 \pm 1,19
0,15 mg Pb L ⁻¹	26,4 \pm 0,06	7,8 \pm 0,05	6,0 \pm 0,13	0,7 \pm 0,12 ^a	6,0 \pm 0,10
0,30 mg Pb L ⁻¹	26,5 \pm 0,10	7,8 \pm 0,10	6,0 \pm 0,04	0,8 \pm 0,19 ^b	5,7 \pm 0,46
0,45 mg Pb L ⁻¹	26,3 \pm 0,17	7,8 \pm 0,06	6,0 \pm 0,07	0,9 \pm 0,06 ^b	5,3 \pm 0,32
0,60 mg Pb L ⁻¹	26,6 \pm 0,25	7,8 \pm 0,10	6,1 \pm 0,12	0,9 \pm 0,02 ^b	4,5 \pm 0,51
F e p-valor	F _(4;10) =1,28; p=0,34	F _(4;10) = 0,66; p=0,64	F _(4;10) =0,60; p=0,67	F _(4;10) =4,91; p=0,02	F _(4;10) =2,66; p=0,10

Temp.: Temperatura; O.D: Oxigênio Dissolvido; NH₃N: Amônia; NO₂⁻: Nitrito.

4.2. Fêmeas

Para as taxas de fertilização, eclosão, eclodibilidade e normalidade das larvas, foram realizadas as contagens totais de cada incubadora de cada tratamento. Foi observado maiores taxas de fertilização nos tratamentos com menores concentrações do contaminante, apresentando tendência negativa com o aumento da concentração na água (Figura 5a).

O mesmo comportamento foi observado para as taxas de normalidade larval, e em função do comportamento dos dados para as duas taxas, realizou-se uma análise de regressão segmentada (Figura 5b). Não houve efeito significativo para as taxas de eclosão e eclodibilidade.

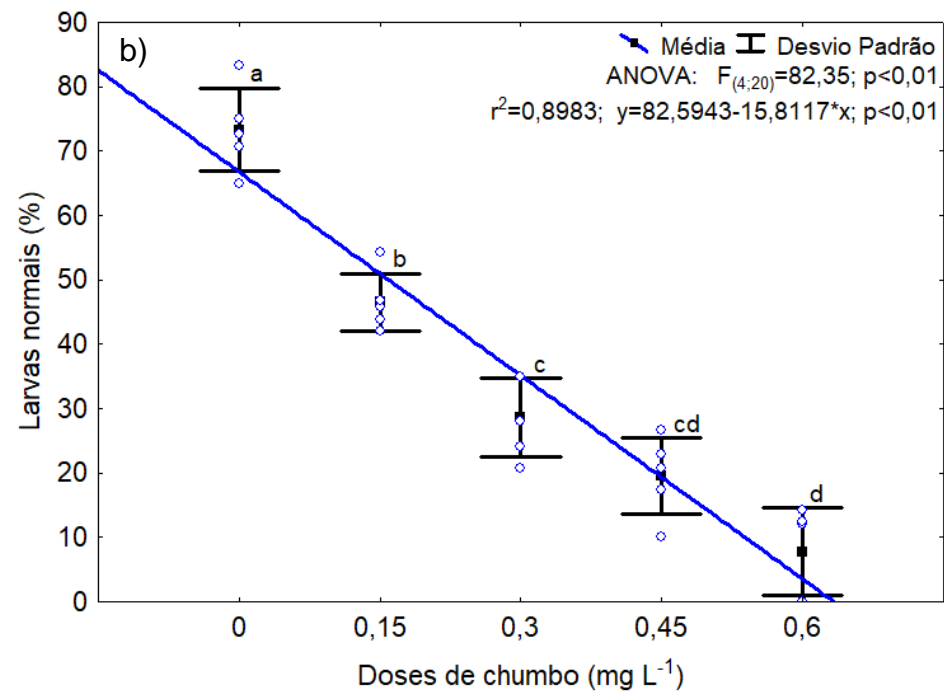
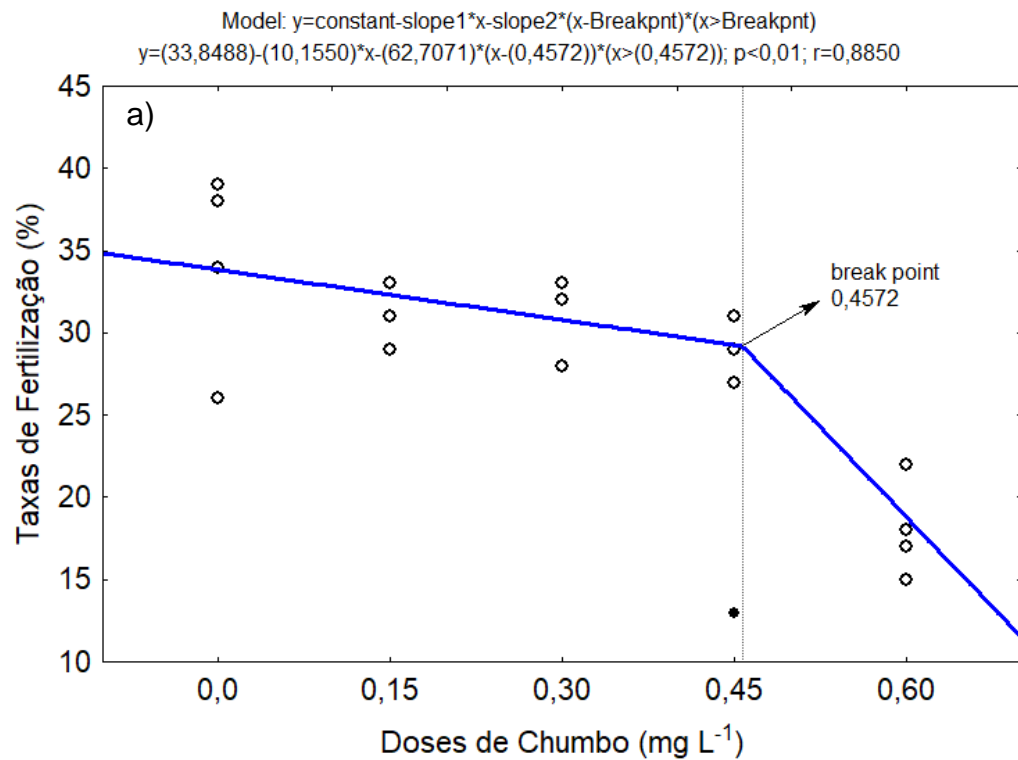


Figura 5. Percentual de fertilização (a) e larvas normais (b) de *A. lacustris* em diferentes concentrações de chumbo.

4.3. Machos

Para parâmetros espermáticos não verificou-se diferenças significativas ($p > 0,05$) para a análise de variância entre os tempos de 10, 20, 30, 40 e 50 segundos pós ativação. Desta forma, optou-se por apresentar os dados (média \pm desvio padrão) de 10 e 50s pós-ativação (Tabela 3 e 4). Porém, para as taxas de motilidade e velocidade curvilinear (VCL) houve uma tendência de queda significativa dos valores ($p < 0,05$) para 10s pós-ativação com regressão linear negativa (Figura 7 e 8). Além disso, verificou-se ao longo do tempo pós-ativação um comportamento senoidal das taxas de motilidade para cada tratamento ao longo de todo tempo pós-ativação, em que o tratamento com $0,60 \text{ mg Pb L}^{-1}$ inicialmente estava um pouco abaixo das demais curvas, porém tornando-se semelhante na sequência (Figura 6).

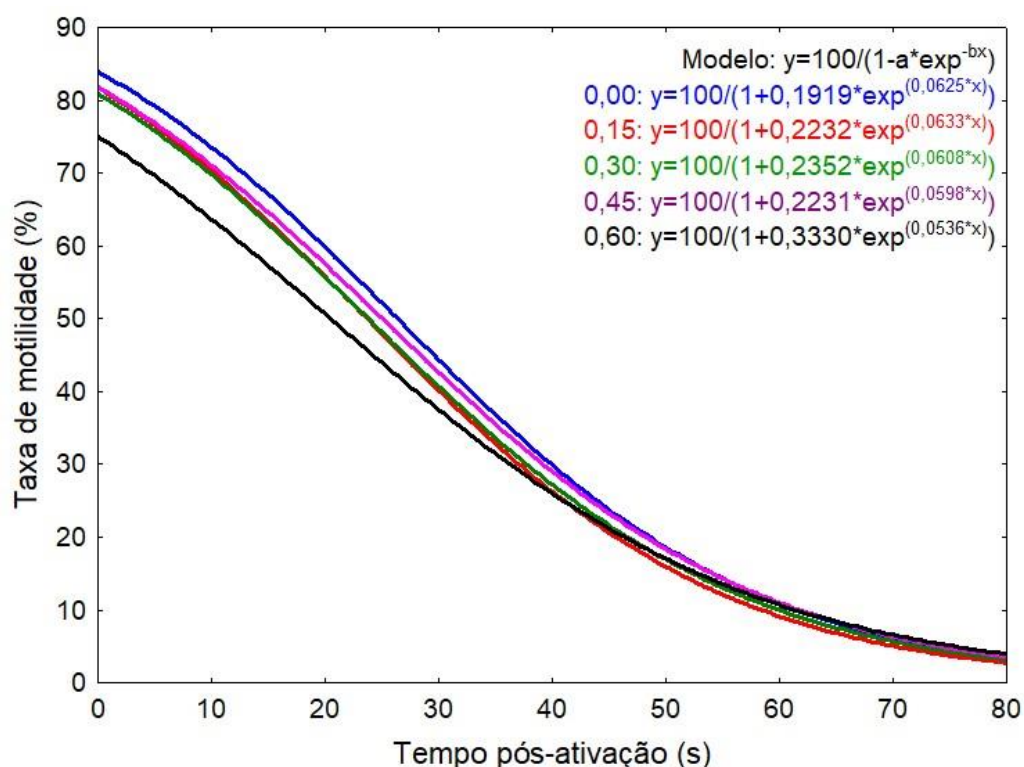


Figura 6. Curvas de motilidade espermática obtidas entre 10 e 50 segundos pós ativação em diferentes concentrações de chumbo utilizada na solução ativadora dos espermatozoides de *Astyanax lacustris*.

Tabela 3. Parâmetros espermáticos (média ± desvio padrão) em 10 segundos pós ativação de machos de *Astyanax lacustris* utilizando diferentes concentrações de chumbo.

Parâmetros	Níveis de chumbo (mg L ⁻¹)					Geral	ANOVA F e p-valor
	0,00	0,15	0,30	0,45	0,60		
MOT (%)	73,73 ± 8,97	66,89 ± 13,16	67,24 ± 9,94	68,6 ± 9,8	57,45 ± 9,05	66,84 ± 11,06	F _(4;33) =2,27; p=0,08
VCL (µm s ⁻¹)	57,72 ± 1,97	58,35 ± 2,07	57,2 ± 1,93	56,96 ± 2,03	55,5 ± 1,22	57,14 ± 2,01	F _(4;29) =2,27; p=0,09
VAP (µm s ⁻¹)	35,05 ± 1,99	35,49 ± 1,49	34,71 ± 1,75	34,94 ± 2,23	34,23 ± 2,24	34,86 ± 1,9	F _(4;32) =0,42; p=0,80
VSL (µm s ⁻¹)	33,43 ± 1,98	33,91 ± 1,43	33,21 ± 1,69	33,44 ± 2,16	32,71 ± 2,14	33,32 ± 1,84	F _(4;32) =0,39; p=0,81
STR(%)	95,48 ± 0,54	95,5 ± 0,42	95,66 ± 0,45	95,89 ± 0,32	95,58 ± 0,38	95,62 ± 0,43	F _(4;33) =1,06; p=0,39
WOB(%)	59,34 ± 3,57	61,28 ± 3,04	60,58 ± 3,12	60,6 ± 2,86	60,31 ± 2,54	60,45 ± 2,93	F _(4;33) =0,40; p=0,81
PROG (µm)	521,72 ± 30,84	530,6 ± 20,94	518,54 ± 26,01	521,43 ± 32,65	510,81 ± 32,99	520,3 ± 28,19	F _(4;32) =0,45; p=0,77
BCF (Hz)	44,1 ± 1,22	44,01 ± 1,31	44,28 ± 1,29	44,03 ± 1,46	44,46 ± 0,97	44,18 ± 1,21	F _(4;35) =0,19; p=0,94

MOT (%): percentual de motilidade espermática; VCL (µm/s): velocidade curvilinear; VAP (µm/s): velocidade média de deslocamento; VSL (µm/s): velocidade em linha reta; STR (%): retilinearidade; WOB (%): oscilação; PROG (µm): progressão; BCF (Hz): frequência do batimento transversal.

Tabela 4. Parâmetros espermáticos (média ± desvio padrão) em 50 segundos pós ativação de machos de *Astyanax lacustris* utilizando diferentes concentrações de chumbo.

Parâmetros	Níveis de chumbo (mg L ⁻¹)					Geral	ANOVA F e p-valor
	0,00	0,15	0,30	0,45	0,60		
MOT (%)	16,79 ± 13,08	14,45 ± 11,56	16,16 ± 12,54	17,03 ± 11,39	15,99 ± 10,52	16,08 ± 11,27	F _(4;35) =0,06; p=0,99
VCL (µm s ⁻¹)	35,73 ± 2,52	34,49 ± 1,89	35,06 ± 2,86	34,15 ± 2,51	34,42 ± 2,23	34,77 ± 2,37	F _(4;35) =0,65; p=0,71
VAP (µm s ⁻¹)	19,54 ± 0,89	18,61 ± 1,33	18,88 ± 1,89	18,36 ± 1,73	18,16 ± 1,52	18,71 ± 1,51	F _(4;35) =1,00; p=0,42
VSL (µm s ⁻¹)	18,5 ± 0,83	17,72 ± 1,31	17,99 ± 1,83	17,47 ± 1,68	17,28 ± 1,50	17,19 ± 1,46	F _(4;35) =0,85; p=0,51
STR(%)	94,71 ± 0,83	95,18 ± 0,51	95,32 ± 0,54	95,12 ± 0,55	95,06 ± 1,09	95,08 ± 0,73	F _(4;35) =0,77; p=0,55
WOB(%)	55,01 ± 2,97	54,13 ± 3,08	54,11 ± 5,12	53,85 ± 3,98	53,13 ± 4,33	54,05 ± 3,82	F _(4;35) =0,23; p=0,92
PROG (µm)	288,63 ± 12,95	276,22 ± 20,27	280,07 ± 28,55	271,07 ± 25,34	270,16 ± 22,65	277,23 ± 22,45	F _(4;35) =0,89; p=0,48
BCF (Hz)	43,56 ± 1,46	44,11 ± 1,48	43,51 ± 2,4	44,67 ± 1,51	43,7 ± 1,78	43,91 ± 1,73	F _(4;35) =0,61; p=0,66

MOT (%): percentual de motilidade espermática; VCL (µm/s): velocidade curvilinear; VAP (µm/s): velocidade média de deslocamento; VSL (µm/s): velocidade em linha reta; STR (%): retilinearidade; WOB (%): oscilação; PROG (µm): progressão; BCF (Hz): frequência do batimento transversal.

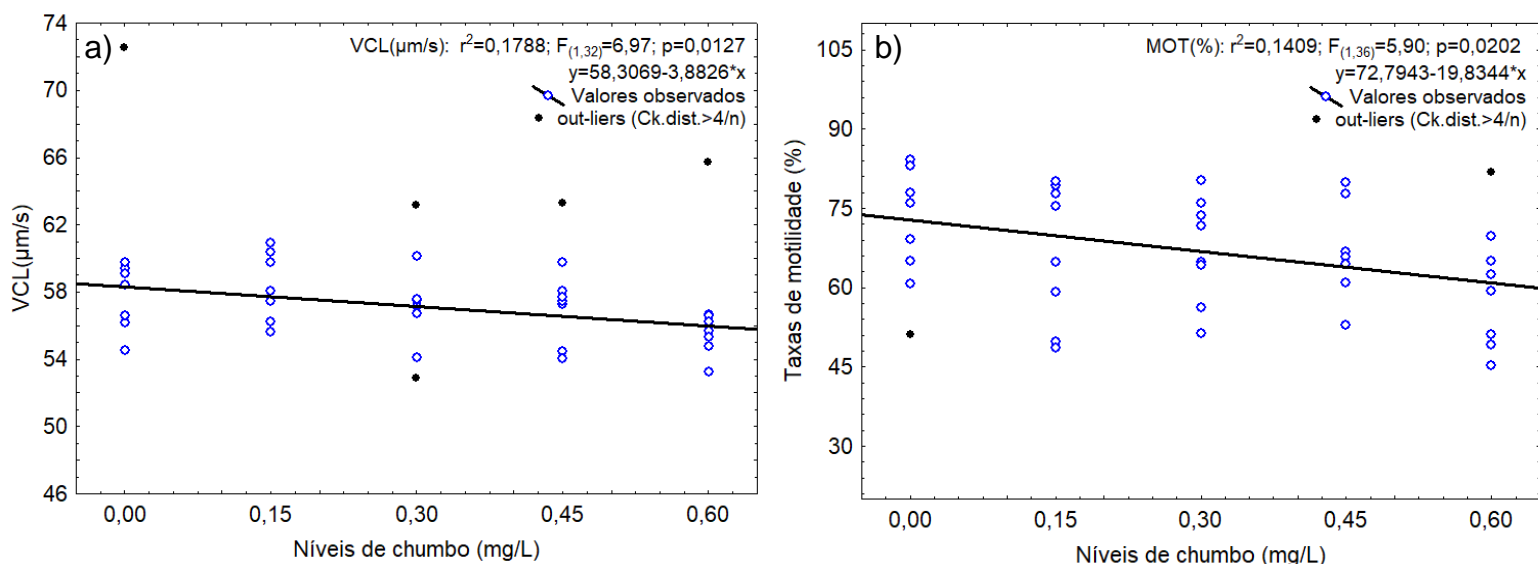


Figura 7. Velocidade curvilínea obtida em 10 segundos (a) e 50 segundos (b) pós ativação em diferentes concentrações de chumbo utilizada na solução ativadora dos espermatozoides de *Astyanax lacustris*.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que tanto fêmeas quanto machos de *A. lacustris* expressaram algum distúrbio reprodutivo relacionado à adição do chumbo na água. Assim como já relatado para algumas espécies de peixes (Vanzetto, 2014; Braga *et al.*, 2021), a exposição aos poluentes acumulados na água é responsável por um elevado número de alterações cromossômicas, sendo capaz de alterar e danificar o DNA das células dos animais. Sanchez *et al.*, (2017) indicam também que a exposição ao chumbo pode levar a modificações epigenéticas que serão transmitidas para as próximas gerações, alterando os perfis de metilação do DNA, evidenciando a influência dos contaminantes a nível molecular.

Ferreira (2021) avaliou os efeitos subcrônicos do chumbo em parâmetros reprodutivos de *Astyanax bimaculatus* e observou que as diferentes concentrações do contaminante foram responsáveis por efeitos deletérios na gametogênese com redução do índice gonadossomático, atrasando a maturação gonadal com desequilíbrio hormonal e posterior interferência na fertilização.

Além disso, já foram observados em outros estudos, diversas anomalias durante a clivagem, com blastômeros desiguais e distribuídos de forma irregular, apresentando blástula deformada e interferência na fase de organogênese dos embriões

(Jeziarska *et al.*, 2009). A influência dos metais durante o desenvolvimento embrionário (Słominska 1998; Ługowska e Jeziarska 2000; Ługowska 2005) indica atrasos na organogênese, sendo observada uma forte influência dos metais imediatamente após a fertilização, no período de hidratação dos gametas.

Os ovos de peixe absorvem água pelo espaço perivitelino e acabam aumentando seu tamanho, porém, no momento em que a membrana ainda se encontra permeável, os íons metálicos podem entrar no embrião, alterando sua estrutura e a permeabilidade do córium (Jeziarska e Witeska, 2009). Além dessa característica, o chumbo liga mucopolissacarídeos para a membrana, alterando a permeabilidade e as trocas de íons entre o fluido perivitelínico e o ambiente externo (Stouthart *et al.* 1994).

A causa na redução nas taxas de fertilização encontradas nesse experimento podem ser explicadas pelos danos causados pelo chumbo sobre as membranas dos gametas (Brooks *et al.*, 1997), por possíveis interações entre o poluente e a micrópila, podendo impedir a entrada do espermatozoide (Kime, 1995) e também pelos efeitos dos metais nas divisões mitóticas (Kapur e Yadav, 1982).

A relação de diminuição de larvas normais com o aumento das concentrações de contaminantes já foi relatada em diversos estudos (Sfakianakis *et al.*, 2015; Taslima *et al.*, 2022), assim como a diminuição na taxa de fertilização (Reinardy *et al.*, 2013; Hayati *et al.*, 2017; Gárriz e Miranda, 2020), considerando que o desenvolvimento de embriões e larvas, geralmente, são as fases mais sensíveis do ciclo de vida, pois estão suscetíveis a todos os tipos de poluição ambiental de baixo nível (Hallare *et al.*, 2005).

Os efeitos iniciais da poluição por metal pesado podem ser identificados em níveis celulares e teciduais antes mesmo de mudanças comportamentais ou fenotípicas (Moyle e Cech, 1988), entretanto, estas são mais facilmente estudadas. Os danos os danos causados pela exposição aos contaminantes já podem ser identificados no início do desenvolvimento embrionário, com divisões celulares irregulares, distorções na coluna vertebral e elevação precoce da cabeça e cauda (Meinelt e Staaks, 1992). Osman *et al.*, (2007) ao submeter embriões de bagre-africano, *Clarias gariepinus*, em diferentes concentrações de chumbo, observaram diferentes danos na coluna vertebral, classificando-os em escoliose (curvatura lateral), lordose (curvatura dorsoventral), cifose (curvatura ventrodorsal) e corpo em forma de C, além de atraso na eclosão conforme o aumento das concentrações de Pb e incapacidade dos embriões de romper o córion. Os mesmos danos na coluna vertebral já foram relatados em outras espécies de peixes,

como carpas e peixe-zebra expostos ao chumbo (Holcombe *et al.*, 1976; Ozoh, 1979; Stouthart *et al.*, 1994; Jezierska *et al.*, 2000).

As alterações morfológicas podem interferir diretamente na notocorda, afetando a ontogenia, tanto na porção do tubo neural, quanto no desenvolvimento normal das vértebras, gerando um impacto letal e mortalidade selecionada de embriões anormais, contribuindo para o declínio da população (Von Westernhagen, 1988; Klumpp e Von Westernhagen, 1995).

Além da diminuição da normalidade larval relatada em estudos com peixes submetidos à metais pesados (Nguyen *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 2007; Gárriz *et al.*, 2020; Curcio *et al.*, 2021), foram observados também aumentos na taxa de mortalidade (Witeska *et al.*, 2014; El-Greisy *et al.*, 2015; Gárriz *et al.*, 2020), baixas taxas de eclosão (Johnson *et al.*, 2007; Lizardo-Daudt *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010), diminuição no desempenho reprodutivo (James *et al.*, 2008; Cazan e Klerks, 2015; Driessnack *et al.*, 2016), mudanças na escala de tempo do desenvolvimento embrionário (Bourrachot *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009), além de diversos outros efeitos no sistema reprodutivo dos peixes que interferem na prospecção da espécie.

Curcio *et al.*, (2021), submetem embriões de zebrafish, *Danio rerio*, à duas concentrações de chumbo, 2,5 e 5 µg/L, a fim de avaliar os efeitos do contaminante, mesmo que em baixas concentrações, sobre a normalidade larval. Foi observado que a partir de 48h todos os grupos apresentavam modificações, as quais se agravavam dependendo da concentração e do tempo de exposição. Considerando que no presente estudo, o tempo de exposição foi menor, pode-se sugerir que o padrão encontrado corrobora com o esperado para o contaminante.

A duração da motilidade espermática, bem como as velocidades dos espermatozoides, são determinantes para a fertilização (Linhart *et al.*, 2005; Alavi *et al.*, 2008; Hatf *et al.*, 2009), pois foi demonstrado para diversas espécies que espermatozoides com movimentos mais rápidos e um período mais longo de motilidade, apresentam maiores chances de fertilização do oócito (Butts *et al.*, 2008; Linhart *et al.*, 2008).

Diversos estudos relatam os efeitos da exposição dos metais pesados na qualidade seminal, principalmente na concentração e cinética espermática, constantando, em sua maioria, padrões inversos entre os níveis de contaminante e a qualidade espermática (Hilbig *et al.*, 2008; Witeck *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2020), além

de diferentes efeitos observados nos espermatozoides, como alterações morfológicas (Rurangwa *et al.*, 2004; Abascal *et al.*, 2007), inibição da motilidade espermática (Van Look e Kime, 2003; Abascal *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007), diminuição da qualidade e quantidade espermática (Hayati *et al.*, 2017), diminuição dos parâmetros cinéticos (Chyb *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2010; 2012).

Entretanto, Lahnsteiner *et al.*, (2004) submeteram exemplares de *Leuciscus cephalus*, *Lota lota*, *Clarias gariepinus* e *Salmo trutta fario* a diferentes concentrações de cádmio, cobre, mercúrio, chumbo, zinco, nitrito, ciclohexano e 2,4-diclorofenol e obtiveram diferentes efeitos nos parâmetros espermáticos, entre eles taxas de motilidade e velocidades não alteradas nos exemplares de *C. gariepinus*, classificando como baixa, média e alta resistência dos espermatozoides de acordo com cada espécie.

Abascal *et al.*, (2007) relataram alterações morfológicas nos espermatozoides de *Dicentrarchus labrax* expostos aos cloretos de cobre, chumbo (II) e mercúrio, porém a cinética espermática não apresentou efeito sobre os metais pesados Cu^{2+} e Pb^{2+} , mesmo em alta concentração. As diferentes respostas aos contaminantes, considerando a ausência e presença de efeitos na cinética e qualidade espermática, podem estar relacionadas as diferenças na fisiologia e bioquímica dos espermatozoides e do plasma seminal (Carnevali *et al.*, 2018), que podem desempenhar papel protetor contra os efeitos tóxicos dos íons de diferentes metais (Dietrich *et al.*, 2010), além de apresentarem respostas diferentes de acordo com a espécie estudada (Lahnsteiner *et al.*, 2004).

Em estudos com o sêmen fresco de *A. lacustris* sem exposição à contaminantes foram relatados valores de $65,34 \pm 11,64$, $50,12 \pm 9,87$ e $46,30 \pm 11,70$ para VCL, VAP e VSL, respectivamente (Lázaro *et al.*, 2021), e de $76,6 \pm 11,2\%$ para motilidade espermática (Carneiro-Leite *et al.*, 2020), ambos 10 segundos após a ativação, apresentando resultados superiores aos encontrados nesse estudo, sugerindo influência negativa de metais pesados nos parâmetros de motilidade e velocidade curvilínea encontrados nesse estudo.

Os parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e nitrito permaneceram dentro do recomendado pela literatura para *A. lacustris* (Baldisseroto e Gomes, 2010). Entretanto, a amônia apresentou maiores valores conforme o aumento da concentração de Pb, podendo ser explicada pela decomposição dos embriões e consequente catabolismo das proteínas, aumentando o nível desse composto na água (Pereira *et al.*, 2005).

6. CONCLUSÃO

Concluí-se que a contaminação da água por chumbo (Pb) causa alterações nas taxas de fertilização a partir da dose de 0,45mg L⁻¹ porém, doses de 0,15 mg L⁻¹ já são suficientes para acarretar em diminuição da quantidade de larvas normais. Além disso, dentro das condições utilizadas no experimento, as doses induziram uma diminuição na qualidade das características espermáticas em 10 segundos pós ativação, porém embriões e larvas apresentaram-se mais susceptíveis a contaminação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abascal, F. J., Cosson, J., & Fauvel, C. 2007. Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of Fish Biology*, 70(2), 509–522. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01322.x>

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas,. 2015. Ecotoxicologia aquática-Toxicidade crônica de curta duração-Metodo de ensaio com peixes.

Abreu, M.R., Silva, L.M. de J., Figueiredo-Ariki, D.G., Sato, R.T., Kuradomi, R.Y., Batlouni, S.R., 2021. Reproductive performance of lambari (*Astyanax altiparanae*) in a seminatural system using different protocols. *Aquaculture Research* 52(2), 471-483. <https://doi.org/10.1111/are.14905>

Alavi, S.M.H., Linhart, O., Coward, K., Rodina, M., 2008. Fish spermatology: Implication for aquaculture management. In: *Fish Spermatology*, Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, R. (Eds.). Alpha Science Ltd, Oxford, UK, pp. 397–460. ISBN: 978-1-84265-369-2.

Altman, N., & Krzywinski, M. 2016. Analyzing outliers: influential or nuisance?. *Nature Methods*, 13(4), 281-283.

Bailly, D., Agostinho, A. A., Suzuki, H. I., & Luiz, E. A. 2018. Características reprodutivas relacionadas ao sucesso na colonização de espécies do gênero *Astyanax* em reservatórios da bacia do Rio Iguaçu-PR.

Baldisserotto B, Gomes LC. 2010. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2nd ed. Santa Maria: Ed. UFSM.

Bombardelli, R. A., Mörschbacher, E. F., Campagnolo, R., Sanches, E. A., & Syperreck, M. A. 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá

cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). Revista Brasileira de Zootecnia, 35, 1251- 1257. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000500001>

Bombardelli, R. A., Hayashi, C., Natali, M. R. M., Sanches, E. A., & Piana, P. A. 2010. Digestible energy level on reproductive and zootechnical performance and lipids deposition in hepatocytes of the Nile tilapia males. Revista Brasileira de Zootecnia, 39(5), 941- 949. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000500001>

Bourrachot, S., Simon, O., & Gilbin, R. 2008. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology, 90(1), 29-36.

Boyle, D., Brix, K. V., Amlund, H., Lundebye, A. K., Hogstrand, C., & Bury, N. R. 2008. Natural arsenic contaminated diets perturb reproduction in fish. Environmental science & technology, 42(14), 5354-5360. <https://doi.org/10.1021/es800230w>

Braga, L. S. S. B., Damasceno, M. R. A., de Almeida, V. H. H., & Damasceno, J. E. A. 2021. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes do médio Rio São Francisco em Januária/MG/Evaluation of the frequency of micronuclei in erythrocytes of fish from the middle São Francisco River in Januária/MG. Brazilian Journal of Development, 7(6), 59389-59396.

Brooks, S., Tyler, C. R., & Sumpter, J. P. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg?. Reviews in Fish Biology and fisheries, 7(4), 387-416. <https://doi.org/10.1023/A:1018400130692>

Butts, I., Trippel, E. A., & Litvak, M. K. 2008. The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod. In 61st Canadian Conference for Fisheries Research. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.005>

Cândido, F. S. 2018. Um estudo sobre os impactos socioeconômicos da paralisação das atividades da Samarco para a cidade de Mariana.

Carneiro-Leite, L., Bashiyo-Silva, C., Oliveira, Y. A. A., Borges, L. P., Sanchez, M. P., Silva, L. G. D., ... & Ninhaus-Silveira, A. 2020. Seminal characteristics and sensitivity of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) sperm to cryoprotective solutions based on dimethylsulfoxide and methylglycol. Neotropical Ichthyology, 18. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0039>

Carnevali, O., Santangeli, S., Forner-Piquer, I., Basili, D., & Maradonna, F. 2018. Endocrine-disrupting chemicals in aquatic environment: what are the risks for fish

gametes?. Fish physiology and biochemistry, 44, 1561-1576.

Cassiano, A. M. 2017. Estudo da contaminação por metais na bacia do Rio Ribeira de Iguape (SP-PR): Estratégias para a remediação da área de disposição de rejeitos da mina do Rocha. <https://doi.org/10.11606/T.18.2016.tde-29012016-121847>

Cazan, A. M., & Klerks, P. L. 2015. Effects from a short-term exposure to copper or cadmium in gravid females of the livebearer fish (*Gambusia affinis*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 118, 199-203.

Celino, F. T., Yamaguchi, S., Miura, C., & Miura, T. 2009. Arsenic inhibits in vitro spermatogenesis and induces germ cell apoptosis in Japanese eel (*Anguilla japonica*). Reproduction, 138(2), 279-287. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0167>

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. 1986. Avaliação dos níveis de contaminação por metais pesados e pesticidas organoclorados na água, ictiofauna e outros organismos aquáticos do complexo Estuarino – Lagunar de Iguape – Cananéia: São Paulo: CETESB. Relatório final. 68

Chyb, J., Kime, D. E., Mikołajczyk, T., Szczerbik, P., & Epler, P. 2000. The influence of zinc on sperm motility of common carp-a computer assisted studies. Fisheries & Aquatic Life, 8(1), 5-14.

Cook, R. Dennis. 1977. Detection of influential observation in linear regression. Technometrics, v. 19, n. 1, p. 15-18. <https://doi.org/10.1080/00401706.1977.10489493>

Cunha, F. G. D. 2003. Contaminação humana e ambiental por chumbo no Vale do Ribeira, nos estados de São Paulo e Paraná (Doctoral dissertation).

Curcio, V., Macirella, R., Sesti, S., Pellegrino, D., Ahmed, A. I., & Brunelli, E. 2021. Morphological and molecular alterations induced by lead in embryos and larvae of *Danio rerio*. Applied Sciences, 11(16), 7464. <https://doi.org/10.3390/app11167464>

Darbre, P. D. 2006. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. Journal of Applied Toxicology: An International Journal, 26(3), 191-197.

de Cristo, N. P. 2017. Avaliação ecotoxicológica da água do Igarapé utilizando o lambari (*Astyanax sp*) como organismo bioindicador. South American Journal of Basic Education, Technical and Technological, 4(2).

Dietrich, G. J., Dietrich, M., Kowalski, R. K., Dobosz, S., Karol, H., Demianowicz, W., & Glogowski, J. 2010. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic Toxicology*, 97(4), 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.010>

Dietrich, G. J., Cierieszko, A., Kowalski, R. K., Rzemieniecki, A., Bogdan, E., Demianowicz, W., ... & Glogowski, J. 2012. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed sperm of Siberian sturgeon after a short-time exposure of fresh semen to mercury and cadmium. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(6), 973-977.

Driessnack, M. K., Matthews, A. L., Raine, J. C., & Niyogi, S. 2016. Interactive effects of chronic waterborne copper and cadmium exposure on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 179, 165-173.

Dzieweczynski, T. L., & Hebert, O. L. 2013. The effects of short-term exposure to an endocrine disrupter on behavioral consistency in male juvenile and adult Siamese fighting fish. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 64, 316-326.

El-Greisy, Z. A., & El-Gamal, A. H. A. 2015. Experimental studies on the effect of cadmium chloride, zinc acetate, their mixture and the mitigation with vitamin C supplementation on hatchability, size and quality of newly hatched larvae of common carp, *Cyprinus carpio*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41(2), 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.03.007>

Farias, C. E. G. 2002. Mineração e meio ambiente no Brasil. Relatório do CGEE/PNUD,76,2.

Fernandes, F. R. C., & Araujo, E. R. 2016. Mineração no Brasil: crescimento econômico e conflitos ambientais.

Ferreira, C. S. 2021. Efeitos da exposição subcrônica ao chumbo nos parâmetros reprodutivos de *Astyanax bimaculatus*.

Gárriz, Á., & Miranda, L. A. 2020. Effects of metals on sperm quality, fertilization and hatching rates, and embryo and larval survival of pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicology*, 29, 1072-1082. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02245-w>

Garutti, V. 2003. Piscicultura ecológica. Unesp.

Germani, D. J. 2002. A mineração no Brasil. Relatório Final, Brasil.

Guimarães, V. 2007. Resíduos de mineração e metalurgia: efeitos poluidores em sedimentos e em espécie biomonitora rio Ribeira de Iguape—SP. São Paulo: USP, Instituto de Geociências. <https://doi.org/10.11606/T.44.2007.tde-14062007-161240>

Hallare, A. V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H. R., & Triebkorn, R. 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology*, 30(1), 7-17.

Hatef, A., Niksirat, H., & Alavi, S. M. H. 2009. Composition of ovarian fluid in endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, and its effects on spermatozoa motility and fertilizing ability compared to freshwater and a saline medium. *Fish physiology and biochemistry*, 35, 695-700. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9302-6>

Hayati, A., Giarti, K., Winarsih, Y., & Amin, M. H. F. 2017. The Effect of Cadmium on Sperm Quality and Fertilization of *Cyprinus carpio* L. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 2(2), 45-50.

Hilbig, C. C., Bombardelli, R. A., Sanches, E. A., de Oliveira, J. D. S., Baggio, D. M., & de Souza, B. E. 2008. Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 30(2), 217-224.

Holcombe, G. W., Benoit, D. A., Leonard, E. N., & McKim, J. M. 1976. Long-term effects of lead exposure on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 33(8), 1731-1741.

Huang, W., Cao, L., Shan, X., Xiao, Z., Wang, Q., & Dou, S. 2010. Toxic effects of zinc on the development, growth, and survival of red sea bream *Pagrus major* embryos and larvae. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 58, 140-150.

Hutchinson, T. H., Ankley, G. T., Segner, H., & Tyler, C. R. 2006. Screening and testing for endocrine disruption in fish—biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 106-114. <https://doi.org/10.1289/ehp.8062>

IBRAM, Instituto Brasileiro de Mineração. 2022. Mineração em números. Site. Brasil, mar. <https://ibram.org.br/publicacoes/?txtSearch=&checkbox-section%5B%5D=1236>

IBRAM, Instituto Brasileiro de Mineração. 2023. Mineração em números. Site.

Brasil, out. <https://ibram.org.br/publicacoes/?txtSearch=&checkbox-section%5B%5D=1236>

James, R., Sampath, K., Jothilakshmi, S., Vasudhevan, I., & Thangarathinam, R. 2008. Effects of copper toxicity on growth, reproduction and metal accumulation in chosen ornamental fishes. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 8(1), 89-97.

Javed, M., & Usmani, N. 2019. An overview of the adverse effects of heavy metal contamination on fish health. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89, 389-403. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0875-7>

Jhariya, D., & Choraisia, K. 2010. Khanij utpadan ka jal sansadhan aivam jal sanrakshan par prabhav. *Bhu - Jal Sanvardhan aivam Jal sansadhano ka sanrakshan*.

Jhariya, D. C., Khan, R., & Thakur, G. S. 2016. Impact of mining activity on water resource: an overview study. *Proceedings of the Recent Practices and Innovations in Mining Industry, Raipur, India*, 19-20.

Jeziarska, B., Lugowska, K., Witeska, M., & Sarnowski, P. 2000. Malformations of newly hatched common carp larvae. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 3(2), 1.

Jeziarska, B., Ługowska, K., & Witeska, M. 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish physiology and biochemistry*, 35, 625-640.

Johnson, A., Carew, E., & Sloman, K. A. 2007. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 84(4), 431-438. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.003>

Kapur, K., & Yadav, N. A. 1982. Effects of certain heavy metal salts on the development of eggs in common carp, *Cyprinus carpio* var. communis. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.:(German Democratic Republic)*, 10(5).

Kime, D. E. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 5(1), 52-95. <https://doi.org/10.1007/BF01103366>

Kime, D. E., Ebrahimi, M., Nysten, K., Roelants, I., Rurangwa, E., Moore, H. D. M., & Ollevier, F. 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic toxicology*, 36(3-4),223-237. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00806-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00806-5)

Kime, D. E., & Nash, J. P. 1999. Gamete viability as an indicator of reproductive

endocrine disruption in fish. *Science of the Total Environment*, 233(1-3), 123-129.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00219-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00219-3)

Kime, D. E., Van Look, K. J. W., McAllister, B. G., Huyskens, G., Rurangwa, E., & Ollevier, F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 425-433. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00270-8)

Kitula, N. G. A. 2005. The environmental and socioeconomic impacts of mining on local livelihood in Tanzania: A case study of Geita District. *Journal of cleaner production*.v.14,pp.405-414 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.01.012>

Klumpp, D. W., & Von Westernhagen, H. 1995. Biological effects of pollutants in Australian tropical coastal waters: embryonic malformations and chromosomal aberrations in developing fish eggs. *Marine Pollution Bulletin*, 30(2), 158-165.

Lahnsteiner, F., Mansour, N., & Berger, B. 2004. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 65(5), 1283- 1297. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00528.x>

Langeani, F. *et al.* 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, 7, 181-197.
<https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000300020>

Lázaro, T. M., Rocha, N. R. D. A., Monzani, P. S., Nakaghi, L. S. O., Senhorini, J. A., Yasui, G. S., & Nascimento, N. F. D. 2021. Sperm quality of spontaneously occurring gynogenetic males in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. *Journal of Applied Ichthyology*, 37(6), 909-915. <https://doi.org/10.1111/jai.14244>

Li, D., Lu, C., Wang, J., Hu, W., Cao, Z., Sun, D., ... & Ma, X. 2009. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic toxicology*, 91(3), 229-237.

Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., & Vandeputte, M. 2005. Spermatozoal competition in common carp (*Cyprinus carpio*): what is the primary determinant of competition success?. *Reproduction*, 130(5), 705-711.
<https://doi.org/10.1530/rep.1.00541>

Linhart, O., Alavi, S. M. H., Rodina, M., Gela, D., & Cosson, J. 2008. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology*, 24(4),

386-392. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01138.x>

Lizardo-Daudt, H. M., & Kennedy, C. 2008. Effects of cadmium chloride on the development of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* early life stages. Journal of fish biology, 73(3), 702-718. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01971.x>

Lucena, C.A.S.D. and Soares, H.G. 2016. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. Zootaxa, 4072(1), 101–125. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4072.1.5>

Lugowska, K., & Jezierska, B. 2000. Effect of copper and lead on common carp embryos and larvae at two temperatures. Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. Piscaria, 26.

Ługowska, K. 2005. The effects of copper and cadmium on embryonic development, and quality of newly hatched common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae (Doctoral dissertation, Ph. D Thesis, University of Podlasie (In Polish)).

Meinelt, T., Stueber, A., & Staaks, G. 1992. The feasibility of embryo-larval-tests with zebrafish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan) illustrated by means of fish farming therapeutics. Fortschritte der Fischereiwissenschaft/Advances in fisheries science. Berlin, 10, 111-133.

Morgano, M. A., Gomes, P. C., Mantovani, D., Perrone, A. A., & Santos, T. F. 2005. Níveis de mercúrio total em peixes de água doce de pisciculturas paulistas. Food Science and Technology, 25, 250-253. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000200011>

Moyle, P. B; Cech, J. J. 1988. Fishes. An Introduction to Ichthyology. Prentice-Hall Int., London, 1988.

Nguyen, L. T., & Janssen, C. R. 2002. Embryo-larval toxicity tests with the African catfish (*Clarias gariepinus*): comparative sensitivity of endpoints. Archives of environmental contamination and toxicology, 42, 256-262.

Osman, A. G., Wuertz, S., Mekkawy, I. A., Exner, H. J., & Kirschbaum, F. 2007. Lead induced malformations in embryos of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Environmental Toxicology: An International Journal, 22(4), 375-389.

Ozoh, P. T. 1979. Malformations and inhibitory tendencies induced to

Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) eggs and larvae due to exposures in low concentrations of lead and copper ions. Bull. Environ. Contam. Toxicol.;(United States), 21(4/5).

Parini, M. 2017. Avaliação física, química e ecotoxicológica do alto da Bacia do Ribeira de Iguape.

Pereira-Santos, M., Shimoda, E., de Andrade, A. F. C., Silva, L. A., Fujimoto, T., Senhorini, J. A., ... & Nakaghi, L. S. O. 2017. Grooves surrounding the micropyle decrease the inseminating dose in fish. Zygote, 25(6), 731-739. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000624>

Pinheiro, A. P. B. 2017. Biologia reprodutiva e caracterização molecular de duas espécies simpátricas de lambaris e híbridos interespecíficos na cabeceira do Rio Grande, MG.

Pinheiro, J. P. S., de Assis, C. B., Sanches, E. A., & Moreira, R. G. 2020. Aluminum, at an environmental concentration, associated with acidic pH and high water temperature, causes impairment of sperm quality in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). Environmental Pollution, 262, 114252. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114252>

Pinheiro, J. P. S., Lima, J., de Assis, C. B., Branco, G. S., Gomes, A. D. O., & Moreira, R. G. 2021. Paternal exposure to aluminum, acidity, and temperature affect fatty acid seminal profile, embryonic and larval development of *Astyanax altiparanae*. Chemosphere, 266, 128935. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128935>

Reinardy, H. C., Syrett, J. R., Jeffree, R. A., Henry, T. B., & Jha, A. N. 2013. Cobalt-induced genotoxicity in male zebrafish (*Danio rerio*), with implications for reproduction and expression of DNA repair genes. Aquatic toxicology, 126, 224-230.

Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D. E., & Ollevier, F. 1998. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. Journal of Fish Biology, 53(2), 402-413. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00989.x>

Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., & Nash, J. P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture, 234(1-4), 1-28.

Salomons, W.; Stigliani, W. M. 1995. Biogeodynamics of pollutants in soils and

sediments. Berlin, Springer Verlag, Heidelberg, 87-100. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-79418-6>

Sanches, E.A., Bombardelli, R.A., Baggio, D.M., De Souza, B.E., 2009. Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. *Revista Brasileira De Zootecnia* 38(11), 2091- 2098. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001100003>

Sanches, E.A., Bombardelli, R.A., Marcos, R.M., Neumann, G., Toledo, C.P.R., Romagosa, E., 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research* 42, 153-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02598.x>.

Sanches, E. A., Marcos, R. M., Baggio, D. M., Tessaro, L., Balen, R. E., & Bombardelli, R. A. 2011. Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 1163-1167. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600001>

Sanches, E. A., Marcos, R. M., Okawara, R. Y., Caneppele, D., Bombardelli, R. A., & Romagosa, E. 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *Journal of Applied Ichthyology*, 29(5), 1114-1122. <http://dx.doi.org/10.1111/jai.12165>

Sanches, E. A., Caneppele, D., Okawara, R. Y., Damasceno, D. Z., Bombardelli, R. A., & Romagosa, E. 2016. Inseminating dose and water volume applied to the artificial fertilization of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877)(Siluriformes: Pimelodidae): Brazilian endangered fish. *Neotropical Ichthyology*, 14. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140158>

Sanchez, O. F., Lee, J., Yu King Hing, N., Kim, S. E., Freeman, J. L., & Yuan, C. 2017. Lead (Pb) exposure reduces global DNA methylation level by non-competitive inhibition and alteration of dnmt expression. *Metallomics*, 9(2), 149-160.

Sarnowski, P. 2004. The effects of metals on swimbladder inflation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries*, 7(1).

Sato, Y., Sampaio, E. V., Fenerich-Verani, N., & Verani, J. R. 2006. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23, 267-273. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752006000100021>

Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerker, K., Henseler, M., ... & Lichtensteiger, W. 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters—an update. *Toxicology*, 205(1-2), 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.043>

Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M., & Tsatsakis, A. M. (2015). Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental research*, 137, 246-255.

Shahjahan, M., Taslima, K., Rahman, M. S., Al-Emran, M., Alam, S. I., & Faggio, C. 2022. Effects of heavy metals on fish physiology—a review. *Chemosphere*, 300, 134519. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134519>

Silva, N. J. R., Lopes, M. C. Fernandes, J. B. K. and Henriques, M. B. 2011a. Caracterização dos sistemas de criação e da cadeia produtiva do lambari no estado de São Paulo, Brasil. *Informações Econômicas*, 41, 17–28.

Silva, N.J.R.; Lopes, M.C.; Gonçalves, F.H.A.S.B.; Gonsales, G.Z.; Henriques, M.B. 2011b. Avaliação do potencial do mercado consumidor de lambari da Baixada Santista.

Silva, M. L., & Andrade, M. C. K. 2017. Os impactos ambientais da atividade mineradora. *Meio Ambiente e Sustentabilidade*, 11(6).

Singh, P. B., Sahu, V., Singh, V., Nigam, S. K., & Singh, H. K. 2008. Sperm motility in the fishes of pesticide exposed and from polluted rivers of Gomti and Ganga of north India. *Food and chemical toxicology*, 46(12), 3764-3769. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.066>

Słominska, I. 1998. Sensitivity of early developmental stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to lead and copper toxicity (Doctoral dissertation, Ph. D Thesis, Institute of inland fisheries, Olsztyn, p 104 (In Polish)).

Soares, A. F. S., Diniz, P. S., & Silva, L. D. M. 2019. Valoração dos danos aos recursos hídricos decorrentes dos resíduos da barragem de mineração em brumadinho-mg. In II Congresso Sul-Americano De Resíduos Sólidos E Sustentabilidade. Foz do Iguaçu: IBEAS.

Stouthart, A. J. H. X., Spanings, F. A. T., Lock, R. A. C., & Bonga, S. W. 1994. Effects of low water pH on lead toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 30(2), 137-151.

Streit Jr, D. P., de Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Povh, J. A., de Souza, E. D., &

de Oliveira, C. A. L. 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, 7(2).

Streit Jr, D. P., Ribeiro, R. P., de MORAES, G. V., Mendez, L. V., Gallo, J. M., Digmayer, M., & Povh, J. A. 2006. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. Bioscience Journal, 22(3).

Streit, J., de Oliveira, A. C., Ribeiro, R. P., Sirol, R. N., de Moraes, G. V., Galo, J. M., & Digmayer, M. 2009. Motility, vigor and pathologies in fresh and cryopreserved semen of *Piaractus mesopotamicus*. Boletim do Instituto de Pesca, 35(2), 159-167.

Sumi, L. and Thomsen, S. 2001. Mining in Remote Areas, Issues and Impacts. MinindWatch Canada/Mines Alerte.

Sumpter, J. P. 1997. Environmental control of fish reproduction: a different perspective. Fish Physiology and Biochemistry, 17(1), 25-31.

Taslina, K., Al-Emran, M., Rahman, M. S., Hasan, J., Ferdous, Z., Rohani, M. F., & Shahjahan, M. 2022. Impacts of heavy metals on early development, growth and reproduction of fish—a review. Toxicology Reports. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.04.013>

Thomas, P., & Khan, I. A. 1997. Mechanisms of chemical interference with reproductive endocrine function in sciaenid fishes. Chemically induced alterations in functional development and reproduction in fishes, 29-51.

Van Look, K. J. W., & Kime, D. E. 2003. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. Journal of Fish Biology, 63(4), 1020-1033. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00226.x>

Vanzetto, G. V. 2014. A utilização de bioindicadores para avaliar o potencial mutagênico e citotóxico das águas do Rio Pirapó, região norte do Paraná, Brasil (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná).

Von Westernhagen, H. 1988. 4 sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In Fish physiology (Vol. 11, pp. 253-346). Academic Press.

Wang, R. F., Zhu, L. M., Zhang, J., An, X. P., Yang, Y. P., Song, M., & Zhang, L. 2020. Developmental toxicity of copper in marine medaka (*Oryzias melastigma*) embryos and larvae. Chemosphere, 247, 125923. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125923>

Welz, B., & Sperling, M. 2008. Atomic absorption spectrometry. John Wiley & Sons.

Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open-source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67(3), 661-672. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>

Witeck, L., Bombardelli, R. A., Sanches, E. A., Oliveira, J. D. S. D., Baggio, D. M., & Souza, B. E. D. 2011. Sperm motility, oocyte fertilization and egg hatching on jundiá catfish in cadmium contaminated water. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 477-481. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000300003>

Witeska, M. *et al.* The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of ide *Leuciscus idus* L. *Fish physiology and biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 151-163, 2014.

Witeska, M., Sarnowski, P., Ługowska, K., & Kowal, E. 2014. The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of ide *Leuciscus idus* L. *Fish physiology and biochemistry*, 40, 151-163.

Yamaguchi, S., Miura, C., Ito, A., Agusa, T., Iwata, H., Tanabe, S., ... & Miura, T. 2007. Effects of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organochlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at Mekong Delta area and in vitro experiment. *Aquatic toxicology*, 83(1), 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.010>

Yasui, G. S., Senhorini, J. A., Shimoda, E., Pereira-Santos, M., Nakaghi, L. S. O., Fujimoto, T., ... & Silva, L. A. 2015. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*, 9(3), 464-470. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002511>

Yasui, G.S.; Porto-Foresti, F.; Castilho-Almeida, R. B.; Senhorini, J.A.; Nascimento, N. F. and Foresti, F. 2020. Biologia e criação do Lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B. (Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 3.ed., rev., atual. e ampl. – Santa Maria: Ed. UFMS, pp. 113-126.

Yan, Z., Lu, G., Liu, J., & Jin, S. 2012. An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 334-340. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.010>

Zhang, H., Cao, H., Meng, Y., Jin, G., & Zhu, M. 2012. The toxicity of cadmium

(Cd²⁺) towards embryos and pro-larva of soldatov's catfish (*Silurus soldatovi*).
Ecotoxicology and environmental safety, 80, 258-265.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.013>

Zhang, Y., Guan, Y., Fan, X., Wu, L., & Wang, Z. 2018. Bisphenol A regulates rare minnow testicular vitellogenin expression via reducing its promoter Er recruitment.
Ecotoxicology and environmental safety, 147, 423-429.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.001>