



PPG / UEMA
Pró-Reitoria de Pesquisa e
Pós-Graduação



Programa de Pós-Graduação - Mestrado
Recursos Aquáticos e Pesca

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PPG
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – CECEN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA – DQB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA

RAYSSA DE LIMA CARDOSO

**ASPECTOS REPRODUTIVOS E BIOMARCADORES EM *Prochilodus lacustris*
(PISCES, PROCHILODONTIDAE) PARA AVALIAÇÃO DE IMPACTOS EM
UMA ÁREA PROTEGIDA DO MARANHÃO, BRASIL**

SÃO LUÍS – MA

2016

RAYSSA DE LIMA CARDOSO

**ASPECTOS REPRODUTIVOS E BIOMARCADORES EM *Prochilodus lacustris*
(PISCES, PROCHILODONTIDAE) PARA AVALIAÇÃO DE IMPACTOS EM
UMA ÁREA PROTEGIDA DO MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como requisito para obtenção do título de mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Área de Concentração: Recursos Pesqueiros.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Martins Silva Santos

SÃO LUÍS – MA

2016

Cardoso, Rayssa de Lima

Aspectos reprodutivos e biomarcadores em *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) para avaliação de impactos ambientais em uma área protegida do Maranhão e Brasil/ Rayssa de Lima Cardoso – São Luís, 2016. 99f

Dissertação – Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca PPGRAP, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientadora: Profª Debora Martins Silva Santos

1. Peixe neotropical. 2. Histopatologia. 3. Genotoxicidade. 4. Reprodução. I. Título.

CDU:616-022:597.3(812.1)

**ASPECTOS REPRODUTIVOS E BIOMARCADORES EM *Prochilodus lacustris*
(PISCES, PROCHILODONTIDAE) PARA AVALIAÇÃO DE IMPACTOS EM
UMA ÁREA PROTEGIDA DO MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como requisito para obtenção do título de mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Dra. Débora Martins Silva Santos (UEMA)

Orientadora

Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta (UEMA)

1º Examinador

Dr. Antonio Carlos Leal de Castro (UFMA)

2º Examinador

Dra. Zafira da Silva de Almeida (UEMA)

1º Suplente

“A água de boa qualidade é exatamente como a saúde ou a liberdade: só tem valor quando acaba”.

(Guimarães Rosa)

Dedico esse trabalho a todos que me incentivaram a ingressar na pós-graduação, e a todos que colaboraram para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa jornada muitos contribuíram, direta ou indiretamente na construção desse trabalho e desse ser humano que aqui escreve, e são a eles que agradeço imensamente:

À Deus, por ter me concedido a vida, por nunca desistir de mim, e por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, sempre me dando oportunidades para seguir adiante.

À minha Mãe, Iranilde Ferreira de Lima. Uma grande mulher, que com força, coragem e dedicação, conseguiu sozinha, criar e educar muito bem seus dois filhos. Mãe, obrigada pelo amor que sempre nos dedicou, e por sua luta diária contra os obstáculos da vida. Eu espero em Deus, que em breve eu consiga retribuir tudo o que fez (e faz) por mim e meu irmão. Muito obrigada Mãe!

A segunda mãe que Deus me deu, minha tia Tereza, mais conhecida como a minha Tetê, obrigada por seu apoio, seu carinho e seu grande amor, que é equivalente ao meu pela senhora. Obrigada Tetê!

Às minhas tias Moylene e Moyde, e as minhas primas Jessyka e Larissa, que tiveram papéis importantíssimos desde o meu nascimento, infância, adolescência e vida adulta. Sempre estando presentes nos momentos mais importantes e especiais da minha vida. Obrigada pelo amor, atenção e carinho! Obrigada pelos presentes que vocês trouxeram ao mundo, três rapazes lindos: Alexandre, Aquiles e João Pedro, que vieram para alegrar e abençoar mais a vida de todos nós.

Aos meus avós, Lourival Lima e Maria Araújo (*in memoriam*), que sempre me deram muito amor e transformaram inúmeros fins de semana, feriados e tantas outras datas comemorativas, em lembranças que irão me acompanhar por toda minha vida como um precioso tesouro. Não tem nada melhor que “a casa da vó”. Que saudade!

Ao meu pai, José Etevaldo Barbosa; à minha tia Eloisa e seu esposo Alcides que sempre foram atenciosos, amorosos e grandes incentivadores dos meus projetos de vida; à minha vó Maria Barbosa, por seu carinho e carisma; e a todos da família Cardoso.

Ao meu namorado, Pedro, por seu amor, atenção e companheirismo.

A minha orientadora, professora Débora Martins Silva Santos, pelo apoio, pela confiança depositada em mim, pelo carinho, colaboração, disposição e paciência. Professora, muito obrigada! Foi difícil ingressar nessa linha pesquisa, pois tudo era novo e nada tinha a ver com a minha formação acadêmica ou minhas experiências, porém a senhora sempre me incentivou e acreditou que daria certo, e hoje estamos aqui, na reta final. Muito obrigada por tudo mesmo!

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa Biologia e Ambiente Aquático (BIOAqua) e o Laboratório de Morfofisiologia Animal da Universidade Estadual do Maranhão, pela imprescindível ajuda em todas as etapas do trabalho, desde a separação do material de coleta, até as análises laboratoriais, obrigada! Obrigada pelas experiências e ensinamentos compartilhados, e por estarem sempre dispostos a me ajudarem de alguma forma. Deixo meu agradecimento especial à Natália Jovita, Geane Castro, Jonas Silva, Nayara Duarte, Sildiane Cantanhede, Dayane Pestana, Elielma, Janderson Bruzaca, Jucy, Luís Guilherme e Ana Luisa. Agradeço também ao Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (LABOAQ/UEMA), ao Laboratório de Pesca e Ecologia Aquática (LABPEA/UEMA), ao Laboratório de Química do Solo (UEMA), por todo o auxílio

científico, metodológico, técnico, laboratorial e administrativo provido por suas equipes (docentes e alunos).

Aos meus amigos de turma, que com o passar do tempo, passaram a ser mais que amigos, e tornaram-se irmão. Obrigada Cássia e Marcelo (meus irmãos desde a graduação), obrigada Jonatas Castro, Giulliana Lemos, Adriana Nascimento, Ticianne Mota, Gleison Campos, Draytianne Machado e Wagner Macêdo. Com vocês, eu compartilhei alegrias, experiências, tristezas, conquistas, risadas, momentos de estudos, viagens, reuniões e tudo mais que uma amizade pode proporcionar. Vocês todos têm um lugar especial no meu coração. Amo vocês demais! #ppgrap2015

A toda equipe do Laboratório de Informática da Universidade Federal do Maranhão, que é composta por pessoas excepcionais. Obrigada James Werllen, por ter paciência comigo e sempre está disposto a esclarecer minhas dúvidas estatísticas; obrigada Helen Roberta, você me ajudou com a formulação dos meus mapas (não só os da dissertação, mas vários outros), foi parceria em *CLA* e mostrou-se disposta a ajudar sempre que precisei, valeu amor!; obrigada Victor Lamarão, por sua alegria contagiante; obrigada Verônica, você é uma pessoa muito querida; obrigada Leonardo Soares, por ser a motivação em pessoa, conseguindo em determinados momentos nos incentivar e consequentemente, contribuir para o meu progresso (não esqueço que você me indicou os seletivos para mestrado e doutorado, muito obrigada!). Meu muito obrigada a esse grupo unido e perseverante nos seus objetivos.

Ao professor Antonio Carlos, os meus maiores e mais sinceros agradecimentos. Obrigada por sua confiança, “co-orientação” contínua, disponibilidade do seu projeto para realização da minha pesquisa de dissertação e pela paciência por todos esses anos. Registro aqui minha admiração por sua experiência e vivência acadêmica, além do seu lado humanista e sua obstinação em fazer com que as pessoas se esforcem e alcancem, brilhantemente, êxito em suas atividades. Muito obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca (PPGRAP/UEMA), pelos conhecimentos e experiências repassadas. Meu obrigada especial aos professores Raimunda Carvalho-Neta, Débora Santos, Zafira Almeida, Verônica Maria e Audálio Torres.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca (PPGRAP/UEMA) Hilanna e Fernanda, obrigada pelo apoio no decorrer do mestrado.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se avaliar a qualidade ambiental por meio de biomarcadores histológicos e genotóxicos, descrevendo aspectos relacionados à reprodução da espécie *Prochilodus lacustris* capturados no ecossistema lacustre Lago Açu, localizado na Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Estado do Maranhão. Os exemplares foram coletados no período de junho de 2015 a junho de 2016 utilizando redes de emalhar, com malhas variando de 5 a 7 cm entre nós adjacentes. Somente para a análise dos biomarcadores foram considerados três pontos de amostragem (S1, S2 e S3), onde foram coletados 98 espécimes, obtidos dados biométricos (peso e comprimento), retirados fragmentos de brânquias e fígado para verificação de alterações teciduais e a extração sanguínea para análise do teste do micronúcleo e alterações nucleares. Na elaboração do estudo dos aspectos reprodutivos de *P.lacustris*, utilizou-se 600 indivíduos que tiveram suas gônadas analisadas de maneira microscópica e macroscópica e determinação da amplitude de comprimento, proporção sexual, relação peso/comprimento e avaliação de indicadores biológicos, como a relação gonadossomática, relação hepatossomática, índice de repleção estomacal, fator de condição e época de desova da população. Em ambos os estudos, além da coleta dos peixes, também foram aferidas as variáveis abióticas: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, turbidez, condutividade elétrica, e amostras de água para análise microbiológica e concentrações de metais pesados. Com a de analisar a existência ou não de diferenças espaciais e sazonais entre as variáveis ambientais e as variáveis biológicas coletadas, testou-se a normalidade e homogeneidade das variâncias dos dados, com aplicação da estatística adequada. Os resultados obtidos a partir da análise dos biomarcadores evidenciaram que as alterações branquiais identificadas foram: congestão vascular, hiperplasia do epitélio lamelar, levantamento do epitélio lamelar, desorganização da lamela secundária, fusão incompleta de várias lamelas secundárias, fusão completa de várias lamelas secundárias, dilatação do seio venoso, presença de parasito, hiperplasia e hipertrofia das células de muco, fusão completa de todas as lamelas e aneurisma lamelar. No tecido hepático foram identificadas as lesões dos tipos: núcleo na periferia da célula, vacuolização, hiperemia, centro de melanomacrófagos e necrose. A frequência de micronúcleo foi menor nos exemplares coletados na área S1 durante o período de estiagem, com a ocorrência de todos os tipos de alterações morfológicas celulares, sendo que a do tipo “notched” foi a que se apresentou em maior quantidade. Os dados demonstraram que as respostas biológicas observadas em *P. lacustris*, em nível tecidual e molecular, indicam que os peixes estão sob influência direta das alterações ambientais, sendo que os peixes da estação S3 apresentaram um estado de sanidade mais comprometido, demonstrando que essa estação de amostragem se encontra em um estado de vulnerabilidade ambiental. Os resultados do estudo das características reprodutivas de *P.lacustris* apontaram predomínio de fêmeas em relação aos machos, crescimento do tipo alométrico negativo ($b < 3$) e o ciclo reprodutivo ocorrendo entre novembro e janeiro, com pico reprodutivo no mês de janeiro, sendo a desova da espécie sendo caracterizada como do tipo periódica. Por meio da análise de correspondência canônica e de regressão múltipla, identificou-se uma associação entre os valores da relação gonadossomática de ambos os sexos e os parâmetros, condutividade elétrica e precipitação pluviométrica, evidenciando que a reprodução da espécie investigada é conduzida a partir das relações estabelecidas com as variáveis ambientais, principalmente durante o período chuvoso da região.

Palavras-chave: Peixe Neotropical, Histopatologia, Genotoxicidade, Reprodução.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the environmental quality by means of histological and genotoxic biomarkers, describing aspects related to the reproduction of the species *Prochilodus lacustris* captured in Lago Açú lake ecosystem, located in the Environmental Protection Area of Baixada Maranhense, State of Maranhão. The specimens were collected from June 2015 to June 2016 using gillnets, with meshes varying from 5 to 7 cm between adjacent nodes. For the analysis of the biomarkers, three sampling points (S1, S2 and S3) were used, where 98 specimens were collected, biometric data (weight and length) were obtained, fragments of gills and liver were collected to verify tissue changes and blood extraction for analysis of the micronucleus test and nuclear alterations. In the elaboration of the study of the reproductive aspects of *P.lacustris*, we used 600 individuals who had their gonads analyzed microscopically and macroscopically and determined the length range, sexual ratio, weight / length ratio and evaluation of biological indicators, such as the gonadosomatic relationship, hepatosomatic relationship, stomach repletion index, condition factor and spawning season. In both studies, besides the fish collection, the abiotic variables were also measured: temperature, pH, dissolved oxygen, turbidity, electrical conductivity, and water samples for microbiological analysis and concentrations of heavy metals. For the purpose to analyze the existence or not of spatial and seasonal differences between the environmental variables and the biological variables collected, the normality and homogeneity of the data variances were tested, with adequate statistical application. The results obtained from the biomarker analysis showed that the gill alterations were: vascular congestion, lamellar epithelium hyperplasia, lamellar epithelium removal, lamella secondary disorganization, incomplete fusion of several secondary lamellae, complete fusion of several secondary lamellae, dilatation Venous sinus, presence of parasite, hyperplasia and hypertrophy of mucus cells, complete fusion of all lamellae, and lamellar aneurysm. In the hepatic tissue the lesions of the types were identified: nucleus in the periphery of the cell, vacuolization, hyperemia, center of melanomacrophages and necrosis. The micronucleus frequency was lower in the specimens collected in the S1 area during the dry season, with the occurrence of all types of cellular morphological alterations, and the "notched" type was the one that presented the highest amount. The data demonstrated that the biological responses observed in *P. lacustris* at the tissue and molecular level indicate that the fish are under direct influence of the environmental changes, and the fish of the S3 season presented a more compromised sanity state, demonstrating that this season is in a state of environmental vulnerability. The results of the study of the *P.lacustris* reproductive traits showed a predominance of females in relation to males, negative allometric growth ($b < 3$) and reproductive cycle occurring between November and January, with a reproductive peak in January. Of the species being characterized as of the periodic type. By means of canonical correspondence and multiple regression analysis, we identified an association between the values of the gonadosomatic relationship of both sexes and the parameters, electrical conductivity and pluviometric precipitation, showing that the reproduction of the investigated species is conducted from the relations established with the environmental variables, mainly during the rainy period of the region.

Keywords: Neotropical Fish, Histopathology, Genotoxicity, Reproduction.

LISTA DE FIGURAS

(GERAL)

Figura 4-1. Localização do município de Conceição do Lago Açu com destaque para o corpo hídrico em estudo (Lago Açu), Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.....	21
Figura 4-2. Pontos de coleta dos exemplares de <i>Prochilodus lacustris</i> no Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.	22
Figura 4-3. Locais de amostragem no Lago Açu: (A) Estação S3, (B) Estação S2 e (C) Estação S1, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.	23
Figura 4-4. Exemplar de <i>Prochilodus lacustris</i> (Steindachner, 1907) coletado no Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.....	24
Figura 4-5. Coleta dos órgãos fígado e brânquia em espécimes de <i>Prochilodus lacustris</i> coletados no Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.	25
Figura 4-6. Coleta <i>in situ</i> dos parâmetros abióticos da água do Lago Açu, por meio do aparelho multiparâmetros HANNA HI 9828, e amostras para análises em laboratório.	311

LISTA DE FIGURAS

(CAPÍTULO I)

Figura 1. Pontos de coleta dos exemplares de <i>Prochilodus lacustris</i> no Lago Açú, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão – Brasil.....	35
Figura 2. Frequência de micronúcleos em eritrócitos do <i>Prochilodus lacustris</i> coletados em Lago Açú, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.....	37
Figura 3. Filamentos branquiais da espécie <i>Prochilodus lacustris</i>	39
Figura 4. Fragmentos do tecido hepático da espécie <i>Prochilodus lacustris</i>	40

LISTA DE FIGURAS

(CAPÍTULO II)

Figura 1. Location of the municipality of Conceição do Lago Açu, with emphasis on the water body under study (Açu Lake), Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense, Maranhão - Brazil.	59
Figura 2. Average values of the Gonadosomatic (GSI) and Condition factor (K) biological indexes in <i>P. lacustris</i> females.	61
Figura 3. Average values of the Hepatosomatic (HI) and Stomach Repletion (SRI) biological indexes in <i>P. lacustris</i> females..	62
Figura 4. Average values of the Gonadosomatic (GSI) and Condition factor (K) biological indexes in <i>P. lacustris</i> males.	62
Figura 5. Average values of the Hepatosomatic (HI) and Stomach Repletion (SRI) biological indexes in <i>P. lacustris</i> males.	63
Figura 6. Relative frequency (%) of gonadal maturity stages in females of <i>P. lacustris</i> . GS1-GS4	63
Figura 7. Relative frequency (%) of gonadal maturity stages in males of <i>P. lacustris</i> . GS1-GS4	64
Figura 8. Photomicrography of ovaries during the gonadal cycle in <i>Prochilodus lacustris</i> collected at the Açu Lake, in the Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense, MA - Brazil.	64
Figura 9. Photomicrograph of testicles during the gonadal cycle in <i>Prochilodus lacustris</i> collected at the Açu Lake, in the Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense, MA - Brazil.	65
Figura 10. Scatter diagram for the canonical correspondence analysis between the biological indexes and physical-chemical characteristics of the Açu Lake, MA, Brazil.....	66

LISTA DE TABELAS**(GERAL)**

Tabela 4-1. Alterações histológicas observadas nas brânquias e fígados de *Prochilodus lacustris* do Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil. A classificação é de acordo com Poleksic & Mitrovic-Tutundzic modificado (1994), com 3 estágios de gravidade (I, II e III)..... 25-26

Tabela 4-2. Características para determinação dos estágios macro e microscópios das gônadas femininas de *Prochilodus lacustris*. I: Fase de cromatina nucléolos; II: ovócitos de estoque de reserva; III: ovócitos em vitelogênese lipídica; IV: ovócitos com vitelogênese lipídica e proteica; V: ovócito com vitelogênese completa; LO: lamelas ovígera; FV: folículo vazio; FA: folículo atrésico; CF: corpos foliculares. 27

LISTA DE TABELAS**(CAPÍTULO I)**

Tabela 1. Média e Desvio Padrão (\pm) dos dados biométricos e percentual dos estágios de maturação gonadal de machos e fêmeas de <i>Prochilodus lacustris</i> , coletados em Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.....	37
Tabela 2. Anormalidades nucleares e formação de micronúcleos registrados em eritrócitos do <i>Prochilodus lacustris</i> coletados em Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.....	38
Tabela 3. Frequência de alterações branquiais encontradas nos exemplares de <i>Prochilodus lacustris</i> coletados em Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.....	38- 39
Tabela 4. Frequência de alterações no tecido hepático encontradas nos exemplares de <i>Prochilodus lacustris</i> coletados em Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.	40
Tabela 5. Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos e biológicos monitorados no Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.	41-42

LISTA DE TABELAS**(CAPÍTULO II)**

Tabela 1. Monthly sex ratio of <i>P. lacustris</i> males and females	60-61
Tabela 2. Monthly values of environmental parameters: electrical conductivity, dissolved oxygen concentration, surface temperature, rainfall, and pH	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
	Objetivo Geral	14
	Objetivos Específicos	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
	Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense	15
	<i>Prochilodus lacustris</i> : espécie bioindicadora	16
	Biomarcadores	17
	Aspectos Reprodutivos	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
	Área de estudo	20
	Determinação da coleta de espécimes	21
	Pontos de coletas na área de estudos	21
	Espécie Estudada	23
	Biomarcadores	24
	Genotóxico: Teste do Micronúcleo e Anormalidades Nucleares	24
	Histológicos: Análise das Lesões Branquiais e Hepáticas	24
	Aspectos Reprodutivos	26
	Variáveis abióticas e análise bacteriológica	30
	Tratamento Estatístico	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
	5.1. Biomarcadores histológicos e genotóxicos em <i>Prochilodus lacustris</i> (Pisces, Prochilodontidae) para avaliação ambiental de uma Área Protegida no Nordeste do Brasil	33
	5.2. Ciclo reprodutivo da espécie <i>Prochilodus lacustris</i> (Pisces, Prochilodontidae) em uma zona úmida de interesse internacional, Nordeste do Brasil Erro! Indicador não definido.	
6	CONCLUSÃO	77
7	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são os principais corpos receptores das descargas antropogênicas, que constituídas de poluentes e inúmeras substâncias xenobióticas, podem gerar efeitos deletérios tanto para os seres humanos, quanto para toda biota aquática (MCGLASHAN; HUGHIES, 2001). Como os mecanismos de degradação ambiental são geralmente complexos e difíceis de mensurar, existe uma tendência mundial de complementar os resultados advindos das variáveis físicas e químicas, tais como pH, oxigênio dissolvido e temperatura, com a utilização de organismos vivos que sirvam como sensores biológicos (FRIBERG et al., 2011).

Inseridos na biota e abundantes nos ecossistemas aquáticos, os peixes vêm sendo descritos como excelentes modelos biológicos em estudos de biomonitoramento (LIONETTO et al., 2013; FERNANDES, 2005; VAN DER OOST et al., 2003). Uma vez que o grupo ocupa diferentes níveis tróficos na cadeia alimentar e bioacumula os contaminantes dissolvidos na água, pode caracterizar-se como veículos de transferência de contaminantes para as populações humanas por meio da alimentação, além de apresentar um sistema imunológico bem desenvolvido, semelhante ao dos mamíferos, fazendo com que o grupo apresente variadas “respostas” à exposição de xenobióticos. (JESUS; CARVALHO, 2008; SOUZA; FONTANETTI, 2007; LOPES-POLEZA, 2004).

Com isso, as respostas biológicas apresentadas por esses organismos podem ser identificadas, classificadas e até mesmo, quantificadas. E normalmente são denominadas de “biomarcadores”, termo caracterizado como: “alterações ou reações que variam em nível celular, molecular, fisiológico, ou ainda comportamental” (VAN DER OOST, 2003; FOSSI; LEONZIO; 1993). O uso combinado de um conjunto de biomarcadores pode indicar exposição a contaminantes e ajudar na avaliação dos impactos sobre os organismos vivos, fornecendo uma avaliação mais abrangente e integradora dos efeitos causados pelo contato com xenobióticos ambientais (CAZENAVE et al., 2009). Conseqüentemente, a utilização de biomarcadores gera considerável interesse em pesquisas, e tem sido constantemente aplicada em estudos de campo e laboratório (LAM et al., 1995).

Nesse contexto, estudos de biomarcadores genotóxicos e histológicos em peixes estão sendo usados como indicadores das condições ambientais do ecossistema. As abordagens histológicas, em órgãos-alvo como brânquias e fígados, provaram ser uma

alternativa viável para detectar efeitos tóxicos diretos dos compostos químicos durante as etapas orgânicas e metabólicas nos organismos (COSTA et al., 2011; YASSER; NASER, 2011; COSTA et al., 2009; LEONARDI; TARIFEÑO; VERA, 2009; AYAS et al., 2007; CAMARGO; MATINEZ, 2007; AU, 2004; SCHWAIGER et al., 1997). E os biomarcadores de genotóxicos, por meio da presença de alterações nucleares e o teste de micronúcleos, transmitem informações na escala celular, onde “erros” durante as divisões cromossômicas podem ser indicativos de impactos antrópicos (SERIANI et al., 2015; CARROLA et al., 2014; BUCKER et al., 2012; SERIANI et al., 2012; KIRSCHBAUM et al., 2009; OSSANA et al., 2009).

Vale ressaltar que o conhecimento da biologia das espécies, principalmente no que se refere aos aspectos reprodutivos, também é um meio para a formulação de dados para diagnósticos ambientais (BAGGERMAN, 1990). As diversas informações obtidas com a análise da biologia reprodutiva básica dos peixes, como fator de condição, proporção sexual, índices reprodutivos e época de desova são consideradas importantes para medidas de conservação das espécies (PEREIRA et al., 2006), uma vez que o sucesso reprodutivo das espécies depende de uma série de variáveis físicas e químicas do meio, no qual o organismo está inserido (COSSINS; CRAWFORD, 2005).

Quanto à escolha do táxon bioindicador, neste trabalho levou-se em consideração a importância ecológica e econômica da espécie *Prochilodus lacustris* (Steindachner, 1907). A espécie é conhecida popularmente como curimatá, curimbã ou curimatã, é um recurso pesqueiro fortemente capturado na pesca extrativa continental brasileira (MPA, 2011) e tem uma significativa importância ecológica, uma vez que é endêmica das bacias hidrográficas maranhenses Parnaíba, Mearim e Tocantins (PIORSKI et al., 2010; 2007). Em termos biológicos, *Prochilodus lacustris* realiza migrações diárias por extensas distâncias, consegue transpor obstáculos naturais e seu hábito detritívoro o configura como um elemento importante na estrutura ecológica das comunidades neotônicas tropicais, por meio do processamento dos insumos orgânicos presentes na coluna da água, na vegetação e no sedimento (GODINHO; KYNARD, 2006; FLECKER, 1996; BOWEN, 1983; GOULDING, 1981; GODOY, 1975).

A seleção da área de estudo foi determinada pela importância ambiental no cenário regional, pois, além de estar inserida no Estado do Maranhão, mais precisamente na mesorregião do estado, sendo denominada de Baixada Maranhense, esta região é designada pelo governo estadual como área ambientalmente protegida. A Baixada

Maranhense também é considerada, no âmbito da Convenção de Ramsar, como zona úmida de importância internacional, devido a diversidade da fauna e flora, a ocorrência de espécies raras de aves migratórias, que utilizam a região para repouso, forrageio e reprodução, e um padrão de cheias de seus corpos hídricos (MATTHEWS, 1993).

Com isso, o presente estudo faz-se importante com a produção de informações sobre a biologia reprodutiva da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lacustris*, e a utilização dessa espécie como bioindicadora na APA da Baixada Maranhense.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a qualidade ambiental por meio de biomarcadores histológicos e genotóxicos, assim como, os aspectos relacionados à reprodução da espécie *Prochilodus lacustris* capturados no ecossistema lacustre Lago Açu, localizado no município de Conceição do Lago Açu, Estado do Maranhão.

Objetivos Específicos

- Estimar parâmetros biométricos e reprodutivos da espécie *Prochilodus lacustris* capturados em Lago Açu;
- Quantificar as alterações histológicas em brânquias e fígados dos espécimes;
- Determinar a frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares nos eritrócitos píceos;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense

A Baixada Maranhense está localizada na mesorregião norte do estado do Maranhão, com características transicionais da Amazônia e do Nordeste brasileiro, com influência de ambientes fluviais, costeiros e marinhos (SILVA; MOURA, 2004). A região é composta por um significativo contingente populacional de 563.895 habitantes que se distribuem nos 21 municípios maranhenses da baixada: Anajatuba, Conceição do Lago-Açu, Presidente Sarney, Arari, Cajari, Pedro do Rosário, Matinha, Monção, São João Batista, Olinda Nova do Maranhão, Palmeirândia, Igarapé do Meio, Penalva, Bela Vista do Maranhão, Perimirim, Pinheiro, São Vicente Ferrer, Santa Helena, São Bento, Viana e Vitória do Mearim (IBGE, 2015).

Uma vez que a população da Baixada ainda apresenta características socioeconômicas rurais, apesar de que uma porção dos habitantes já viver nos núcleos urbanos municipais, e essa condição relaciona-se mais com o modo de vida das pessoas, do que propriamente com o local de habitação, uma vez que, mesmo vivendo nas cidades, os moradores ainda praticam atividades como a pesca, a agricultura e a pecuária, em modos de subsistência ou de pequena comercialização (LAFONTAINE, 2011).

Ambientalmente, a Baixada é constituída por um complexo conjunto ecológico de rios, campos, estuários, agroecossistemas, manguezais, babaçuais, e um dos maiores conjuntos de bacias hidrográficas do nordeste brasileiro, composta pelos rios Mearim, Pindaré, Grajaú, Pericumã, Turiaçu e outros menores, que acolhe uma flora e fauna silvestre bastante representativa (NOGUEIRA, 2003). A microrregião também possui um regime hidrológico peculiar, com precipitação anual variando em torno de 2000 mm. O que define um período seco de 6-7 meses, dos quais 3-4 meses podem ser considerados muito secos; e um período chuvoso de 5-6 meses com pelo menos dois muito chuvosos com mais de 40% da precipitação total (SILVA; MOURA, 2004). Essa dinâmica ocasiona o transbordamento de rios e lagos copiosos que alagam os campos e transforma-os em amplos lagos de pouca profundidade (COSTA NETO, 1990).

Devido ao mosaico de ambientes, a complexidade biológica e a ocorrência de um acelerado e recorrente processo de interferência humana na região, a Baixada Maranhense é bastante vulnerável. Diante disso, medidas legais surgiram como instrumentos para impedirem a velocidade e a extensão das mudanças ecossistêmicas, a exemplo, as

unidades de conservação e as áreas de proteção ambiental (APA). A Baixada Maranhense foi transformada em Área de Proteção Ambiental, por meio do Decreto Estadual nº 11.900, de 11 de junho de 1991, e é protegida internacionalmente pela Convenção sobre Zonas Úmidas de Importância Internacional (Convenção de Ramsar) em face às numerosas espécies de aves migratórias, que utilizam a região como ponto de descanso, alimentação e reprodução.

A importância ecológica e social da APA da Baixada Maranhense evidencia a importância de pesquisas nessa região, ainda mais, no que tange a monitoramentos ambientais que avaliem o estado de conservação dos principais corpos hídricos do Estado, especialmente com metodologias que utilizam espécies bioindicadoras.

3.2 *Prochilodus lacustris*: espécie bioindicadora

As comunidades biológicas refletem a integridade ecológica dos ambientes, respondendo às alterações do meio e fornecendo assim, uma ideia de um impacto, ou de um conjunto de alterações em um determinado ecossistema (BARBOUR et al., 1999). No ambiente aquático, os organismos já apresentam adequações específicas para as condições do meio, pois passaram por todo um processo evolutivo que garantiu a existência e perpetuação das espécies nesse ambiente (LOWE-MCCONNELL, 1999; HILSDORF; PETRERE, 2002). Por isso, os organismos são sensíveis, e apresentam respostas a qualquer modificação estrutural, química ou física da água, de ordem antrópica ou não (ALBA-TERCEDOR, 1996). Dentre os inúmeros seres que habitam os ambientes aquáticos, os peixes vêm sendo apontados como bons indicadores do estado ambiental (FREITAS, 2009; SCHULZ; MARTINS-JUNIOR, 2001).

A ictiofauna reúne atributos que os caracterizam como excelentes modelos biológicos para estudos de biomonitoramento (RAMISDORF, 2007; BENINCÁ, 2006; MORON et al., 2006; PANTALEÃO; ALCANTARA; ALVES; SPANO, 2006; LOPES-POLEZA, 2004; D'AMATO, 1995). Os peixes têm a capacidade de responder à exposição de elementos tóxicos, participam de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar e são capazes de bioacumular de forma direta os contaminantes dissolvidos na água (JESUS; CARVALHO, 2008; SOUZA; FONTANETTI, 2007). Servindo assim como bioindicadores das modificações das condições ambientais originais.

A determinação da espécie bioindicadora deve levar em consideração a sua abundância, sua distribuição espacial, importância biológica, entre outras características

(AKAISHI, 2004; ADAMS, 2002). Sendo assim, a família escolhida foi a Prochilodontidae, que se encontra distribuída por toda América do Sul, sendo amplamente encontrada nas principais bacias hidrográficas brasileiras e constituindo-se como uma das famílias mais importantes para a pesca de água doce comercial e artesanal da região neotropical (CASTRO et al., 2003).

A família abriga 21 espécies divididas em três gêneros: *Prochilodus* (Agassiz, 1829), *Semaprochilodus* (Fowler, 1941), e *Ichthyoelephas* (Posada Arango, 1909), que podem ser facilmente distinguidos dos outros Characiformes através de um conjunto distinto de caracteres morfológicos como a presença de lábios carnudos, duas séries de minúsculos dentes falciformes ou espatulados e maxilas superiores e inferiores que se estendem e projetam-se externamente para raspar o perifíton e detritos da coluna da água, das plantas aquáticas e também, para sugar os detritos do fundo dos corpos d'água (CASTRO E VARI, 2004). Devido a essas características morfológicas, os prochilodontídeos acabam formando uma ligação importante no fluxo de energia dentro dos sistemas tróficos aquáticos (TAYLOR; FLECKER; HALL JUNIOR, 2006).

Dentre os gêneros descritos anteriormente, o *Prochilodus* se destaca como o mais rico em número de espécies descritas, com 13 no total, sendo seus espécimes denominados popularmente como curimbãs, curimatãs, sábalos e curimatás (BOWEN, 1983; FLECKER, 1996). Na porção norte brasileira, mais precisamente no estado do Maranhão, os *Prochilodus* apresentam alta abundância na rede hidrográfica do Estado e se caracterizam como um gênero importante no aspecto econômico e ecológico. Com destaque para a espécie *Prochilodus lacustris* (Steindachner, 1907) que é endêmica nas bacias maranhenses dos rios Parnaíba, Mearim e Tocantins (PIORSKI et al, 2007; 2010).

O táxon escolhido é uma espécie-chave na formulação de avaliações de impactos e contaminação aquática local, uma vez que as respostas biológicas apresentadas por esses organismos podem indicar a presença ou o efeito dos contaminantes nos corpos hídricos maranhenses, e esses impactos podem vir a desestruturar significativamente a composição da fauna aquática regional e neotropical (TAYLOR; FLECKER; HALL JUNIOR, 2006; RIBEIRO; PETRERE JUNIOR, 1990).

3.3 Biomarcadores

As análises físico-químicas são vantajosas por expressarem seus resultados de forma específica e quantitativa. Porém, as concentrações dos elementos químicos

mensurados no solo, na água ou no ar, não representam um “valor” biológico, ou seja, não sugerem quais são as implicações na biota (OLIVEIRA, 2000). A fim de contornar essa lacuna, são utilizados outros parâmetros como indicadores biológicos, como os biomarcadores.

Os biomarcadores são respostas funcionais de exposição a fatores de estresse manifestados em nível molecular, fisiológico ou comportamental, que geram alterações moleculares, celulares, genéticas, imunológicas e fisiológicas (LEONZIO; FOSSI, 1993; JESUS; CARVALHO, 2008). O uso dos biomarcadores é de fundamental importância na avaliação dos danos ocasionados pela exposição a xenobióticos.

Os biomarcadores podem ser utilizados em monitoramentos ambientais para indicar a presença de determinado composto químico, sua relação de exposição com uma determinada espécie ou uma população, além de quantificar o risco de poluição, quando houver dados de referências acerca da concentração do poluente (ALBA-TERCEDOR, 1996; WHITFIELD, 2001). A importância dos biomarcadores enquanto parâmetro biológico se diferencia dos dados abióticos, uma vez que eles refletem diretamente os efeitos na saúde dos organismos, e não somente nas características ambientais, assim, podem fornecer uma melhor estimativa dos riscos ecológicos (BARBOUR et al., 1999).

Quando um xenobiótico entra no organismo, no caso dos peixes, determinados órgãos são os principais alvos, dentre eles as brânquias, o fígado e o rim, pois são órgãos relacionados a atividades vitais de respiração e metabolização, apresentando os efeitos da poluição na forma de alterações histológicas (ADAMS et al, 1992). As brânquias estão diretamente expostas aos compostos químicos presentes na água, uma vez que desenvolvem variadas funções: trocas gasosas, osmorregulação, balanço ácido-básico e excreção de nitrogênio (HEATH, 1987).

Os arcos branquiais são complexas estruturas constituídas por lamelas, densamente enfileiradas, revestidas por um extenso e fino epitélio que proporciona uma grande área superficial para a entrada e saída do oxigênio, dióxido de carbono, eletrólitos, água, amônia e íons hidrogênio, entre o sangue e a água (MARTINEZ; CÓLUS, 2002). Devido ao contato permanente com o ambiente aquático, as brânquias podem reagir aos agentes estressores presentes no ambiente e apresentarem alterações em sua estrutura. O que servem como indicativos de degradação e podem ser empregadas em monitoramento ambiental (MEYERS; HENDRICKS, 1985; SCHWAIGER et al., 1997).

O fígado dos peixes é um dos órgãos responsável por diversas funções metabólicas, entre elas o processamento de compostos orgânicos e inorgânico. Este órgão é sensível para mostrar alterações bioquímicas, fisiológicas e estruturais (HEATH, 1987; HINTON; COUCH, 1998). Alguns parâmetros hepáticos, tais como alterações histológicas e depleção de glicogênio, têm sido utilizados como biomarcadores de contaminação aquática (HINTON et al., 1992) em programas de biomonitoramento (SCHWAIGER et al., 1997).

Assim, alterações bioquímicas, comportamentais ou nas estruturas dos órgãos podem ser biomarcadores, fornecendo importantes informações a respeito da capacidade de defesa dos organismos, bem como a capacidade de metabolização de compostos tóxicos do meio. Por isso, é importante que seja feita uma análise conjunta desses indicadores para melhor interpretação dos resultados.

3.4 Aspectos Reprodutivos

Os teleósteos obtiveram sucesso ecológico em ambientes distintos por apresentarem diversas estratégias biológicas, principalmente quanto ao aspecto reprodutivo, uma vez que conseguem alocar energia, e transformá-la de modo a garantir o sucesso reprodutivo de toda uma população (VAZZOLER, 1996). Há uma variedade de aspectos importantes referentes à biologia básica das espécies, como a identificação de dimorfismo sexual, determinação da fecundidade, identificação do tipo e época de desova, análise do tamanho da primeira maturação gonadal, opções de migração reprodutiva, entre outras (PEREIRA et al., 2006). Trabalhos que abordam tais aspectos são de grande importância por fornecerem conhecimentos básicos e fundamentais sobre o desenvolvimento das espécies.

A reprodução também assegura a preservação e a abundância das espécies, além do seu conhecimento ser de fundamental importância para proteção de estoques naturais, para o desenvolvimento de técnicas para o cultivo e os indicadores quantitativos (fator de condição, comprimento de primeira maturação gonadal) geram um melhor entendimento ecológico do papel desempenhado pelas espécies em determinado ambiente (GODINHO, 2007; ROCHA, 2010; VIEIRA et al., 1999; LEÃO et al., 1991; SANTOS, 1982).

As estruturas morfofisiológicas que ajudam no processo reprodutivo, como por exemplo, as gônadas, são estruturas de células germinativas e elementos somáticos que se desenvolvem no sentido de produzir gametas férteis (ovos e líquido espermático) e são

necessárias para a reprodução ser completa (HOAR et al., 1983). Através da inspeção das gônadas, com análise da variação em peso e morfologia, temos indicativos do ciclo reprodutivo (VAZZOLER, 1996). O peso das gônadas é frequentemente utilizado na formulação da relação gonadossomática (RGS), um bom indicativo das fases de desenvolvimento gonadal. Elevações nos valores da Relação Gonadossomática estão associadas à maturação, e os valores em decréscimo podem indicar a eliminação ou os primeiros estágios de maturação (AGOSTINHO et al., 1990).

Como o processo de desenvolvimento gonadal é contínuo e cíclico, além das gônadas, outros indicadores podem ser utilizados para o entendimento do processo reprodutivo, como os aspectos referentes à alimentação, modificações nas reservas energéticas depositadas em diversas partes do organismo, como o fígado, e estimativas do peso médio dos peixes também ajudam na avaliação do índice de bem-estar das populações de peixes (AGOSTINHO et al. 1990; VAZZOLER, 1996).

O período reprodutivo também é um produto de vários fatores bióticos e abióticos, como a temperatura, oxigênio dissolvido, nível da coluna da água, que estimulam a maturação das gônadas, o final da maturação e a ovulação (WINEMILLER, 1989; STACEY, 1984). Para Isaac-Nahum e Vazzoler (1983) os fatores ambientais, têm efeito sobre a fisiologia do ciclo reprodutivo, delimitando, qual o período de produção de ovócitos e de desova.

Assim, levando-se em conta o endemismo da espécie *Prochilodus lacustris* no estado do Maranhão e a necessidade de conhecimento acerca dos recursos pesqueiros da Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, a análise de indicadores biológicos vinculados ao processo reprodutivo dessas espécies, aliado às variáveis ambientais do ambiente e possível associação entre esses parâmetros, são de suma importância para a produção de informações científicas de alta relevância, além de constituírem subsídios básicos para a compreensão da dinâmica das comunidades, conservação do ambiente através de planos de manejo e monitoramento mais abrangentes.

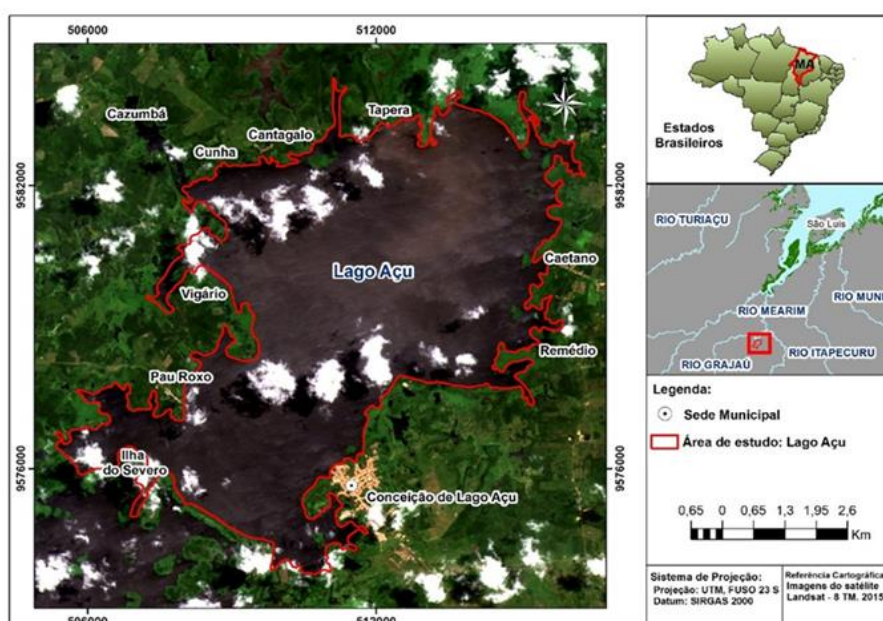
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O município de Conceição do Lago Açu localiza-se na região ocidental central do Maranhão, na costa norte do Brasil, entre as coordenadas geográficas 03°40'00" e 04°59'00"S e 44°39'00" a 45°03'00"W, e tem o Lago Açu como principal corpo hídrico

(Figura 4-1). O Lago Açu abrange uma área de 52 km², sendo a principal fonte de recursos naturais para a população de 15.782 habitantes que o utiliza para pesca, navegação e recreação (IBGE, 2010). O lago é formado pelo transbordamento do rio Grajaú, grande afluente da rede hidrográfica maranhense e a região apresenta um padrão climático com precipitações que ocorrem em duas estações temporalmente definidas: o período chuvoso abrange os meses entre janeiro e julho e o de estiagem entre agosto e dezembro (INMET, 2016).

Figura 4-1. Localização do município de Conceição do Lago Açu com destaque para o corpo hídrico em estudo (Lago Açu), Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.



4.2 Determinação da coleta de espécimes

As coletas de dados ocorreram de agosto de 2015 a julho de 2016 em campanhas mensais para o estudo dos aspectos reprodutivos da espécie, e em campanhas bimestrais para análise dos biomarcadores histológicos e genotóxicos.

4.3 Pontos de coletas na área de estudos

Para o estudo dos biomarcadores se estabeleceu critérios na espacialidade das estações de coleta, levando em consideração a posição do ponto amostral em relação ao distrito municipal, sendo escolhidos três locais de amostragem (S1, S2 e S3) como ilustra a Figura 4-2. A estação S1 é a estação de referência, pois, é a mais afastada da influência antropogênica; a estação S2 configura-se como uma estação transicional e localiza-se no meio do corpo hídrico; e por fim, S3 está sob influência direta da ocupação urbana, lançamento de esgoto doméstico e descarte “in natura” de peixes e mariscos oriundos da

comercialização pesqueira na margem do lago, apresentando assim, um maior potencial de contaminação (Figura 4.2).

Vale destacar, que o município não aloca indústrias químicas em seu território. A localização das três estações (**S1**: Lat: 513.790,288984; 9.582.655,62598; **S2**: Lat: 511.717,525679; Long: 9.579.650,89142, e **S3**: Lat: 511.099,927607; Long: 9.576.359,73726) foi georreferenciada por GPS (Global Position System) em todas as expedições a campo.

Figura 4-2. Pontos de coleta dos exemplares de *Prochilodus lacustris* no Lago Açú, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.

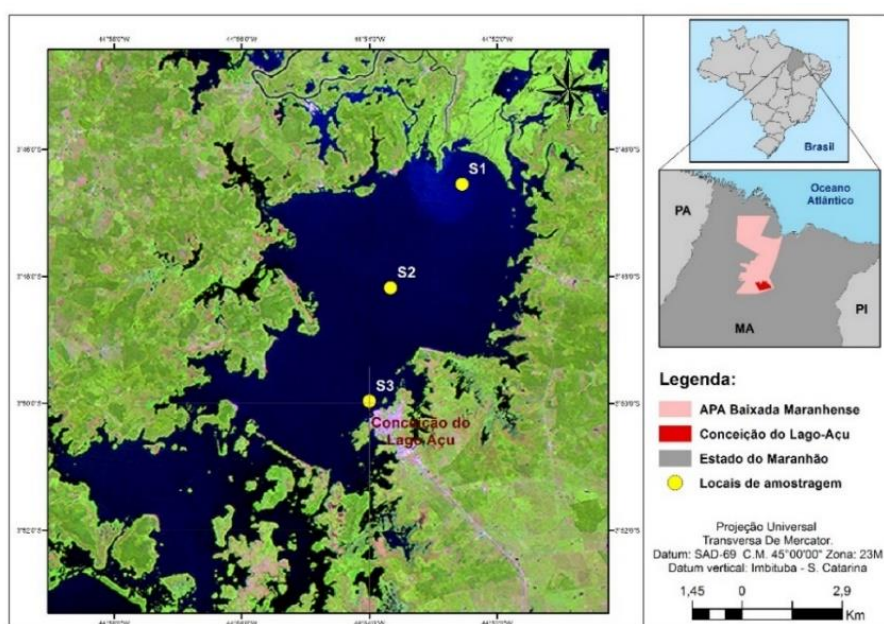
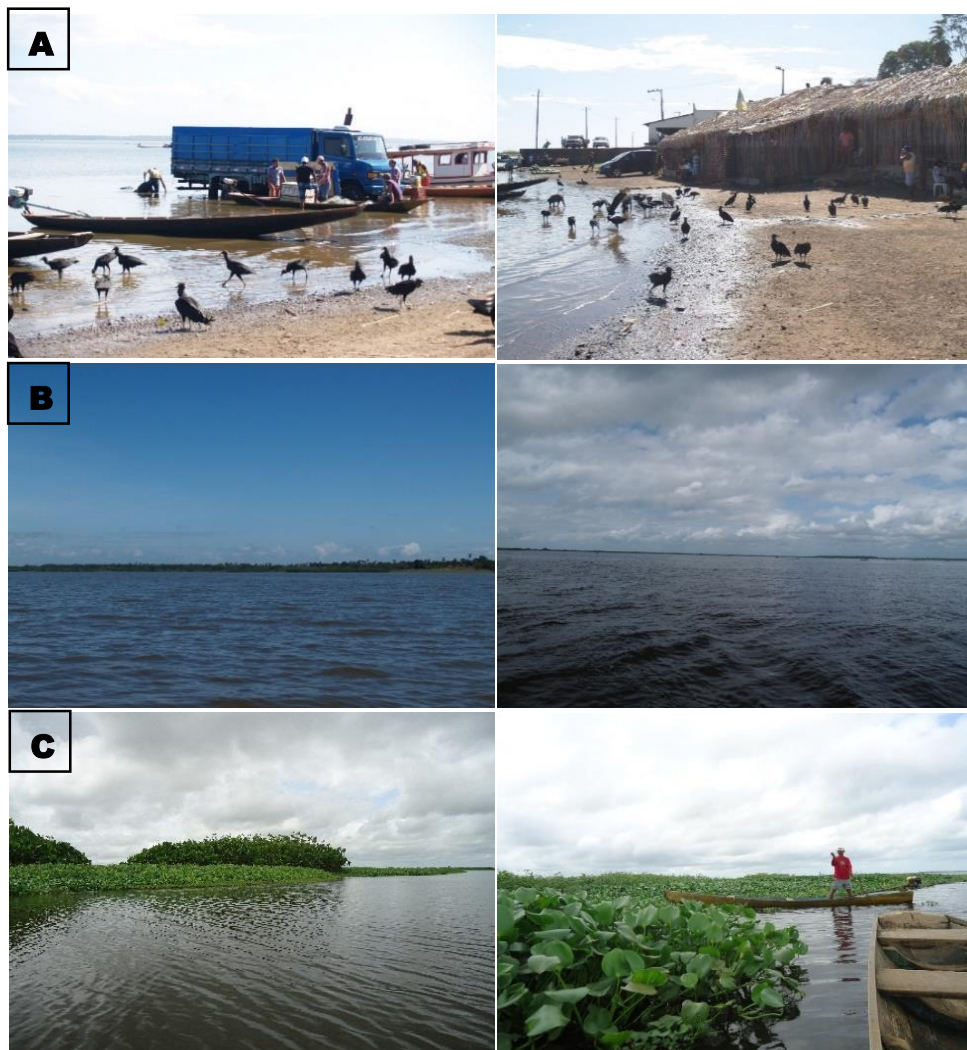


Figura 4-3. Locais de amostragem no Lago Açú: (A) Estação S3, (B) Estação S2 e (C) Estação S1, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.



4.4 Espécie Estudada

A espécie *Prochilodus lacustris* (Figura 4-4) é diferenciada de suas congêneres pela presença de pigmentação característica na nadadeira caudal, escamas com subdivisões cruciformes pouco elaboradas e um maior número de fileiras horizontais de escamas entre a origem da nadadeira pélvica e a linha lateral (CASTRO E VARI, 2004). Utilizando esses caracteres diferenciais, os exemplares coletados em Lago Açú foram identificados taxonomicamente, seguindo as chaves de identificação de Castro e Vari (2004) e Britski et al. (1984).

Figura 4-4. Exemplar de *Prochilodus lacustris* (Steindachner, 1907) coletado no Lago Açú, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.



4.5 Biomarcadores

4.5.1 Genotóxico: Teste do Micronúcleo e Anormalidades Nucleares

Utilizou-se 98 exemplares de *Prochilodus lacustris* para a análise de biomarcadores, dos quais 55 espécimes foram coletados no período de estiagem de 2015 e 43 espécimes foram coletados no período chuvoso de 2016.

A coleta do sangue periférico se deu por meio de punção da veia caudal, onde uma gota de sangue foi gotejada em uma lâmina microscópica para realização da técnica de esfregaço (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Posteriormente, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 24 horas para secagem. Os eritrócitos foram analisados utilizando a coloração Rosenfield (1947) modificado por Tavares-Dias e Moraes (2003), com a quantificação de 2000 células por lâmina confeccionada (CAMPANA et al., 1999; GRISOLIA, 2002). Além dos micronúcleos (MN), as alterações morfológicas nucleares foram classificadas de acordo com Carrasco et al. (1990). Para cada peixe determinou-se o total de eritrócitos (NE), o número total de micronúcleos (NMN), a frequência de micronúcleos por eritrócito (%FMN) e a frequência total de micronúcleo (%TMN).

4.5.2 Histológicos: Análise das Lesões Branquiais e Hepáticas

Foram removidos dos espécimes o segundo arco branquial direito e os fígados por meio de incisão abdominal (Figura 4-5). Os órgãos foram fixados em formalina a 10% por 24 horas e os arcos branquiais foram descalcificados em ácido nítrico 10% por mais 6h. Só então os órgãos foram desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol, impregnados e inclusos em parafina.

Figura 4-5. Coleta dos órgãos fígado e brânquia em espécimes de *Prochilodus lacustris* coletados no Lago Açú, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil.



Os blocos de parafina foram seccionados em cortes de espessura de 5µm com auxílio de micrótomo (Leica RM 2125 RT), seguidas de secagem à temperatura ambiente no Laboratório de Morfofisiologia Animal (UEMA). As amostras foram coradas com Hematoxilina e Eosina, segundo método descrito por Luna (1968). As leituras das lâminas foram realizadas com auxílio de um microscópio ótico da marca ZEISS.

As alterações histológicas branquiais e hepáticas foram avaliadas de forma semiquantitativa por meio do cálculo do Índice de Alteração Histológica (IAH), adaptado de Poleksic e Mitrovic–Tutundzic (1994), baseado na severidade de cada lesão. As alterações foram classificadas em fases progressivas de danos nos tecidos: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis conforme a Tabela 4-1.

Tabela 4-1. Alterações histológicas observadas nas brânquias e fígados de *Prochilodus lacustris* do Lago Açú, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil. A classificação é de acordo com Poleksic & Mitrovic-Tutundzic modificado (1994), com 3 estágios de gravidade (I, II e III).

Lesões Histológicas Branquiais	Estágio	Lesões Histológicas Hepáticas	Estágio
Congestão Vascular Hiperplasia do epitélio lamelar Levantamento do epitélio lamelar Desorganização da lamela secundária Fusão incompleta de várias lamelas secundárias Fusão completa de várias lamelas secundárias Dilatação do Seio Venoso Presença de parasito	I	Formação de núcleos na periferia da célula Deformação do contorno celular Hipertrofia celular Hipertrofia nuclear Atrofia celular Centro de Melanomacrófagos Vacuolização	I

Ruptura do epitélio lamelar Hiperplasia e hipertrofia das células de muco Espessamento descontrolado do tecido proliferativo filamental e lamelar Fusão completa de todas as lamelas	II	Vacuolização nuclear Degeneração citoplasmática Hiperemia Rompimento Ccelular Estagnação biliar Degeneração nuclear	II
Aneurisma lamelar	III	Necrose	III

Para cada brânquia e fígado, foi calculado o valor do IAH através da fórmula: $IAH = 1 \times \Sigma I + 10 \times \Sigma II + 100 \times \Sigma III$, sendo que I, II e III correspondem respectivamente ao número de alterações de estágio I, II e III. O valor médio do IAH foi dividido em cinco categorias: 0-10 = funcionamento normal do tecido; 11-20 = danificação leve para moderada do tecido; 21-50 = modificação moderada para severa do tecido; 51-100 = modificação severa do tecido; maior que 100 = danificação irreparável do tecido.

4.6 Aspectos Reprodutivos

Um total de 50 indivíduos foi coletado mensalmente, usando redes de emalhe com abertura de malha entre 5,5 a 7 cm entre nós adjacentes, a partir da pesca artesanal realizada no município.

No laboratório os exemplares foram medidos e pesados com o auxílio de um ictiômetro com acuracidade de (0,1 cm), para a obtenção do Comprimento Total (Lt) (cm), e de uma balança de precisão (0,01g) para a obtenção do Peso Total (Wt).

Os estádios maturacionais e o sexo de *Prochilodus lacustris* foram determinados através de análises macro e microscópicas. Em cada exemplar foi realizada uma secção ventro-logitudinal para extração das gônadas e identificação macroscópica, avaliando aspectos como coloração, consistência, vascularização, visibilidade dos ovócitos ou líquido espermático e volume em relação à cavidade abdominal (Tabela 4-2). A escala de maturação previamente estabelecida por Vazzoler (1996) e modificada por Carvalho-Neta e Castro (2008) foi utilizada para a classificação macroscópica das gônadas, com a determinação de quatro categorias: GS1 (imaturos), GS2 (em maturação ou em repouso), GS3 (maduro) e GS4 (desovado).

Para análise microscópica, as gônadas foram seccionadas em três partes (proximal, mediana e distal) e as porções medianas foram fixadas em formol 10% por 24 horas. Após a fixação, as gônadas foram desidratadas em série crescente de álcool,

diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para obtenção de cortes com espessura aproximadamente de 5 μ m. Para coloração, foi utilizada hematoxilina-eosina (HE).

Tabela 4-2. Características para determinação dos estágios macro e microscópicos das gônadas femininas de *Prochilodus lacustris*. I: Fase de cromatina nucléolos; II: ovócitos de estoque de reserva; III: ovócitos em vitelogênese lipídica; IV: ovócitos com vitelogênese lipídica e proteica; V: ovócito com vitelogênese completa; LO: lamelas ovígera; FV: folículo vazio; FA: folículo atrésico; CF: corpos foliculares.

Características		Imaturo	Em maturação	Maturo	Desovado
Aspectos macroscópicos	Tamanho em relação à cavidade abdominal	< ¼	½ - 1/3	¾ - 4/4	1/3 – ½
	Percepção dos ovócitos	Não	Poucos	Sim	Poucos
	Aspectos dos ovócitos	-	Esbranquiçados e pequenos	Amarelados e grandes	Amarelados e grandes
	Vascularização	Não	Maior que na fase anterior	Elevada	Hemorrágico
	Coloração das gônadas	Translúcidas	Amarelas/Marrons	Amarelas	Marrons
Tipos de ovócitos predominantes		Fase I e II; LO	Fase II, III e IV	Fase IV V	II, V, CF, FA, FV

Além da aferição do comprimento total (Lt), peso total (Wt), pesagem e análise das gônadas M_G (g), realizou-se ainda a retirada e pesagem dos órgãos: fígado (M_L) em g e do estômago (M_S) em g. A obtenção destes dados foi utilizada para o cálculo da amplitude de comprimento, proporção sexual da população, relação peso-comprimento, fator de condição (K), relação gonadossomática (RGS), relação hepatossomática (RHS), índice de repleção estomacal (IR) e época de desova.

Amplitude de Comprimento

Esta variável foi determinada através da diferença de medidas do maior comprimento total e menor comprimento total de cada indivíduo durante todo o período de coleta de dados. Para obtenção mensal da distribuição de frequência de comprimento total (DFCLt), os valores de comprimento total foram distribuídos em intervalos de classes, obedecendo a metodologia auxiliar de *Sturges*.

Os dados de comprimento total de machos e fêmeas foram comparados através do teste não paramétrico de Mann Whitney, uma vez que não foram atendidos os pressupostos de normalidade dos dados para comparação das médias desta variável com o emprego do teste *t* de *Student*.

Proporção Sexual

A proporção sexual anual da espécie foi obtida através da frequência observada dos indivíduos machos e fêmeas, com a aplicação do teste do Qui-Quadrado (χ^2) (ZAR, 1996), para detectar possíveis diferenças estatisticamente significativas nessas proporções, admitindo-se uma proporção sexual esperada de 1:1.

Utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2 / E$$

Onde: χ^2 = Qui-quadrado; O = frequência de indivíduos observados e E = frequência de indivíduos esperados (1:1).

Relação Peso/Comprimento

A relação entre o peso total e o comprimento total foi obtida de acordo com o método estabelecido por Santos (1978), onde os valores empíricos das variáveis envolvidas foram lançados em um gráfico (gráfico de dispersão) para verificar a tendência dos pontos empíricos e o modelo de ajustamento mais apropriado. Como os dados empíricos mostrou uma tendência para uma função potencial, o ajustamento foi representado pela seguinte expressão: $Wt = aLt^b$

Onde: Wt = peso total médio dos indivíduos no instante t ; a = fator de condição, relacionado com o grau de engorda e b = constante relacionada com o tipo de crescimento dos indivíduos.

A transformação logarítmica dos dados resultou em uma expressão do tipo:

$$\ln Wt = \ln a + b \ln Lt$$

A análise de covariância (ANCOVA) foi aplicada com o intuito de verificar diferenças entre os parâmetros da regressão de machos e fêmeas.

Fator de Condição

O fator de condição, como indicador reprodutivo, representa uma relação entre o metabolismo reprodutivo e o desenvolvimento corporal de uma espécie (VAZZOLER, 1996). A determinação foi analisada para cada indivíduo através da expressão:

$$K = Wt / Lt^b$$

Onde: W_t = peso total (g); L_t = comprimento total do peixe (mm) e b = constante relacionada com o tipo de crescimento, a qual foi estimada considerando todos os indivíduos amostrados por cada sexo.

Os pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias foram verificados utilizando o Teste de Kolmogorov-Smirnov e Teste de Levene, para determinar a utilização da estatística paramétrica. Uma vez que a normalidade não foi aceita, necessitou-se da aplicação do teste não paramétrico de Mann-Whitney, o qual comparou as medianas entre os sexos.

Relações biológicas

As relações estabelecidas em razão das variáveis reprodutivas serão denominadas no capítulo II desta dissertação de “Índices Biológicos” somente em virtude das normas do periódico.

Relação Hepatossomática (RHS)

A relação hepatossomática (RHS): é a razão entre o peso do fígado (W_l) e o peso total do peixe (W_t). A expressão aplicada foi: $RHS = (W_l/W_t) \cdot 100$ (SANTOS, 1978)

Os valores médios mensais da relação hepatossomática (RHS), foram determinados através do quociente: $RHS_m = \sum_{i=1}^n \frac{RHS_i}{n}$, onde: RHS = Relação hepatossomática de cada indivíduo e n = número total da amostra.

Os dados da Relação Hepatossomática foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann Whitney, uma vez que não foram atendidos os pressupostos de normalidade dos dados por meio do Teste de Kolmogorov-Smirnov.

Relação Gonadossomática (RGS)

A relação gonadossomática foi calculada para cada indivíduo, com os dados de peso total (W_t) e o peso das gônadas (W_g), ambos expressos em gramas. Seguindo a expressão matemática, representado por:

$$RGS = (W_g/W_t) \cdot 100 \text{ (VAZZOLER, 1996)}$$

A validade desta relação para a quantificação do desenvolvimento das gônadas foi verificada através da relação linear entre o peso total e o das gônadas para os indivíduos sexualmente maduros.

Os valores médios mensais da relação gonadossomática foram estimados através do quociente: $RGSm = \sum_{i=1}^n \frac{RGSi}{n}$, onde: RGSi = Relação gonadossomática de cada exemplar macho ou fêmea amostrado e n = número total de fêmeas ou machos na amostra.

Os dados da Relação Gonadossomática foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann Whitney, uma vez que, por meio do Teste de Kolmogorov-Smirnov, os pressupostos de normalidade dos dados não foram atendidos.

Índice de Repleção Estomacal (IR)

A expressão do índice de repleção é dada por:

$$IR = (We/Wt). 100 \text{ (SANTOS, 1978)}$$

Os valores médios mensais do índice de repleção (IR) foram determinados através do quociente:

$$IRm = \sum_{i=1}^n \frac{IR}{n}, \text{ onde: IR = índice de repleção de cada exemplar amostrado e } n = \text{número total de indivíduos amostrados.}$$

A variação mensal do índice médio de repleção (IR) tende a fornecer informações sobre as condições alimentares da espécie durante o período em estudo. Os valores do Índice de Repleção foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney, haja vista os pressupostos de normalidade dos dados não serem atendidos por meio do Teste de Kolmogorov-Smirnov.

Época de desova

Para determinar o período de desova de *Prochilodus lacustris* analisou-se a frequência de peixes maduros (WEST, 1990), de machos e fêmeas separadamente, comparando a frequência com os valores da relação gonadossomática (RGS), hepatossomática, índice de repleção e fator de condição. No decorrer do estudo, os parâmetros que apresentaram melhor conformidade, foram utilizados como indicador da época de desova.

4.7 Variáveis abióticas e análise bacteriológica

Paralelo à coleta dos peixes foram aferidos *in situ* as variáveis abióticas da água, como a temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg/L) e condutividade (µS/cm), com três repetições de cada parâmetro utilizando o aparelho multiparâmetros HANNA HI 9828 (Figura 4-6). Foi coletado ainda, 2 litros de amostras de água em frascos

esterilizados, com conservação em gelo e transporte até a Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) para a realização das análises químicas e bacteriológicas.

Figura 4-6. Coleta *in situ* dos parâmetros abióticos da água do Lago Açú, por meio do aparelho multiparâmetros HANNA HI 9828, e amostras para análises em laboratório.



No Laboratório de Química dos Solos da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), as amostras foram filtradas e acidificadas para determinação das concentrações dos elementos Cobre, Alumínio, Zinco, Cádmio, Crômio, Chumbo, Ferro, Níquel, Manganês, Mercúrio, Magnésio, Cobalto, Molibdênio e Selênio através de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICPOES) (ICP – Varian 720-ES) (TYLER, 1991).

A análise bacteriológica foi realizada no Laboratório de Água e Alimentos da UEMA e seguiu a metodologia recomendada pela APHA (1998), para determinação do número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli*, utilizando testes do substrato enzimático cromogênico (ONPG) e fluorogênico (MUG).

4.8 Tratamento Estatístico

O resultado dos parâmetros abióticos e dados biométricos dos espécimes foi expresso através da média e desvio padrão (\pm). No capítulo I analisou-se, para cada variável ambiental e biomarcador, a existência ou não de diferenças entre os locais de amostragem (S1, S2 e S3) e a sazonalidade. Para isto, os dados das variáveis físico-químicas foram testados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias, através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene. Atendido os pressupostos foi realizada uma ANOVA e o teste *a posteriori* de Tukey para identificar os grupos que se diferiram. Para os dados que não obedeceram aos pressupostos, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

No capítulo II, analisou-se para cada variável, a existência ou não de diferenças entre os sexos e a sazonalidade. Os resultados referentes aos índices reprodutivos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Quando os pressupostos

não foram atendidos aplicou-se alternativamente o teste não paramétrico de Mann-Whitney, o qual comparou as medianas entre os sexos. A análise de covariância (ANCOVA) foi realizada com o intuito de verificar diferenças entre os parâmetros da regressão de machos e fêmeas. Já os dados de comprimento total de machos e fêmeas foram comparados com o emprego do teste t de Student e Mann Whitney, quando os pressupostos de normalidade dos dados não foram atendidos. A proporção sexual anual da espécie foi obtida através da frequência observada entre os indivíduos machos e fêmeas, com a aplicação do teste do Qui-quadrado (χ^2) para detectar possíveis diferenças estatisticamente significativas nessas proporções, admitindo-se uma proporção sexual esperada de 1:1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são aqui apresentados em forma de dois artigos, sendo que: a) o capítulo I irá tratar do uso de biomarcadores histológicos e genotóxicos na espécie de peixe *Prochilodus lacustris* associado à análise de parâmetros físicos e químicos para o diagnóstico da qualidade ambiental do Lago Açu, um corpo hídrico pertencente a área de proteção ambiental da Baixada Maranhense, e, b) o capítulo II, abordará características da biologia reprodutiva da espécie *P. lacustris*, a fim de reunir informações dos indicadores do desenvolvimento gonadal, associando-os aos fatores abióticos (temperatura, oxigênio dissolvido, precipitação pluviométrica e pH) e à sazonalidade, verificando possíveis implicações no processo reprodutivo da espécie.

Biomarcadores histológicos e genotóxicos em *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) para avaliação ambiental de uma Área Protegida no Nordeste do Brasil

Rayssa de Lima Cardoso^{1,2*}, Raimunda Nonata Fortes Carvalho-Neta^{1,3}, Antonio Carlos Leal de Castro⁴, Jonatas da Silva Castro¹, Cássia Fernanda Chagas Ferreira¹, Marcelo Henrique Lopes Silva¹, João Reis Salgado⁴, Costa Débora Martins Silva Santos^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca (PPGRAP/UEMA), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campos Paulo VI, São Luís, Maranhão, Brasil.

² Laboratório de Morfofisiologia Animal, Cidade Universitária Paulo VI, s/n, Cidade Operária, São Luís, MA 65055-000, Brasil

³ Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (Laboaq), Cidade Universitária Paulo VI, s/n, Cidade Operária, São Luís, MA 65055-000, Brasil

⁴ Laboratório de Química e Solos, Cidade Universitária Paulo VI, s/n, Cidade Operária, São Luís, MA 65055-000, Brasil

⁵ Departamento de Oceanografia e Limnologia da Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil

Corresponding author^{1*}:

Name: Rayssa de Lima Cardoso

Postal Address: Avenida Gonçalves Dias, nº 657-A, bairro: Centro, cidade de São José de Ribamar, estado do Maranhão, CEP: 65110-000

email: rayssalimaxd@hotmail.com

Telephone: +55 (98) 98270-3850

RESUMO

Em todas as partes povoadas da Terra, a qualidade dos ambientes aquáticos está sendo alterada pelas mais diversas atividades do homem que geram uma complexa variedade de substâncias tóxicas e representam ameaça direta ao sistema ecológico e a biota aquática. Com isso, este trabalho objetivou avaliar a ocorrência de alterações histológicas e genotóxicas em *Prochilodus lacustris*, como indicativos de impactos antrópicos em um ambiente lacustre da Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, no nordeste do Brasil. As alterações histológicas foram avaliadas por meio do índice de alteração histológica, e as alterações genotóxicas foram detectadas através do teste de micronúcleos em três estações de amostragem (S1, S2 e S3). As brânquias apresentaram lesões nos três estágios de severidade, sendo que as lesões com gravidade definida como leve, foram mais frequentes nos espécimes coletados no ponto S1. No tecido hepático, em ambas as áreas avaliadas, foram mais frequentes as lesões do tipo leve. A análise de micronúcleos evidenciou que a estação S3 é a mais afetada. As respostas biológicas observadas em *P. lacustris*, indicaram que os peixes estão respondendo a efeitos diretos causados por alterações ambientais. Sendo que os peixes da estação S3 apresentaram a sanidade mais comprometida.

Palavras-Chave: Brânquias, Fígado, Micronúcleos, *Prochilodus lacustris*, Monitoramento Ambiental, Área de Proteção Ambiental, Contaminação Aquática, Xenobióticos

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos, à Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), ao Pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca (PPGRAP/UEMA), ao Grupo de Pesquisa Biologia e Ambiente Aquático (BIOAqua/UEMA), ao Laboratório de Morfofisiologia Animal, ao Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (LABOAQ/UEMA), ao Laboratório de Pesca e Ecologia Aquática (LABPEA/UEMA), ao Laboratório de Química do Solo (UEMA), ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da UEMA (curso de Medicina Veterinária) e ao departamento de Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão (DEOLI/UFMA) pelas plenas condições fornecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

¹Artigo a ser encaminhado ao periódico **Environmental Science and Pollution Research**.

Revista classificada com qualis **A2** na área de avaliação em **Zootecnia / Recursos Pesqueiros**

INTRODUÇÃO

Os corpos hídricos superficiais, tais como lagos, rios e mares são receptáculos de uma complexa variedade de compostos e substâncias oriundas tanto das atividades metabólicas dos organismos, como dos resíduos ocasionados pelas ações antrópicas, que têm, normalmente, esses ambientes como destino final (Ohe et al, 2004). Essa diversificada composição química inclui contaminantes e agentes tóxicos que representam ameaça direta à biota (Ünlü e Gümüş, 1993; Chang et al. 1998; Ip et al. 2005).

Diversos organismos da biota aquática podem ser utilizados como indicadores das alterações que os habitats vêm sofrendo. Entre os táxons mais utilizados, os peixes destacam-se como bons bioindicadores, uma vez que podem vir a assimilar, absorver, acumular e transferir compostos dissolvidos no ambiente (Minissi et al. 1996; Porto et al. 2005; Bolognesi e Hayashi, 2011). Os peixes respondem de múltiplas maneiras aos estressores ambientais, e essas respostas podem ser classificadas como biomarcadores.

O termo biomarcador abrange qualquer alteração em níveis moleculares, celulares, bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais, que podem ser mensurados a partir de amostras de tecidos, órgãos e fluidos corporais, indicando a presença e/ou a intensidade de agentes tóxicos que alteram a condição normal do sistema biológico (Nrc, 1987; Peakall, 1994; Van Der Oost et al. 2003).

Estudos de biomarcadores relacionados às alterações histológicas vêm sendo amplamente utilizados em avaliações ambientais. Uma das grandes vantagens do uso de biomarcadores histológicos é a possibilidade de examinar órgãos-alvo específicos, como brânquias e fígado, que são responsáveis por funções vitais, como respiração, acumulação e biotransformação de xenobióticos (Gernhofer et al. 2001; Camargo e Matinez, 2007).

A exposição a substâncias químicas dissolvidas na água também pode alterar o material genético e ocasionar mutações cromossômicas nos espécimes, assim, outra análise que ganha notoriedade é o Teste de Micronúcleos (MN) (Rabello-Gay, 1991) associado à identificação de alterações nucleares em eritrócitos píceos (Carrasco et al. 1990).

O incremento dessas técnicas e metodologias para monitoramentos ambientais, além da utilização de espécies bioindicadoras e suas informações fisiológicas, são importantes instrumentos no acompanhamento de regiões e ambientes aquáticos com grande diversidade biológica. Como é o caso da porção norte do Brasil, que além de contemplar a área de maior potencial ecológico do planeta, a região da Amazônia, possui uma extensa planície de inundação localizada no Estado do Maranhão, denominada de Baixada Maranhense, que é designada pelo governo estadual como uma área ambientalmente protegida, e considerada, no âmbito da Convenção de Ramsar, como zona úmida de importância internacional (Matthews, 1993).

Apesar dos instrumentos normativos que estabelecem a conservação desta zona úmida brasileira, a região vem sendo ameaçada por problemas ambientais, como desmatamento, expansão de áreas agrícolas, erosão do solo, assoreamento dos corpos hídricos, urbanização, pesca e invasão de espécies alóctones (Ibañez et al. 2000), o que acarreta no interesse científico em acompanhar as mudanças que este ambiente vem sofrendo (Dimitriou e Zacharias, 2010).

Visto que é de fundamental importância a utilização dos componentes biológicos no processo de acompanhamento ambiental, os peixes da família Prochilodontidae destacam-se como propícios ao papel de espécies bioindicadoras e modelos biológicos, pois se distribuem por toda América do Sul, são abundantes na região de estudo, são dominantes na estrutura trófica devido ao seu hábito detritívoro e realizam o processamento da matéria orgânica do ambiente (Bowen, 1983; Flecker, 1996), além de estarem entre os mais importantes recursos pesqueiros de água doce de toda região neotropical (Castro et al. 2003).

Diante do exposto, neste estudo objetivou-se avaliar a ocorrência de alterações histológicas e genotóxicas em *Prochilodus lacustris*, como indicativos de impactos antrópicos, na Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Conceição do Lago Açu, região central do estado do Maranhão, que tem o Lago Açu como principal corpo hídrico (Fig. 1). O Lago Açu possui uma área de 55km² que o qualifica como um dos grandes lagos naturais do Brasil, uma vez que o país apesar de suas dimensões continentais, não possui extensos lagos naturais, e sim grandes lagos artificiais construídos ao longo das usinas hidroelétricas brasileiras. Se comparado com importantes corpos hídricos lacustres brasileiros, o Lago Açu é maior que o Lago Paranoá que tem 48km² e localiza-se no Distrito Federal (Fernandes, 1998), e é 20 vezes maior que a Lagoa Rodrigo de Freitas que possui uma área de 2,2 km² e localiza-se no estado do Rio de Janeiro (Andreatta e Marca, 1996).

Pontos de Amostragem

As coletas de espécimes ocorreram durante o período de estiagem (agosto, outubro e dezembro de 2015) e período chuvoso (maio, junho e julho de 2016) em três pontos de amostragem (S1, S2 e S3). A estação S1 (Lat: 513.790,288984; 9.582.655,62598) é a estação de referência sendo a mais afastada da influência antropogênica; S2 (Lat: 511.717,525679; Long: 9.579.650,89142) configura-se como uma estação transicional, no meio do corpo hídrico; e S3 (Lat: 511.099,927607; Long: 9.576.359,73726) é a mais próxima do distrito municipal com influência direta da ocupação urbana, lançamento de esgoto doméstico e descarte “in natura” de peixes e mariscos oriundos da comercialização pesqueira na margem do lago.

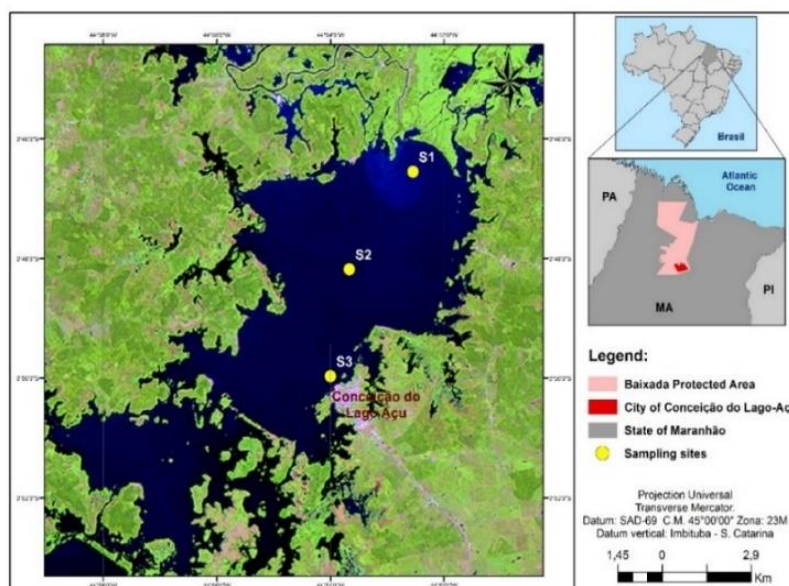


Fig 1 Localização dos pontos de coleta dos exemplares de *Prochilodus lacustris* no Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil

Espécimes e Procedimentos Histológicos e Hematológicos

Utilizou-se 98 exemplares de *Prochilodus lacustris*, dos quais 55 foram coletados no período de estiagem de 2015 e 43 foram coletados no período chuvoso de 2016. Todos os espécimes tiveram seu comprimento total (*Lt*) e o peso total (*Wt*) aferidos, juntamente com a análise macroscópica do estágio gonadal (*GS*), classificando-os em GS1 (*imaturus*), GS2 (*em maturação*), GS3 (*maduros*) e GS4 (*desovado*) seguindo a escala de Vazzoler (1996), modificada por Carvalho-Neta e Castro (2008).

A proporção sexual foi obtida através da frequência observada entre os indivíduos machos e fêmeas, aplicando o teste do Qui-quadrado (X^2) para detectar possíveis diferenças estatisticamente significativas nessas proporções, admitindo-se uma proporção sexual esperada de 1:1.

Posteriormente, foram removidos dos espécimes o segundo arco branquial direito e os fígados por meio de incisão abdominal. Os órgãos foram fixados em formalina a 10% por 24 horas e os arcos branquiais foram

descalcificados em ácido nítrico 10% por mais 6h. Em seguida, foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois, diafanizados em xilol, inclusos em parafina com cortes de espessura de 5µm e corados com hematoxilina e eosina (Luna, 1968) para descrição microscópica.

As alterações histológicas branquiais e hepáticas foram avaliadas de forma semiquantitativa, através do cálculo do Índice de Alteração Histológica (IAH), adaptado de Poleksic e Mitrovic – Tutundzic (1994), baseado na severidade de cada lesão. As alterações foram classificadas em fases progressivas de danos nos tecidos: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis. Para cada exemplar de peixe foi calculado um valor de IAH através da fórmula: $IAH = (1 \times \Sigma I + 10 \times \Sigma II + 100 \times \Sigma III)$, sendo que I, II e III correspondem respectivamente ao número de alterações de estágio I, II e III. O valor médio do IAH foi dividido em cinco categorias: 0-10 = funcionamento normal do tecido; 11-20 = danificação leve para moderada do tecido; 21-50 = modificação moderada para severa do tecido; 51-100 = modificação severa do tecido; >100 = danificação irreparável do tecido.

A coleta sanguínea para o estudo hematológico dos micronúcleos se deu via punção caudal, com a obtenção de uma gota de sangue para realização da técnica de esfregaço (Nepomuceno, 1997). As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 24 horas para secagem. Após esse intervalo, os eritrócitos foram analisados utilizando a coloração Rosenfield (1947) modificada por Tavares-Dias e Moraes (2003), com a quantificação de 2000 células por lâmina confeccionada, examinadas com microscópio Zeiss (ampliação 400x e 1000x) (Campana et al. 1999; Grisolia, 2002). Além dos micronúcleos (MN), alterações morfológicas nucleares também foram classificadas como indicativos de genotoxicidade de acordo com Carrasco et al. (1990).

Variáveis abióticas

Os parâmetros da água (pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade) foram determinados com um kit multiparâmetro HANNA HI 9828, e as leituras de turbidez (UNT) foram realizadas com a utilização de turbidímetro HANNA HI 93703. Durante as expedições de amostragem, também se coletou amostras de água (2 litros) para análises bacteriológicas que seguiram a metodologia recomendada pela APHA (1998), com a determinação do número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli*, utilizando testes do substrato enzimático cromogênico (ONPG) e fluorogênico (MUG). Além da determinação do nível de contaminação por meio das concentrações dos elementos como Cobre, Alumínio, Zinco, Cádmio, Crômio, Chumbo, Ferro, Níquel, Manganês, Mercúrio, Magnésio, Cobalto, Molibdênio e Selênio com a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICPOES) (ICP – Varian 720-ES) (Tyler, 1991).

Análise Estatística

Os dados de biomarcadores e os dados das variáveis físico-químicas foram testados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias, através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene. Atendido os pressupostos foi realizada uma ANOVA e o teste a posteriori de Tukey para identificar os grupos que se diferiram. Para os dados que não obedeceram aos pressupostos foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As significâncias foram testadas para avaliar as diferenças mensais/sazonais (seco e chuvoso) e espaciais (pontos de coleta).

RESULTADOS

Dados biométricos de *Prochilodus lacustris*

A frequência de ocorrência dos exemplares amostrados, bem como o resultado do teste Qui-quadrado (X^2) evidenciaram que as fêmeas foram significativamente predominantes em todo o período amostral. A proporção sexual foi de 4,15 fêmeas para cada macho. Já as características morfométricas mostraram que os exemplares de maior comprimento, de ambos os sexos, foram capturados em S3.

O percentual dos estágios gonadais (%GS) indicou os espécimes capturados apresentaram os estágios sexuais GS1, GS2 e GS3 no período de estiagem, e houve um predomínio de indivíduos (75%) no período chuvoso. A área S1 mostrou indicativos de alta atividade reprodutiva, uma vez que houve maior ocorrência

de indivíduos maduros e em maturação, e na estação S3, houve predomínio de indivíduos imaturos (Tabela 1). Não houve a ocorrência de indivíduos desovados (GS4).

Tabela 1 Média e Desvio Padrão (\pm) dos dados biométricos e percentual dos estágios de maturação gonadal (%GS1, GS2 e GS3) de machos e fêmeas de *Prochilodus lacustris*, coletados em Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. Macho (M); Fêmea (F) e número de indivíduos (n)

Pontos de amostragem	Período de Estiagem			Período Chuvoso		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
	M (n=2) F (n=16)	M (n=4) F (n=15)	M (n=3) F (n=15)	M (n=4) F (n=12)	M (n=3) F (n=9)	M (n=4) F (n=11)
Comprimento Total (Lt)	19,1 \pm 0,75	18,6 \pm 0,45	20,1 \pm 1,36	19,4 \pm 1,59	19,5 \pm 0,31	22,1 \pm 1,27
Peso (Wt)	121,02 \pm 11,87	124,1 \pm 13,67	143,84 \pm 16,4	119,46 \pm 17,63	128,2 \pm 13,88	138,0 \pm 20,9
Estágio Gonadal (%EG)	17,7% (GS1)	38,8% (GS1)	72,2% (GS1)	NI (GS1)	75% (GS1)	42,8% (GS1)
GS1 = Imaturos	23,5% (GS2)	22,4% (GS2)	27,8% (GS2)	80% (GS2)	25% (GS2)	28,5% (GS2)
GS2 = Em Maturação	58,8% (GS3)	38,8% (GS3)	NI (GS3)	20% (GS3)	NI (GS3)	28,7% (GS3)
GS3 = Maduros						

Teste de Micronúcleo e Alterações Nucleares

A frequência de alterações citogenéticas do tipo micronúcleo em *P. lacustris* se diferenciou significativamente ($p < 0,05$) entre os exemplares coletados na área S1 do período de estiagem em relação aos exemplares coletados no ponto S3 em ambas as estações do ano, pois durante o período de estiagem, a área S1 apresentou a menor frequência (0,01%) de todo o período amostral. Durante a estação chuvosa houve maior frequência dos biomarcadores genotóxicos, porém não houve diferença estatística entre os períodos sazonais ($p > 0,05$) (Fig 2).

As alterações nucleares (AN) do tipo “notched”, “lobed”, “blebbed” e “binucleated” (CARRASCO et al., 1990), tiveram maior ocorrência no ponto S3 durante o período chuvoso (Tabela 2). Houve a ocorrência de todos os tipos de alterações morfológicas celulares, sendo que a do tipo “notched” foi a que se apresentou em maior quantidade.

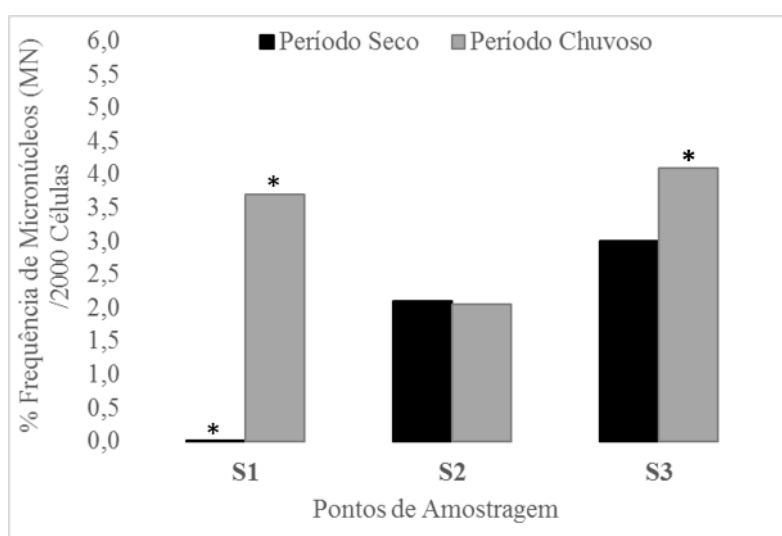


Fig 2 Frequência de micronúcleos em eritrócitos do *Prochilodus lacustris* coletados em Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. \pm são os desvios padrões e * indica os valores significativamente diferentes entre os pontos de amostragem ($p < 0,05$)

Tabela 2 Anormalidades nucleares e formação de micronúcleos registrados em eritrócitos do *Prochilodus lacustris* coletados em Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão – Brasil

Pontos de Amostragem	Exemplares de <i>P. lacustris</i>	ALTERAÇÕES NUCLEARES				
		Período Seco				
		MN	NOTCHED	LOBED	BLEBBED	BINUCLEATED
S1	N=18	26	2			
S2	N=19	42	4			1
S3	N=18	53	4	1	2	
Total	55	121	10	1	2	1
Período Chuvoso						
S1	N= 16	74	3			
S2	N= 12	41	5	2	2	1
S3	N= 15	82	9	1		1
Total	43	197	17	3	2	2

Lesões Branquiais

A maioria dos indivíduos coletados na área S1 apresentou somente lesões de estágio I de gravidade, sendo que a lesão *hiperplasia e hipertrofia das células de muco* também foi encontrada em pequena porcentagem (3,3%).

Os espécimes coletados no ponto S2, apresentaram 10 dos 11 tipos de lesões branquiais, ou seja, 90% de todas as alterações identificadas neste estudo. No período seco as lesões mais frequentes foram *congestão vascular*, *fusão incompleta* e *fusão completa de várias lamelas secundárias*. E durante o período chuvoso, as lesões mais frequentes foram *congestão vascular*, *levantamento do epitélio lamela*, *fusão incompleta* e *fusão completa de várias lamelas secundárias*, *fusão completa de todas as lamelas* e *aneurisma*.

Com relação ao ponto S3, verificou-se que os indivíduos continham todos os tipos de lesões branquiais, sendo frequentes as lesões em estágio II e III. A distribuição e frequência das lesões branquiais podem ser visualizadas na tabela 3.

Tabela 3 Frequência de alterações branquiais encontradas nos exemplares de *Prochilodus lacustris* coletados em Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. S1, S2 e S3 (pontos de amostragem); número de indivíduos (n)

Alterações histopatológicas	Frequência (%)						
	Período Seco			Período Chuvoso			
	S1 (n = 18)	S2 (n = 19)	S3 (n = 18)	S1 (n = 16)	S2 (n = 12)	S3 (n = 15)	
Estágio I	Congestão Vascular	11,90	17,20	14,17	14,81	16,67	12,75
	Hiperplasia do epitélio lamelar	0,00	3,23	2,50	0,0	10,61	12,75
	Levantamento do epitélio lamelar	9,52	11,83	14,17	11,11	15,15	14,71
	Desorganização da lamela secundária	9,52	8,60	2,50	0,0	7,58	10,78
	Fusão incompleta de várias lamelas secundárias	11,90	17,20	15,00	14,81	12,12	12,75

	Fusão completa de várias lamelas secundárias	7,14	17,20	14,17	3,70	12,12	14,71
	Dilatação do Seio Venoso	0,0	3,23	2,50	3,70	4,55	2,94
	Presença de parasito	0,0	0,0	6,67	0,0	0,0	0,0
Estágio II	Hiperplasia e hipertrofia das células de muco	3,3	8,60	10	0,0	0,0	3,7
	Fusão completa de todas as lamelas	0,0	4,30	6,67	0,0	7,58	9,80
Estágio III	Aneurisma lamelar	0,0	6,45	11,67	0,0	9,09	5,88

O Índice de Alteração Histológica (IAH), calculado com base nas alterações branquiais, variou de 2 a 125, com valor médio de 46,89 no período seco. Na estação chuvosa, O IAH ficou entre 1 e 117, com média de 32,39. Os biomarcadores no tecido branquial de *P. lacustris* apresentaram alterações variando do nível normal à dano irreversível (Fig. 3). Durante o período seco, os valores de IAH foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os indivíduos coletados em S3 e S2 (maiores índices) e os registrados nos indivíduos do ponto S1 (menores índices), ao contrário do período chuvoso que não houve diferença significativa entre os locais de amostragem.

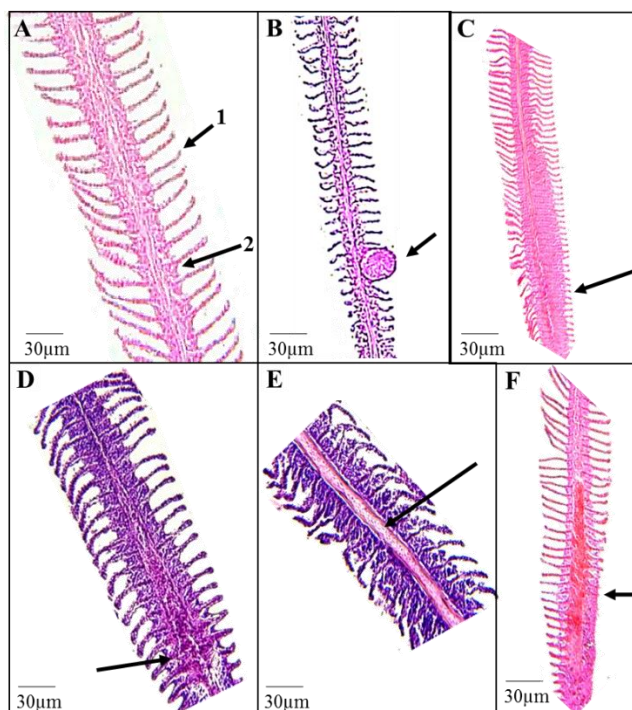


Fig 3 Filamentos branquiais da espécie *Prochilodus lacustris*. A) Brânquia normal: seta 1 indica a lamela branquial, seta 2 indica o filamento branquial. De B a F, ilustrações de brânquias com lesões histopatológicas: B) A seta indica a localização de um Aneurisma lamelar; C) A seta indica uma Fusão incompleta de várias lamelas; D) Dilatação do seio venoso e hemorragia (seta); E) A seta indica uma Dilatação do seio venoso; F) Destaque para a Fusão total de várias lamelas (seta). Coloração HE

Lesões Hepáticas

No tecido hepático de *P.lacustris* foram encontradas alterações histológicas do tipo *núcleo na periferia da célula*, *centros de melanomacrófagos*, *vacuolização*, *hiperemia* e *necrose tecidual* (Fig 4). Durante todo o período amostral, as lesões do tipo *vacuolização* e *centro de melanomacrófagos*, categorizadas como de grau 1 de severidade, foram as mais frequentes, sendo mais expressivas nas estações de amostragem S2 e S3 (Tabela 4). Já a lesão *necrose* que causa dano irreversível ao tecido hepático, ocorreu somente nas estações S2 e S3. Contudo, não foi observada diferença significativa entre distribuição das lesões na escala espacial ($p>0,05$).

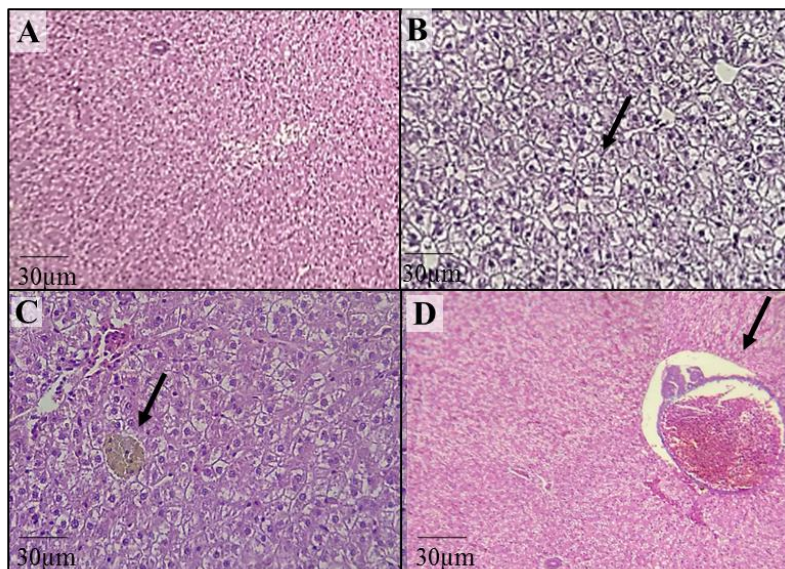


Fig 4 Fígado da espécie *Prochilodus lacustris*. A) Fragmento do tecido hepático normal. De B a D ilustrações lesões hepáticas: B) vacuolização do citoplasma dos hepatócitos (seta); C) Destaque para o centro de melanomacrófagos (seta); D) Lesão hepática do tipo hiperemia (seta). Coloração HE

Tabela 4 Frequência de alterações no tecido hepático encontradas nos exemplares de *Prochilodus lacustris* coletados em Lago Açu, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. S1, S2 e S3 = pontos de amostragem; n= número de indivíduos.

Alterações histopatológicas		Frequência (%)					
		Período Seco			Período Chuvoso		
		S1 (n = 18)	S2 (n = 19)	S3 (n = 18)	S1 (n = 16)	S2 (n = 12)	S3 (n = 15)
Estágio I	Núcleo na periferia da célula	13,13	19,76	37,84	22,22	17,86	10,34
	Centro de melanomacrófagos	31,25	35,29	45,95	14,8	25,00	37,93
	Vacuolização	25,88	26,35	27,03	48,15	28,57	31,03
Estágio II	Hiperemia	16,25	23,53	27	14,8	25,0	20,7
Estágio III	Necrose	0,0	5,88	5,41	0,00	3,57	3,45

Qualidade da Água

Durante todo o período amostral, a temperatura apresentou máxima de 32°C e mínima de 29,2°C, o oxigênio dissolvido permaneceu acima de 5,0 mg/L, variando de 5,92 a 9,46 mg/L, o pH apresentou um caráter alcalino em todos os pontos com valores acima de 8,0, e a condutividade elétrica variou de 154 µS/cm a 326 µS/cm. As concentrações dos elementos químicos Al, Fe, Se e Hg das amostras coletadas nas estações S2 e S3 foram maiores que o limite aceitável para os padrões nacionais determinados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). O elemento Pb esteve em quantidade elevada somente no ponto S3, e todos os outros componentes químicos mantiveram-se dentro da escala de valores recomendados, ou não foram detectados. Com relação à análise bacteriológica (coliformes totais, termotolerantes e presença de *Escherichia coli*), os resultados estiveram dentro dos limites estabelecidos por lei. Os dados sobre a qualidade da água constam na tabela 5.

Tabela 5 Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos e biológicos monitorados no Lago Açú, Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. ^aTodos os valores apresentados foram mensurados nos meses de agosto, outubro e dezembro de 2015 correspondente ao período chuvoso, e nos meses de maio, junho e julho de 2016 representando o período de estiagem. ^bValores Recomendados com base na legislação brasileira, Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) pelas Resoluções de nº 357 de 2005, nº 430 de 2011 e nº 274 de 2000. Concentração não detectada (nd)

Parâmetros	Período Seco			Período Chuvoso			Valores recomendados ^(b)
	S1	S2	S3	S1	S2	S3	
Temperatura (°C)	29,2±2,7	30,3±2,1	32 ± 3,2	30,4±2,5	30,1±1,1	30,5±1,5	28° a 32°C
pH	9,15 ± 0,4	8,26 ± 0,6	9,03 ± 1,2	8,33 ± 1,5	8,72 ± 0,5	8,14 ± 0,3	6 – 9
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	7,58±1,3	9,46±2,3	8,07±2,5	7,09±0,3	6,01±0,7	5,92±1,1	> 5 mg/L
Turbidez (NTU)	49±2,6	55±2,9	52±1,8	31±3	39 ±2,1	30±1,71	≤100 UNT
Condutividade (µS/cm)	319 ± 163,72	326 ± 200,47	311 ± 564,52	155 ± 25,74	154 ± 21,61	163 ± 43,18	-
Alumínio (Al) mg/L	nd	0,25219	nd	nd	0,42765	0,03511	≤0,1 mg/L
Cobre (Cu) mg/L	nd	nd	nd	nd	nd	0,01446	≤0,009 mg/L
Zinco (Zn) mg/L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	≤0,18 mg/L
Cádmio (Cd) mg/L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	≤0,001 mg/L
Crômio (Cr) mg/L	0,00678	nd	0,00433	nd	nd	0,00194	≤0,05 mg/L
Chumbo (Pb) mg/L	0,0017	0,00279	0,07758	0,00688	nd	nd	≤0,01 mg/L
Ferro (Fe) mg/L	0,14863	0,46650	0,66105	0,19689	0,03734	1,30891	≤0,3 mg/L
Níquel (Ni) mg/L	0,02240	nd	0,00498	nd	nd	0,04332	≤0,025 mg/L
Manganês (Mn) mg/L	0,00140	0,01537	0,02392	nd	nd	0,42020	≤0,1 mg/L
Mercúrio (Hg) mg/L	nd	0,01214	nd	0,00087	0,03196	0,01352	≤0,0002 mg/L
Magnésio	22,56	20,26	20,69	11,69	13,23	7,82	-

(Mg) mg/L							
Cobalto (Co) mg/L	nd	nd	nd	nd	0,01477	0,03390	≤0,05 mg/L
Molibdênio (Mo) mg/L	0,00151	0,00957	nd	nd	nd	nd	-
Selênio (Se) mg/L	nd	<u>0,07157</u>	<u>0,08957</u>	nd	nd	nd	≤0,01 mg/L

DISCUSSÃO

O exame dos epitélios branquiais evidenciou lesões nos três estágios de severidade, sendo que as mais frequentes foram congestão vascular, levantamento do epitélio lamelar, desorganização da lamela secundária, fusão incompleta de várias lamelas secundárias, fusão completa de várias lamelas secundárias. As lesões de estágio I, com gravidade definida como leve, foram mais frequentes nos espécimes coletados no ponto (S1). A estação amostral S1 é considerada a área de referência, pois se trata da área mais distante do distrito municipal, com reduzida ação antrópica, com características ambientais ainda conservadas.

Alterações branquiais em estágio I, são exemplos de mecanismos de defesa que resultam no aumento da distância entre o ambiente externo e o sistema sanguíneo, formando uma barreira contra a entrada de contaminantes, mas podem ser reversíveis em caso de melhoria das condições ambientais (Mallatt, 1985; Hinton e Lauren, 1990; Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Fernandes e Mazon, 2003).

Já a maioria dos danos branquiais apresentados pelos indivíduos coletados nos pontos S2 e S3, foram classificados nas categorias moderada a grave, demonstrando uma suscetibilidade da espécie na escala espacial. A identificação de aneurisma lamelar (lesão do estágio III) em exemplares de *P. lacustris*, indica um colapso do sistema de células pilares, com prejuízo na integridade vascular e risco de hemorragia devido à ruptura do epitélio (Hinton e Lauren, 1990).

As alterações hepáticas mais expressivas identificadas na espécie foram vacuolização, centro de melanomacrófagos e núcleo na periferia da célula. As alterações hepáticas observadas neste trabalho coincidem com o estudo realizado Martinez e Camargo (2007) com a espécie *Prochilodus lineatus*; onde foram encontradas alterações do tipo necrose, núcleos em forma irregular, vacuolização nuclear, centros de melanomacrófagos, entre outras. Como o fígado é o órgão relacionado com o processo de desintoxicação e biotransformação (Van Der Oost et al. 2003), as lesões hepáticas encontradas nesse tecido configuram-se como importantes biomarcadores de contaminação aquática (Rodrigues e Fanta, 1998).

O aumento da vacuolização nos hepatócitos é descrito por Pacheco e Santos (2002), como um sinal de processo degenerativo relacionado à danos metabólicos, provavelmente relacionado com a exposição à água contaminada. A alta incidência de centros de melanomacrófagos no fígado está relacionada com o aumento da atividade fagocítica como resposta imune, na eliminação, desintoxicação ou reciclagem de contaminantes (Mondon et al. 2001; Pacheco e Santos, 2002; Oliveira Ribeiro et al. 2005; Rabitto et al. 2005). Já a identificação da lesão do tipo necrose nos indivíduos das áreas S2 e S3 representa um indicativo de que essas áreas estão impactadas, pois este tipo de lesão causa prejuízos funcionais e estruturais no fígado dos peixes (Stentiford et al. 2003). Um tecido necrosado praticamente não apresenta mais funcionalidade, pode causar a morte celular em tecidos adjacentes e conseqüentemente, afeta maiores níveis de organização biológica (Rabitto et al. 2005).

A presença de micronúcleos e outras alterações no envelope nuclear são indicativos de ação mutagênica no ambiente analisado. De acordo com Palhares e Grisólia (2002), os peixes podem apresentar variações quanto à frequência de micronúcleos em virtude do seu hábito alimentar, nichos ecológicos, tipos de poluição que o ambiente aquático está sujeito e mudanças sazonais. O que fica bem evidente neste estudo, uma vez que foi identificadas diferenciações tanto na escala espacial, quanto na escala sazonal.

Dentre as áreas estudadas, somente o ponto S1 apresentou valores mínimos de frequência de micronúcleo (0,01%), que corresponde a frequência basal de eritrócitos píceos atribuída à peixes do gênero *Prochilodus*, coletados em ambiente natural e mantidos em laboratório, como evidenciado por Porto et al. (2005) que determinou a frequência mínima de 0,01% para a espécie *Prochilodus nigricans*; Seriani et al. (2011) que utilizando a espécie *Prochilodus argenteu* estabeleceu a frequência mínima de 0,2%; Cavalcante et al. (2008) utilizando a espécie *Prochilodus lineatus* com frequência mínima de 0,7% e Santos et al. (2013) que estabeleceu 0,03% para espécie *Prochilodus vimboides*.

Quanto ao período sazonal, houve maior ocorrência de alterações citogenéticas durante a estação chuvosa, o que possivelmente indica que os peixes se mantiveram expostos a uma maior concentração de agentes químicos que se acumularam no corpo hídrico, pois durante o período o chuvoso há um aumento significativo no carreamento químico proveniente do escoamento superficial, pois as águas de drenagem caracterizam-se por conter sedimentos, nutrientes, matéria orgânica, substâncias que consomem oxigênio, bactérias, compostos químicos, metais e agentes tóxicos (De Luca et al. 1990; Temprano et al. 2005; Bastos et al. 2006). Resultando na elevação da ocorrência de alterações no material genético (Fenech et al. 2000; Matsumoto et al. 2000; Pacheco e Hackel (2002).

Os dados biométricos e estágio sexual dos exemplares de *Prochilodus lacustris*, não apresentaram diferença significativa entre o ponto S1 e as outras áreas de amostragem S2 e S3. Todos os machos e fêmeas da área S1 encontravam-se no estágio mais avançado de maturação, ao contrário dos indivíduos dos pontos S3 que, em sua maioria, eram imaturos. O desenvolvimento do aparelho reprodutivo é um processo contínuo em todas as fases do ciclo de vida dos peixes, porém a exposição à xenobióticos pode acarretar no retardamento de fases de desenvolvimento e maturação gonadal (Adams, 1992, 2002), o que pode explicar um maior número de indivíduos imaturos na área S3. Vale ressaltar, que o ponto S3 recebe influência direta da ocupação urbana municipal, do lançamento de esgoto doméstico e do descarte “*in natura*” de peixes e mariscos oriundos da comercialização pesqueira que ocorre na margem do lago e por sua vez, acarreta no aumento da produção de matéria orgânica, influenciando na incidência de peixes jovens que ocupam essa área para alimentação.

Os parâmetros temperatura, condutividade, pH e oxigênio dissolvido relacionam-se entre si e são indicativos da dinâmica dos ambientes, sendo indispensáveis para avaliação da qualidade ambiental, e neste estudo estiveram dentro dos limites instituídos pela legislação nacional (Conama 357/05). Os valores de condutividade e turbidez são um indicativo de grande quantidade de nutrientes dissolvidos e matéria orgânica e inorgânica na forma particulada, muito comum em ambientes lênticos (Camargo e Valentini, 1990; Wetzel, 2001).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações de metais pesados nas estações de coleta, porém as análises de água dos pontos S2 e S3 apresentaram valores acima dos níveis estabelecidos pela legislação brasileira para os elementos Al, Pb, Hg, Fe e Se. Qualquer alteração nas concentrações de metais pesados é preocupante no ambiente aquático, uma vez que esses elementos são assimilados pela biota (através do alimento ou em solução) e essa assimilação pode ter alto poder acumulativo nos ramos da cadeia trófica, chegando até o nível alimentar humano (Pereira et al. 2010; Jabeen et al. 2012; Mert et al. 2014). Assim, vale destacar a importância de estudos posteriores que analisem o teor de elementos químicos não só em amostras de água, como também no sedimento e nos tecidos dos organismos.

CONCLUSÃO

Os biomarcadores observados em *P. lacustris* no presente estudo indicaram que os peixes estão respondendo a efeitos diretos causados por alterações ambientais. As alterações histológicas e as modificações nucleares mostraram-se como bons biomarcadores de avaliação ambiental, uma vez que houve uma significativa distinção entre os locais de amostragem e seus respectivos níveis de “conservação”. Assim como a diferenciação sazonal, em que o período chuvoso foi o que apresentou uma maior incidência de biomarcadores, apontando que essa época do ano pode ocasionar maior susceptibilidade ambiental para este corpo hídrico. Vale destacar ainda, que a espécie *Pochilodus lacustris* mostrou ser adequada para estudos ambientais uma vez que apresentou respostas nos níveis molecular e tecidual, que puderam ser identificadas, classificadas e quantificadas como indicadores de qualidade ambiental.

REFERÊNCIAS

- Adams SM (2002) Biological indicators of stress in fish. Trans. Am. Fish. Soc.12: 190-199
- Adams SM, Crumby WD, Greeley MS, Shugart LR, Saylor CF (1992) Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. Ecotox Environ Safe 24: 347-360
- Andreatta JV, Marca AG (1996) Análise dos níveis de coliformes nas águas da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro. In: Anais do III Simpósio do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1ª ed

Bastos ICO, Lovo IC, Estanislau CAM, Scoss LM (2006) Utilização de bioindicadores em diferentes hidrossistemas de uma indústria de papeis reciclados em Governador Valadares-MG. *Eng Sanit Ambient* 11: 203-211

Bolognesi C, Hayashi M (2011) Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26: 205-213

Brasil (2005) Resolução Conama nº357/005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no Diário Oficial da União. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705>. Acessado em 20 de fevereiro de 2016

Camargo AFM, Valentini WC (1990). Características físicas e químicas da água. In: Castagnolli N, Pinto MLG (ed) *Piscicultura*, 1º ed. Jaboticabal, São Paulo, pp 8-13

Camargo MMP, Martinez CBR (2007) Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop Ichthyol* 5(3): 327-336

Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulout FN (1999) Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutat Res-Genet Tox* 438(2): 155-161

Carrasco KR, Tilbury KL, MYERS MS (1990) An assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci* 47(11): 2123–2136

Carvalho-Neta RNF, Castro ACL (2008) Diversidade das assembleias de peixes estuarinos na Ilha dos Caranguejos, Maranhão. *Arq Cien Mar* 41: 48-57

Castro RMC, Vari RP (2003) Family Prochilodontidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris JRCJ (eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America, 2ª ed. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, pp 65-70

Cavalcante DGSM, Martinez CBR, Sofia SH (2008) Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res* 655: 41-46

Chang C, Sibley TH (1993) Accumulation and transfer of copper by *Oocystis pusilla*. *B Environ Contam Tox* 50: 689–695

De Luca SJ, Castro CB, Ide CN (1990) Contaminação de chuva e da drenagem pluvial. *Rev Amb* 4: 49-53

Dimitriou E, Zacharias I (2010) Identifying microclimatic, hydrologic and land use impacts on a protected wetland area by using statistical models and GIS techniques. *Math Comput Model* 51: 200-205

Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455(14) 81-95

Fernandes MN, Mazon EAF (2003) Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val AL, Kapoor BG (eds) *Fish adaptations*. Science Publishers, 1ª ed. Canadá, pp 203-231

Fernandes CA, Pinto MAT (1998) O Desafio do Lago Paranoá. <http://www.caesb.df.gov.br/ambi.htm>. Acessado em: 03 de outubro de 2016

Gernhofer M, Pawert M, Schramm M, Muller E, Triebkorn, R (2001) Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *J Aquat Ecosyst* 8: 241-260

Grisolia CK, Palhares D (2002) Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomicin Ctreatment. *Genet Mol Biol* 25(3): 281-284

Hinton DE, Lauren DJ, Holliday TL, Giam CS (1990) Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: Mcarthy JF, Shugart LR (eds). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Crc Press, Boca Raton Lewis Publishers, 1ª ed. Flórida, pp 51-65

Ibañez MSR, Cavalcante PRS, Costa Neto J P, Barbieri R, Pontes JP, Santana SCC, Serra CLM, Nakamoto N, Mitamura O (2000) Limnological characteristics of three aquatic systems of the pré-amazonian floodplain, Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). *Aquat Ecosyst Health Manag* 3: 521-53

- Ip CC, Li XD, Zhang G, Wong CSC, Zhang WL (2005) Heavy metal and Pb isotopic compositions of aquatic organisms in the Pearl River Estuary, South China. *Environ Pollut* 138: 494–504
- Jabeen G (2011) Studies on fish species specific metals bioaccumulation patterns in relation to water, sediments, plankton and fish in the river Ravi, Pakistan. PhD Thesis, University of Agriculture Faisalabad (UAF) Pakistan
- Luna LG (2001) Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. New York: McGraw Hill
- Mallatt J (1985) Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can J Fish Aquat Sci* 42: 630-648
- Matsumoto FE, Cólus IMS (2000) Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet Mol Biol* 23(2): 489–92
- Matthews GVT (1993) The Ramsar Convention on Wetlands: Its History and Development. Gland Switzerland: Ramsar Convention Bureau, Switzerland, Suíça
- Mert R, Alas A, Bulut S, Özcan MM (2014) Determination of heavy metal contents in some freshwater Fishes. *Environ Monit Assess* 186: 8017-8022
- Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M (1996) Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in fresh water. *Mutat Res* 367: 245-251
- Mondon JA, Duda S, Nowak BF (2001) Histological, growth and 7-ethoxyresorufin Odeethylase (EROD) activity responses of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* to contaminated marine sediment and diet. *Aquatic Biol* 54(3-4): 231-247
- Nepomuceno JC, Ferrari I, Spanó MA, Centeno AJ (1997) Detection of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of *Cyprinus carpio* Exposed to Metallic Mercury. *Environ Mol Mutat* 30: 293-297
- Nrc, National Research Council (1987) Biological markers in environmental health research - Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environ Health Persp* 1: 74
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K (2004) Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res* 567(2-3): 109-149
- Oliveira Ribeiro CA, Vollaire Y, Sanchez-Chardi A, Roche H (2005) Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquat Toxicol* 74: 53-69
- Pacheco AO, Hackel C (2002) Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul. *Cad Saude Publica* 18(6): 1675–83
- Pacheco M, Santos MA (2002) Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotox Environ Saf* 53: 331-347
- Peakall DW (1994) Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol Ecotox News* 1: 55-60
- Pereira P, De Pablo H, Vale C, Pacheco M (2010) Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metal-contaminated coastal system—gills reflect environmental contamination. *Mar Environ Res* 69(2): 53–62
- Poleksic V, Mitrovic-Tutundzic V (1994) Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller R, Lloyd R (eds) *Sublethal and Chronic effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Cambridge, 1^a ed, pp 339-352
- Porto JIR, Araujo CSO, Feldberg E (2005) Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environ Res* 97: 287-292
- Rabello-Gay MN (1991) Teste de micronúcleo em medula óssea. In: Rabello-Gay MN, Rodríguez MALR, Monteleone-Neto R (eds) *Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto, 1^a ed, pp 83-90

- Rabitto IS, Alves Costa JRM, Assis HCS, Pelletier É, Akaishi FM, Anjos A, Randi MAF, Ribeiro CAO (2005) Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotox Environ Saf* 60: 147-156
- Rodrigues EL, Fanta E (1998) Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoato 500. *Rev Bras Zool* 15: 441-450
- Santos CA, Lenz GD, Brandão ARP, Chippari-Gomes LC (2013) Acute toxicity of the water-soluble fraction of diesel in *Prochilodus vimboides* Kner (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotrop Ichthyol* 11: 193-198
- Seriani R, Ranzani-Paiva MJT, Silva-Souza ÂT, Napoleão SR (2011) Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. *Acta Sci Biol Sci* 33: 107
- Stentiford GD, Longshaw M, Lyons BP, Jones G, Green M, Feist SW (2003) Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar Environ Res* 55(2): 137-159
- Tavares-Dias M, Moraes FR (2003) Características Hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *Biosci J* 19: 107-114
- Temprano J, Arango O, Cagiao J, Suárez J, Tejero I (2005) Stormwater quality calibration by SWMM; A case study in Northern Spain. <http://www.wrc.org.za>. Acessado em: 10 de novembro de 2016
- Tyler G (1991) AA or ICP – Which do you choose? ICP Instruments at work. Varian, Optical Spectroscopy Instruments. Australia, 1ª ed, pp 1-6
- Ünlü E, Gümüş B (1993) Concentrations of copper and zinc in fish and sediments from the Tigris River in Turkey. *Chemosphere* 26(11): 2055–2061
- Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Phar* 13: 57-149
- Vazzoler AEAM (1996) *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática*. São Paulo, Brasil
- Wetzel RG (2001) *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Academic Press, San Diego

Normas da revista *Environmental Science and Pollution Research*

Instructions for Authors

Types of Papers

Peer-reviewed contributions:

- Research Articles (full papers)
- Short Original Communications and Discussion Articles
- Review Articles
- Research Communications

Please ensure that the length of your paper is in harmony with your research area and with the science presented.

All papers – excluding Editorials, Letters to the Editor, Book Reviews, Conference Reports – are subject to peer-review by a minimum of two and a maximum of three experts.

While submitting your paper you will be asked for three potential reviewers. Indicating three reviewers is mandatory.

To authors from non-English language countries:

To have the best possible pre-requisition for the review process, please ask a native speaker to check the quality of the English, before you submit the complete paper.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

- Please avoid acronyms in the title of your article
- For local studies, please indicate the name of the region and country in the title.

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of about 10 to 15 lines.

Keywords

Please provide 6 to 8 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

Language

References should be in English with an appropriate title in English. If it's in a different language the language should be indicated

Zhu J, Wu F-C, Deng Q-J, Shao S-X, Mo C-L, Pan X-L, Li W, Zhang R-Y (2009)

Environmental characteristics of water near the Xikuangshan antimony mine. *Acta Scientiae Circumstantiae* 29:655-661 (in Chinese)

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF

format. MSOffice files are also acceptable

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Please note:

Color art is free of charge for online and print publication.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter.

This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxfl, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4". Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing

Service and American Journal Experts.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g.

“salami-publishing”). No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes in authorship, or in the order of authors, are not accepted after the acceptance for publication of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted.

Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance for publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. There for authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the

COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to: If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline.

Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the abovementioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are

directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

The reproductive cycle of *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) in a humid zone of international interest in Northeastern Brazil

Rayssa de Lima Cardoso*, Cássia Fernanda Chagas Ferreira**, Raimunda Nonata Fortes Carvalho-Neta**, Antonio Carlos Leal de Castro***, James Werllen de Jesus Azevedo***, Débora Martins Silva Santos**

ABSTRACT

This study evaluated the annual cycle of biological reproductive aspects of *Prochilodus lacustris*, a neotropical fish species, in the Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense in northeastern Brazil. Fish were collected monthly between June of 2015 and June of 2016. Analyses allowed the determination of the reproductive period using biological indicators such as the gonadosomatic and hepatosomatic indexes, condition factor, stomach repletion index, and spawning season. The results suggest that the reproductive cycle of the species occurs between November and January, with a reproductive peak in January. The specie's spawning is of the periodic type. The results can serve as a model and contribute to improving the understanding of the dynamics of the physiological reproductive process in lentic environments.

Keywords: reproduction, neotropical fish, Environmental Protection Area, Maranhão.

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se avaliar o ciclo anual dos aspectos biológicos reprodutivos da espécie *Prochilodus lacustris* através de análise macroscópica e microscópica das gônadas, na Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, no nordeste do Brasil. Os exemplares foram coletados mensalmente no período de junho de 2015 a junho de 2016. As análises permitiram a determinação do período reprodutivo utilizando indicadores biológicos como os índices gonadosomáticos e hepatosomáticos, fator condição, índice de repleção estomacal e época de desova. Os resultados sugerem que o ciclo reprodutivo da espécie ocorre entre novembro e janeiro, com pico reprodutivo em janeiro. O desova da espécie é do tipo periódica. Os resultados podem servir como modelo e contribuir para melhorar a compreensão da dinâmica do processo fisiológico reprodutivo em ambientes lenticos.

Palavras-Chave: reprodução, peixe neotropical, Área de Proteção Ambiental, Maranhão.

* Universidade Estadual do Maranhão, Departamento de Química e Biologia, Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca. Cidade Universitária Paulo VI, s/n, Tirirical, São Luís, CEP 65.055-970, Maranhão, MA, Brasil (corresponding author). E-mail: rayssalimaxd@hotmail.com, telefone: +55 (98) 98270-3850.

**Universidade Estadual do Maranhão, Departamento de Química e Biologia, Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca. Cidade Universitária Paulo VI, s/n, Tirirical, São Luís, CEP 65.055-970, Maranhão, MA, Brasil. E-mail: cassiaferreiraoc@gmail.com (CFCF), raifortes@gmail.com (RNFCN), debsan70@gmail.com (DMSS).

***Universidade Federal do Maranhão. Departamento de Oceanografia e Limnologia. Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, CEP 65080-805, Maranhão, MA, Brasil. Email: alecufma@yahoo.com.br (ACLC), jameswerllen@yahoo.com.br (JWJA).

INTRODUCTION

Studies on the reproductive biology and population structure can be used to support conservation programs to maintain or improve fishery resources that are still available (PEREIRA et al., 2006). A panorama can be formed and contribute to the development of fisheries management programs in important regions such as the Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense. These programs benefit from the combination of knowledge about interactions between organisms and environmental variables such as temperature, pH, and dissolved oxygen, associated with behavioral and ecological knowledge about the species.

The Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense is a wetland of international interest that is protected by the Convention on Wetlands of International Importance agreement (RAMSAR Convention). This conservation unit consists of an ecological mosaic composed of rivers, floodplains, gallery forests, mangroves, wild flora and fauna, and numerous species of migratory birds, which use the region as a site for resting, feeding, and reproducing (MATTHEWS, 1993; NOGUEIRA, 2003).

Despite the aforementioned ecological attributes, in-depth studies that consider the reproductive aspects of the ichthyofauna in the region are scarce, especially on *P. lacustris*, which presents a strategic occurrence and distribution in the region with a significant socioeconomic importance for the riverine population.

The Prochilodontidae family is distributed throughout South America and widely found in main hydrographic basins. It is one of the most important families for commercial and artisanal freshwater fishing in neotropical regions (CASTRO et al., 2003). The family contains 21 species divided into three genera: *Prochilodus* (Agassiz, 1829), *Semaprochilodus* (Fowler, 1941), and *Ichthyoelephas* (Posada Arango, 1909). These genera can be easily distinguished from other Characiformes by a distinct set of morphological characters such as the presence of fleshy lips and two sets of tiny sickle and spatulate teeth (CASTRO; VARI, 2004).

Among these genera, *Prochilodus* stands out as the richest in the number of described species (13 in total), which are popularly known in Brazil as curimbã, curimatã, sábalo, or curimatá. These fish migrate long distances and have the ability to overcome natural obstacles; there are reports of movements of up to 43 km per day (GODINHO & KYARD, 2006; GOULDING, 1981; GODOY, 1975). The detritivorous habit processing organic matter in the water, vegetation, and sediment columns makes *Prochilodus* a dominant element in the ecosystemic structuring of tropical communities (BOWEN, 1983; FLECKER, 1996).

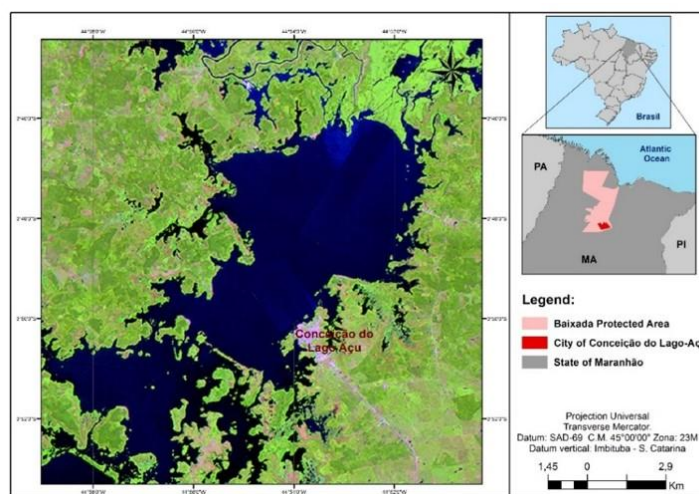
In economic terms, *Prochilodus spp.* was identified as the most captured genus in all Brazilian continental extractive fisheries in 2011. About 28,643 tons of captured curimatás were recorded in the statistics; this volume represents more than 10% of total continentally captured fish in Brazil, which was 243,820.7 tons (MPA, 2011). In northern Brazil, more precisely in the State of Maranhão, *Prochilodus* is highly abundant in the hydrographic network, particularly *Prochilodus lacustris* (STEINDACHNER, 1907), which is endemic in the state's basins of the Parnaíba, Mearim, and Tocantins Rivers (PIORSKI Et al, 2007; 2010).

There is great interest in biological information about this species due to its ecological relevance and small-scale fisheries. Thus, this study evaluated the annual cycle of biological reproductive aspects of *Prochilodus lacustris* in the Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense.

METHODOLOGY

A total of 600 individuals were collected monthly between June of 2015 and June of 2016 using gillnets with meshes showing adjacent nodes 5 to 7 cm apart. These specimens were collected in the artisanal fishery conducted in the municipality of Conceição do Lago Açu, in the Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense, Maranhense, in the central portion of the State of Maranhão, northeastern Brazil, located at 03°40'00" and 04°59'00" S and 44°39'00" and 45°03'00" W, where the Açu Lake is the main water body (Figure 1).

Figure 1. Location of the municipality of Conceição do Lago Açu, with emphasis on the water body under study (Açu Lake), Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense, Maranhão - Brazil.



The following parameters were measured in all specimens: total length L_t (mm), total weight W_t (g), gonad mass M_G (g), liver mass M_L (g), and stomach mass M_S (g). The gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HI), and stomach repletion index (SRI) were calculated as follows: $GSI = 100 M_G \cdot W_t^{-1}$; $HI = 100 M_L \cdot W_t^{-1}$, and $SRI = 100 M_S \cdot W_t^{-1}$, respectively. Seasonal fluctuations in the development of fish body were obtained using the condition factor (K) (LE CREN, 1951) according to the formula: $K = W_t (L_t^b)^{-1}$, relating the individuals' mass, length, and b (allometric coefficient), which indicates the type of growth (KING, 1995).

The reproductive cycle of *Prochilodus lacustris* was analyzed through the frequency of mature males and females (WEST, 1990) and the values of reproductive indexes (GSI , HI , SRI , and K). The sex and maturational stages *Prochilodus lacustris* were determined through macroscopic and microscopic analyses. Gonads were extracted in each specimen through a ventral longitudinal section; the macroscopic identification evaluated color, consistency, vascularity, visibility of oocytes or spermatic liquid, and volume in relation to the abdominal cavity. The maturation scale previously established by Vazzoler (1996) and modified by Carvalho-Neta and Castro (2008) was used for the macroscopic classification of gonads, with the determination of four categories: GS1 (immature), GS2 (maturing or resting), GS3 (mature), and GS4 (spawned).

In the microscopic analysis, the gonads were sectioned into three parts (proximal, medial, and distal) and the medial portions were fixed in 10% formaldehyde for 24 hours. The gonads were subsequently dehydrated in an increasing series of alcohol, diaphanized in xylol, and included in paraffin to obtain slices approximately 5 μm thick; these slices were stained with hematoxylin-eosin (HE).

The abiotic variables measured *in situ* were: temperature (°C), pH, dissolved oxygen (mg/L), and conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$); each parameter was measured in three replicates using the HANNA HI 9828 multiparameter kit. The Kolmogorov-Smirnov and Levene tests were used to test normality and homogeneity of variances in the data from the physical-chemical variables. Once assumptions were taken, ANOVA and the Tukey's a posteriori test were performed to identify groups that differed. The Kruskal-Wallis non-parametric test was used for the data that did not meet assumptions. Significance was tested to evaluate seasonal differences (dry and rainy periods).

The existence or non-existence of differences between sexes and seasonality was analyzed for each variable. The results regarding reproductive indexes were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test. When assumptions were not met, the non-parametric Mann-Whitney test was alternatively applied, which compared the medians between sexes. The analysis of covariance (ANCOVA) was performed with the purpose of verifying differences between the regression parameters of males and females. The total length data in males and females were compared with the Student t and Mann-Whitney tests when normality assumptions were not met. The sex ratio was obtained by analyzing the frequency of males and females and applying the chi-square test (χ^2) to detect possible statistically significant differences in these proportions, assuming an expected sex ratio of 1:1.

The influence of the physicochemical characteristics of the Açú Lake on the reproductive indexes (*GSI*, *HI*, *SRI*, and *K*) of *P. lacustris* males and females was evaluated through the Canonical Correspondence Analysis (CCA). In addition, a multiple linear regression analysis was performed to determine possible multilinear relationships between descriptors. For this, the data were normalized to reduce the differences between dimensions of the values.

RESULTS

Distribution of Frequencies of Length and Sexual Proportion

A total of 600 *Prochilodus lacustris* specimens were sampled representing 405 females and 195 males. The Lt (total length) values ranged from 151-211 mm in males and 142-239 mm in females. Males were predominant in the length range of 179-193 mm, and females of 174-206 mm. Males and females presented significant differences in the distribution of Lt; the median in females was significantly higher than in males ($p < 0.05$). The sex ratio (female:male) was 2F:1M, with significant differences in the number of males and females at different sampling months ($p < 0.05$) (Table 1).

Table 1. Monthly sex ratio of *P. lacustris* males and females.

* = Significant values at the 5% level.

MONTH	ABSOLUTE FREQ.	NUMBER OF		NUMBER OF		χ^2
		MALES	males	FEMALES	females	
June/15	43	4	9.30	39	90.70	28.49*
Jul/15	50	5	10.00	45	90.00	32.00*
Aug/15	48	7	14.58	41	85.42	24.08*
Sept/15	48	8	16.67	40	83.33	21.33*
Oct/15	54	5	9.26	49	90.74	35.85*
Nov/15	48	24	50.00	24	50.00	0.00
Dec/15	50	21	43.14	29	56.86	1.28
Jan/16	55	29	53.57	26	46.43	0.29
Feb/16	50	40	80.00	10	20.00	18.00*

Apr/16	55	30	54.55	25	45.45	0.45
May/16	49	13	26.53	36	73.47	10.80*
June/16	50	9	18.00	41	82.00	20.48*
TOTAL	600	195	32.61	405	67.39	72.68*

Mass and Length Ratio

The captured total biomass was 790.229,44 mg with an average weight of 1,297.5 mg; the lowest average was recorded during the dry season (August/2015) at 825.4 mg, and the highest average at 2,053.3 mg during the rainy season (February/2016).

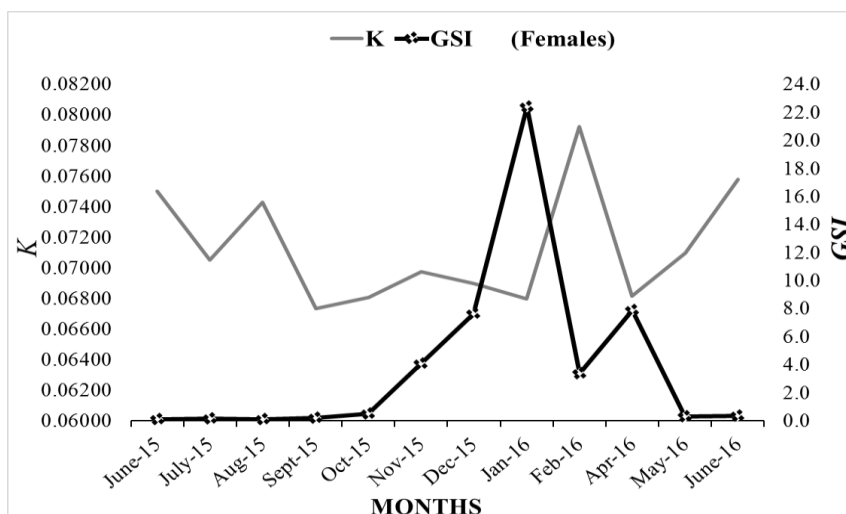
The L_T and M_T ratio showed a significant difference between sexes (ANCOVA, $p < 0.05$); the growth coefficient was lower than three ($b < 3$), indicating that *P. lacustris* presents negative allometric growth. This relationship was estimated by the non-linear regression analysis: $Wt = a \cdot Lt^b$, **males:** $Wt = 2.2294 \cdot Lt^{2.3882}$, $r^2 = 0.71$, $n = 139$; **females:** $Wt = 3.1055 \cdot Lt^{2.7115}$, $r^2 = 0.75$, $n = 368$.

Sexual Maturation and Biological Indexes

All gonadal stages (GS1, GS2, GS3, and GS4) were observed among the specimens. Based on the gonadosomatic index (GSI) obtained from female gonads, the most advanced stage of maturation occurred between November and January; the highest average was recorded in the rainy season during the month of January ($\bar{x} = 22.37$). The lowest GSI average values were observed in the dry period between July and October, characterizing a period of gonadal rest (Figure 2) that was confirmed by the macroscopic and microscopic observation of differentiation of egg mass and gonads' size.

The condition factor (K) did not present significant difference ($p > 0.05$) between the sexes; the K averages in females did not vary during the analyzed months. The average value was 0.07, and small increases occurred in June and August of 2015 and February and June of 2016 (Figure 2).

Figure 2. Average values of the Gonadosomatic (GSI) and Condition factor (K) biological indexes in *P. lacustris* females.

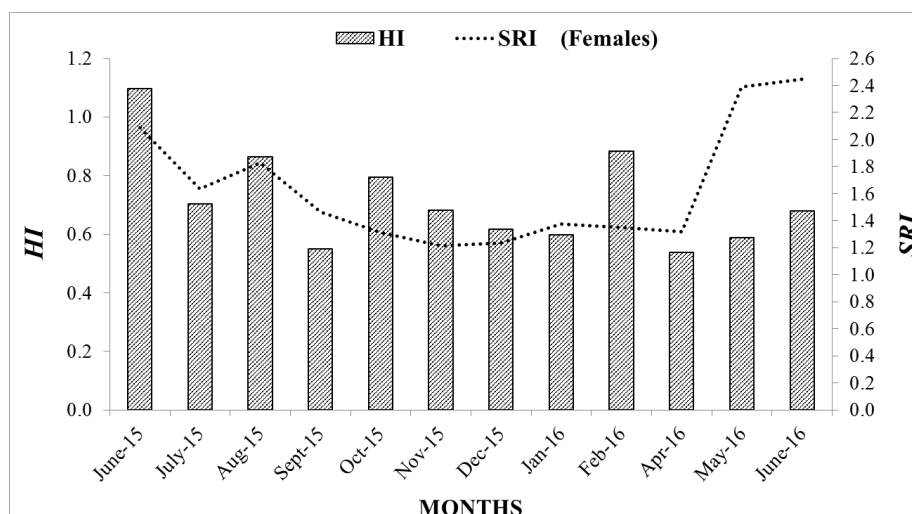


The hepatosomatic index (HI) varied from 0.54 to 1.10 in females, with slight variations in the dry period during the months of July, August, and October; its' maximum value

preceded the increase in *GSI*. A subsequent decrease in the average values was observed until January when there was an increase in the gonadosomatic index (*GSI*), increasing again from February to June of 2016 (Figure 3).

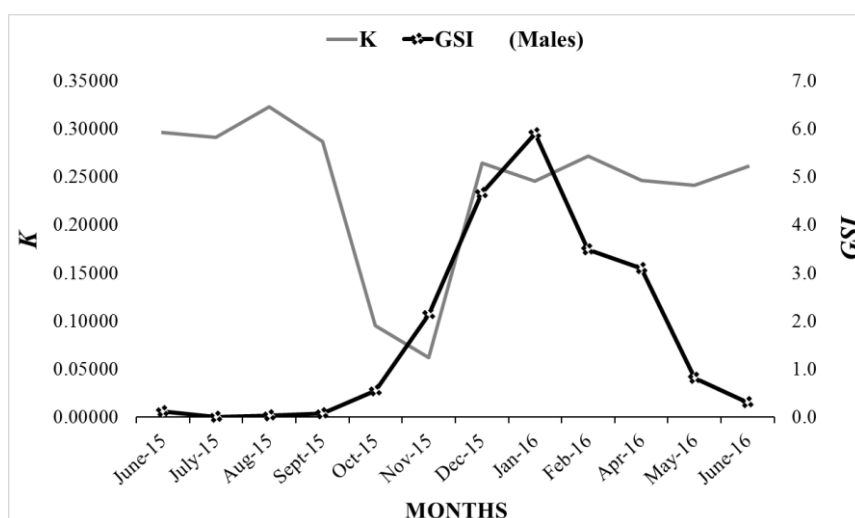
The stomach repletion index (*SRI*) in females showed an initial average value of 2.09 and a decrease in July of 2015 (1.63), reaching 1.83 in August. After these variations, it remained between 1.46 and 1.32 until April of 2016, however, presenting average increases of 2.39 and 2.45 in May and June of 2016, respectively (Figure 3).

Figure 3. Average values of the Hepatosomatic (*HI*) and Stomach Repletion (*SRI*) biological indexes in *P. lacustris* females.



The analysis of biological indexes in males showed that the variable *K* remained constant and with minimum values during the dry period in July, August, and September of 2015, however, increasing on and after November of 2015. The gonadal maturation pattern in males showed to be coincident with that of females, with the maximum *GSI* value in January of 2016, decreasing in the subsequent months between February and June of 2016 (Figure 4).

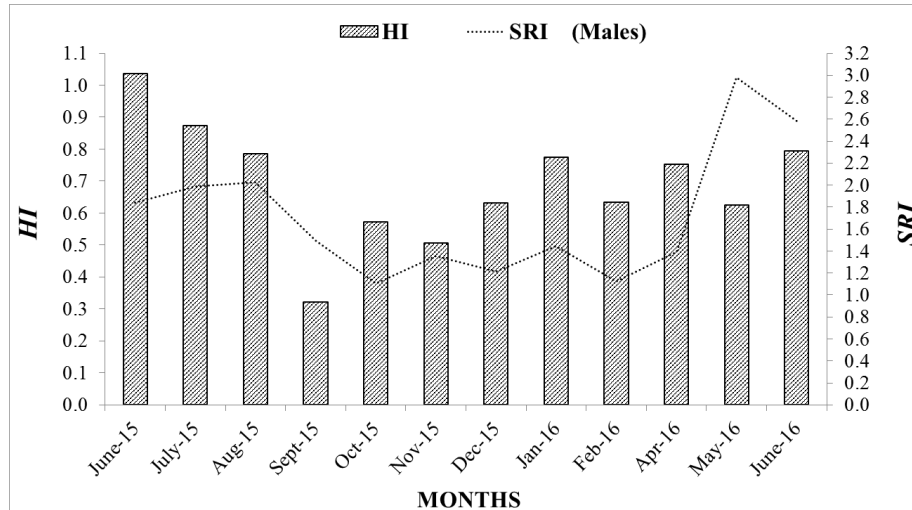
Figure 4. Average values of the Gonadosomatic (*GSI*) and Condition factor (*K*) biological indexes in *P. lacustris* males.



The *HI* in males was increased in June, July, and August of 2015, and again in April and June of 2016, following a pattern similar to that in females (Figure 5). The

maximum *SRI* values occurred in May and June of 2016, with average values of 2.98 and 2.58, respectively. The minimum average values occurred in October, December, and February of 2016.

Figure 5. Average values of the Hepatosomatic (HI) and Stomach Repletion (SRI) biological indexes in *P. lacustris* males.



The monthly frequency of maturational stages in male and female gonads showed a high prevalence of individuals in the GS3 stage between November and December of 2015 and January of 2016 (Figure 6 and Figure 7), i.e., the occurrence of mature individuals was higher than individuals in other stages in this time interval. This fact is a complementary indicative of the definition of the reproductive period in the species and corroborates the results found in the hepatosomatic (HI) and gonadosomatic (GSI) indexes. The monthly distribution of values showed that the occurrence of females with a flaccid ovarian membrane (GS4) was significant in February of 2016.

Figure 6. Relative frequency (%) of gonadal maturity stages in females of *P. lacustris*. GS1 (immature), GS2 (maturing or resting), GS3 (mature), and GS4 (spawned).

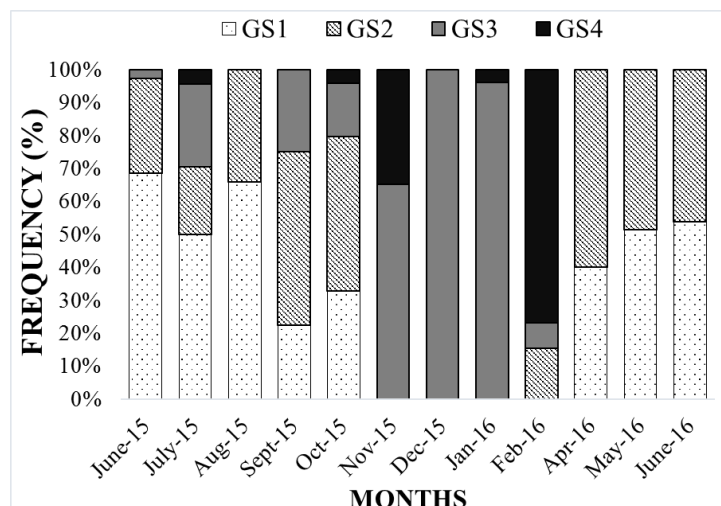
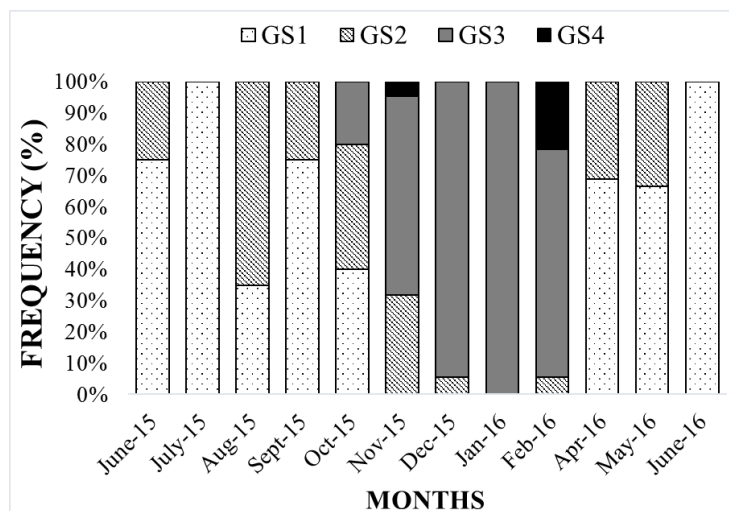


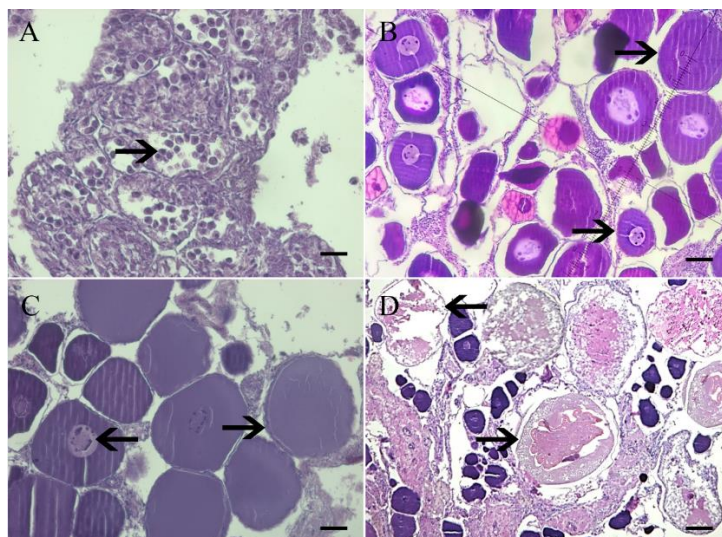
Figure 7. Relative frequency (%) of gonadal maturity stages in males of *P. lacustris*. GS1 (immature), GS2 (maturing or resting), GS3 (mature), and GS4 (spawned).



Microscopic classification of gonadal maturation stages in females

Females presented one pair of ovaries dorsally located in the coelomic cavity. With the development of the reproductive cycle, ovaries increased in size and showed variations in color, consistency, vascularity, and oocyte visibility. Immature ovaries (GS1) consisting of oogonia, stage I oocytes, and stage II reserve stock oocytes (Figure 8A) were evident. Ovaries in maturation (GS2) presented oocytes in reserve stock (stage II) and lipid vitellogenesis (stage III). The formation of lipid droplets was observed in the process toward the later stage of gonadal maturation (GS3, Figure 8B). Mature ovaries (GS3) showed enlarged oocytes with extended cytoplasm and large amounts of lipid vesicles and protein granules; most of them in complete vitellogenesis (stage V, Figure 8C). Spawned ovaries (GS4) presented a large amount of post-ovulation follicles in atresia and showed disorganized ovigerous flaccid lamellae (Figure 8D).

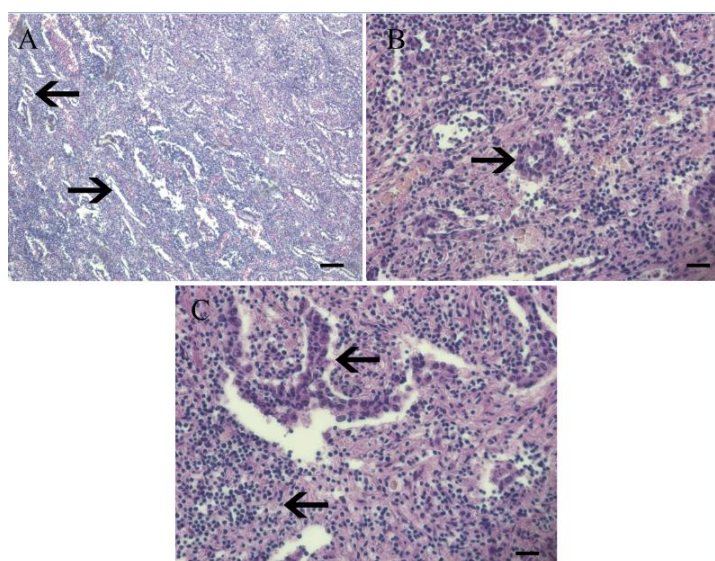
Figure 8. Photomicrography of ovaries during the gonadal cycle in *Prochilodus lacustris* collected at the Açú Lake, in the Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense, MA - Brazil. A: Immature ovary - primary oocytes (arrow); B: Ovary in maturation - secondary oocytes and oocytes with lipidic vitellogenesis (arrow); C: Mature ovary - oocytes with lipid and proteinic vitellogenesis and oocytes in complete vitellogenesis (arrow); D: Emptied ovary - partially empty follicle and atretic follicle. HE 100x. Bar = 100 μ m.



Microscopic classification of gonadal maturation stages in males

Males presented testicles in pairs, dorsally located in the abdominal cavity, with seminiferous tubules converging to the spermatic duct presenting variations in spermatic liquid volume and coloration. The microscopy of testicles revealed anastomosing seminiferous tubules containing cysts with spermatogenic cells, germinating spermatogonial-type cells, and primary and secondary spermatocytes, which normally form dense groups and present modifications during spermatogenesis (Figure 9 A, B, and C).

Figure 9. Photomicrograph of testicles during the gonadal cycle in *Prochilodus lacustris* collected at the Açú Lake, in the Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense, MA - Brazil. A: anastomosing tubular testicle and anastomoses (arrows); B and C: spermatogenic cells – spermatogonia, primary spermatocytes and secondary spermatocytes (arrows). HE 100x. Bar = 100 μm .



Environmental Variables

The lowest electrical conductivity value was recorded in June of 2016 ($79.1 \mu\text{scm}^{-1}$), and the highest in December of 2015 ($557 \mu\text{scm}^{-1}$). The concentration of dissolved oxygen reached the maximum value in August of 2015 (8.5 mg/L) and the minimum in February of 2016 (6.1 mg/L). The temperature oscillated between the minimum of 28.4°C in January of 2016 (rainy period) and a maximum of 32.6°C in July and October of 2015 (dry period). The hydrogenation potential (pH) presented the maximum value of 9.51 in December of 2015 and the minimum of 7.5 in June of 2016 (Table 2); this parameter presented a significant difference ($p < 0, 05$) on the temporal scale. According to information from the National Institute of Meteorology (INMET) for 2015 and 2016, the regional rainy season corresponded to the period from January to June with an average rainfall around 182.36 mm, and the dry season corresponded to the months of July and December with an average rainfall around 11.7 mm.

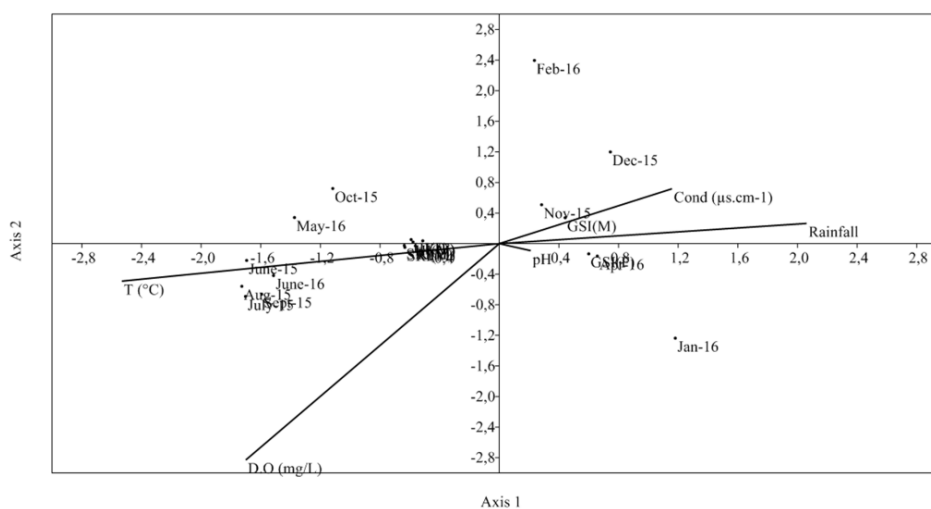
Table 2. Monthly values of environmental parameters: electrical conductivity, dissolved oxygen concentration, surface temperature, rainfall, and pH.

Sampling Months	Parameters				
	Temperature (°C)	Dissolved Oxygen (mg/L)	pH	Conductivity ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	Rainfall (mm)
June-15	30.7	7.8	8.9	90.35	65.8
July-15	32.6	8.0	9.1	236.55	6.5
Aug-15	30.7	8.5	9.0	251.3	0
Sept-15	31.2	8.0	8.5	398	3.6
Oct-15	32.6	8.3	9.3	326	24.5
Nov-15	31.2	7.2	9.1	455	17.8
Dec-15	30.7	7.0	9.5	557	17.8
Jan-16	28.4	8.2	8.9	213	273.2
Feb-16	29.0	6.1	8.0	140.6	203.6
Apr-16	30.5	6.9	7.7	145.1	254.3
May-16	30.9	7.1	8.0	127.9	247.9
June-16	31.5	7.1	7.5	79.1	49.4

The Canonical Correspondence Analysis (CCA) explained 99.22% of the variability found in the relationships between biological indexes and abiotic descriptors of the studied lacustrine environment. The first axis explained 94.42% of the data variation and the second axis explained 4.80%. The gonadosomatic relationships between male and female GSI (GSI (M) and GSI (F), respectively) were influenced by conductivity and, pH, total precipitation (rainfall), associated with the months corresponding to the species' reproductive period (November to January). The stomach repletion indexes, hepatosomatic index, and condition factor were associated with temperature and dissolved oxygen in both sexes (Figure 10).

The relationship between conductivity and the gonadosomatic index evidenced by the CCA was confirmed significant ($p < 0.05$) in the multiple regression analysis.

Figure 10. Scatter diagram for the canonical correspondence analysis between the biological indexes and physical-chemical characteristics of the Açu Lake, MA, Brazil.



DISCUSSION

The *Prochilodus lacustris* species presented a reproductive pattern associated with the rainy season in the studied region. The maturation peak occurred from November to January in both sexes, coinciding with results reported in other species in the genus *Prochilodus*. Arantes (2010) and Sato et al. (1996) studied *Prochilodus argenteus* in captivity and in its natural environment, and *Prochilodus affinis*, respectively, and observed similar results for the maturation period. Other migratory species such as *Brycon orthotaenia*, *Pseudoplatystoma corruscans*, and *Leporinus elongatus* are also cited with this same reproductive pattern.

The analyzed gonads presented germ cells at different stages of development in the same ovary, evidencing fractured spawning with oocytes that mature in clusters and are eliminated in installments during the months of reproductive peaks (ARAÚJO, 2009). This is a common strategy in many species of lentic environments (BAZZOLI, 2003); it allows increased probability of offspring survival and possibilities of reproductive efficiency (BURT et al., 1988).

The highest *GSI* values coincided with the most advanced stage of gonadal maturation in both sexes; these values decreased during the months with the highest frequency of young/immature individuals, corroborating the premise that this index helps to identify the reproductive period. Rodrigues et al. (1995) and Agostinho et al. (1984) also evidenced an elevation in *GSI* values in the most advanced stage of maturation and a drop in values after spawning.

The determination of the reproductive cycle based on *HI* average values was also associated with metabolic processes in the liver. Because vitellogenic and vitellogenin proteins are synthesized by the liver and transferred to ovaries in the reproductive process (Wallace and Selman, 1981), *HI* was the highest in females during the interval before sexual maturation, indicating increased liver activity before the reproductive period and supporting the development of ovaries.

However, the liver did not appear to influence the development of male gonads because *HI* followed the same trend as *GSI* in males, with the maximum value in January. This pattern was also observed in other Neotropical Characiformes (HOJO et al., 2004). Such behavior may be related to the fact that specific hepatic proteins (vitellogenin) are not produced in significant amounts by males and apparently, the liver does not influence the development of testicles (WALLACE and SELMAN, 1981). Tavares-Dias et al. (2000) emphasized that *HI* variations are not strictly related to the transfer of vitellogenin during reproduction because hepatic glycogen oscillations and lipid metabolism occur daily, generating different results in the same population.

P. lacustris presented the minimum average condition factor (*K*) between November and January, which is the inverse pattern to that of the gonadosomatic index, indicating that energetic reserves were being used in the reproduction process. The condition factor is a quantitative metric associated with fish welfare, and thus, it provides a possible relation between individual body's quality and physiological state (LE CREN, 1951; GOMIERO; BRAGA, 2003).

The small annual variability in stomach repletion index values (*SRI*) in both sexes is closely related to food supply in the environment and trophic level occupied by the species. Because fish in the Prochilodontidae family are excellent detritivores, species

ingest food of low energy content that is quickly digested and processed (BOND, 1979), which explains the annual disposition of this variable.

In this study, the growth of *Prochilodus lacustris* was characterized as negative allometric and similar to the results reported by Ramos et al. (2010) in *Prochilodus lineatus*. Nevertheless, Boncompagni-Júnior et al. (2012) report isometric growth and Arantes et al. (2010) report positive allometric growth in *Prochilodus argenteus*; Soares and Torelli (1998) report isometric growth in *Prochilodus brevis*. According to Froese (2006), these differences are commonly found and explained by the health condition in fish, the season of the year, the region of collection, year of sampling, or variations between species.

Prochilodus lacustris did not present sexual dimorphism, although females were larger than males. According to Vazzoler (1996), the occurrence of females with longer length may be related to growth rate, which tends to be higher in females than in males throughout the life cycle. The robustness of females is most prominent during the reproductive season when they carry a significant volume of oocytes and can be easily identified.

The observed sex ratio was not the expected for populations as a whole (1 female: 1 male). According to Vazzoler (1996), the sex ratio in fish varies throughout their life cycle due to successive events that act differently on individuals of each sex. Araújo and Gurgel (2002) and Barbieri et al. (2004) reported a predominance of females over males in *Prochilodus cearencis* and *Prochilodus lineatus*, respectively. Godoy (1959) monitored individuals of the genus *Prochilodus* for 10 years and observed a predominance of males over females; Munro (1976) explains that the observed deviations in sex ratios are for the most part a consequence of differentiated growth rates between females and males, which may lead to preferential capture of specimens of one of the sexes on a larger or smaller scale.

Fish reproduction activity is a result of relationships established between populations and local environmental parameters such as temperature, photoperiod, and floods or rains that function as triggers of biological activity (AMADIO; ROPKE; SANTOS, 2012; RIBEIRO; MOREIRA, 2012; FONTELES FILHO, 1989). Electrical conductivity and total precipitation correlated with the gonadosomatic index, indicating that changes in ion concentrations (electrical conductivity measurement) and the beginning of the rainy season in the region interfere with the reproductive activity of *Prochilodus lacustris*. The electrical conductivity maximum values occurred in November and December of 2015 (455 and 557, respectively), coinciding with low values of rainfall (17.8) and gradual increase in the weight of gonads, indicating the beginning of the sexual maturation period.

In the following months, January and February of 2016, a decrease in electrical conductivity values, increase in rainfall precipitation, and the highest *GSI* values were observed. Therefore, these results indicate that abiotic factors can trigger reproduction and even delimit the reproductive period in entire fish populations (VAZZOLER, 1996). Rainfall and river flooding lead to increased nutrients and dissolved oxygen in the aquatic environment and the emergence of sheltered areas from flooded vegetation, which provide appropriate conditions for the growth and reproduction of most teleosts (BUENO; CHELLAPPA; CHELLAPPA, 2008).

Godoy (1975) studied the species *Salminus maxillosus* and *Prochilodus lineatus*, which are neotropical and migratory fish just as *P. lacustris*, and identified an association

between the beginning of the reproductive period, reduction of electrical conductivity, and increase in rainfall. This same association has been observed in *Hypostomus pusarum* (BUENO; CHELLAPPA; CHELLAPPA, 2008).

Prochilodus lacustris presented a reproductive pattern associated with the region's rainy season.

The results of this study led to the knowledge of the reproductive aspects of the *P. lacustris* population in the Environmental Protection Area in the Baixada Maranhense. Moreover, this study contributes to understanding the influence of environmental parameters on important biological characteristics of the studied species.

The results obtained can serve as a model that will contribute to improving the understanding of the dynamics of the physiological reproductive process of species in lentic environments.

Although additional studies describing other fauna characteristics in this wetland will supplement information, the present study presents a relevant contribution for the development of management policies and subsidies that are fundamental platforms for the management of species conservation and of local fisheries.

REFERENCES

- AGOSTINHO, C. A.; MOLINARI, S. L.; AGOSTINHO, A. A.; VERANI, J. R. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L.) (Osteichthyes, Characidae) do Rio Ivaí, Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, n. 1, p. 31-36, 1984.
- AMADIO, S.; ROPKE, C.; SANTOS, R, N. Efeito das modificações ambientais naturais e antrópicas na reprodução de peixes amazônicos. **Revista Ciência Animal**, v. 22(1), p. 188-196, 2012.
- ARANTES, F. P.; H. B. SANTOS, E.; RIZZO, Y.; SATO; BAZZOLI, N. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. **Animal Reproduction Science**, v.118, n.2-4, p.330-336, 2010.
- ARAÚJO, R.B. Desova e fecundidade em peixes de água doce e marinhos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 9 (2), p. 24-31, 2009.
- ARAÚJO, S.A.; GURGEL, H.C.B. Aspectos da biologia de *Prochilodus cearenses* (Steindachner, 1911) (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Zootecias**. Juiz de Fora, v. 4, n. 1, p. 85-96, 2002.
- BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A.; TEIXEIRA-FILHO, A. R. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatã, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2004.
- BAZZOLI, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: GODINHO, HP.; GODINHO, AL (Eds). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**, Belo Horizonte: PUC Minas, 1ª Ed., 2003, p. 291-306.

- BONCOMPAGNI-JÚNIOR, O.; NORMANDO, F. T.; BRITO, M. F. G.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Pisces: Prochilodontidae) in Sao Francisco River, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n.1, p.132-138, 2012.
- BOND, C.E. **Biology of fishes**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1979. 514p.
- BOWEN, S. H. Detritivory in neotropical fish communities. **Environmental Biology of Fishes**, v.9, p.137-144, 1983.
- BUENO, R.M.X.; CHELLAPPA, S.; CHELLAPPA, N.T. Período reprodutivo do cascudo, *Hypostomus pusalum* (Starks) (Osteichthyes, Loricariidae) e limnologia do açude Marechal Dutra no semiárido Brasileiro. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 19, p. 15-27, 2008.
- BURT, A. et al. The tempo of reproduction in *Hyphessobrycon pulchripinnis* (Characidae) with a discussion on the biology of „multiple spawning“ in fishes. **Environmental Biology of Fishes**, Netherlands, v.22, n.1, p15-27, 1988.
- CARVALHO-NETA, R.N.F.; CASTRO, A.C.L. Diversidade das assembleias de peixes estuarinos na Ilha dos Caranguejos, Maranhão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.41, n.1, p.48-57, 2008.
- CASTRO, R. M. C; VARI, R. P. Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 622. Smithsonian Books. 2004.
- CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Editora Universitária da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003. p. 65-70.
- FLECKER, A. S. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. **Ecology**, v.77, n.6, p. 1845-1854, 1996.
- FONTELES-FILHO, A. A. **Recursos pesqueiros: biologia e dinâmica populacional**. Fortaleza, Imprensa Oficial do Ceará. 296p, 1989.
- FROESE, R. Cube law, condition factor and weight-length relationship: history, metaanalysis and recommendations. **Journal Applied of Ichthyology**, Berlin, v.22, p. 241-253, 2006.
- GODINHO A.L.; KYNARD, B. Migration and spawning of radio-tagged zulega *Prochilodus argenteus* in a dammed Brazilian river. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.135, p.811-824, 2006.
- GODOY, M.P. **Peixes do Brazil**: Sub-ordem Characoidei; Bacia do Rio Mogi –Guassu: Editora Franciscana, 1975. 846p.
- GOMIERO, L.M. & BRAGA, F.M.S. Relação peso-comprimento e fator de condição para *Cichla cf. ocellaris* e *Cichla monoculus* (Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Volta Grande, rio Grande - MG/SP. **Acta Scientiarum**, v.2, n.1, p.79-86, 2003.
- GOULDING, M. Man and fisheries on an Amazon frontier. In: DUMONT, H. J. (Ed.) **Developments in Hydrobiology**: The Hague. W. Junk Publishers, 1981, p.137.

HOJO.Y.; HATTORI.T.A.; ENAMI.T.; FURUKAWA.A.; SUZUKI.K.; ISHII.H.T.; MUKAI.H.; MORRISON.J.H.; JANSSEN.W.G.; KOMINAMI.S.; HARADA.N.; KIMOTO.T.; KAWATO.S. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 and P450 aromatase localized in neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v 101, p. 865–870, 2004.

KING, M. **Fisheries biology, assessment and management**. Oxford: Osney Mead, Fishing New Books, 1995.

LE CREN, E.D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, p. 201-219, 1951.

MATTHEWS, G.V.T. **The Ramsar Convention on Wetlands: Its History and Development**. Gland Switzerland: Ramsar Convention Bureau, 1993.

MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**, p.30, 2011. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

MUNRO, J.J. Aspects of the biology and ecology of Caribbean reef fishes: Mullidae (glat-fishes). **Journal of Fish Biology**, v.9, p.79-97, 1976.

PEREIRA, M. O; CALZA, C.; ANJOS, M.J.; LOPES, R.T.; ARAÚJO, F.G. Metal concentrations in surface sediments of Paraíba do Sul River (Brazil). **Journal Radioanal Nuclear Chemistry**, v. 269, p.707-709, 2006.

PIORSKI, N.M.; CASTRO, A.C.L.; SOUSA-NETO, A.M.; Ichtyofauna from the Cerrado of the southern Maranhão. In: L. BARRETO (Ed.) **North Cerrado of Brazil**. Pelotas: USEB, p. 197-212, 2007. 378p.

PIORSKI, NM. 2010. **Diversidade genética e filogeografia das espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974) e *Prochilodus lacustris* (Steindachner, 1907) no nordeste do Brasil**. PhDthesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2010.

RAMOS, R.O.; PERET, A.C.; RAMOS, S.M.; MELO, J.S.C. Parâmetros reprodutivos do curimatá no rio Mogi-Guaçu. **Revista Ceres**, Viçosa, v.57, n.4, p.520-525, 2010.

RIBEIRO, C. S.; MOREIRA, R. G. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. **Revista da Biologia**, v. 8, p. 58-61, 2012.

RODRIGUES, A. M.; SANTOS R. A.; GIAMAS, M. T. D.; CAMPOS; E. C.; CÂMARA, J. J. C. Tipo de desova e fecundidade do lambari prata *Astyanax schubarti* Britski, 1964 (Pisces, Characiformes, Characidae), na represa de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 22, p. 133-139, 1995.

SOARES, R. R.; ROSA, I. L.; TORELLI, J. Alimentação e crescimento de *Prochilodus brevis* Steindachner, 1874 (Characiformes, Prochilodontidae) no rio Gramame, Paraíba, Brasil. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 12, n.1/2, p.49-60. 1998.

TAVARES-DIAS, M.; M.L. MARTINS.; F.R. MORAES. Relação hepatossômática e esplenosômática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.17, n.1, p.273-281, 2000.

VAZZOLER, A. E. A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1996. 169 p.

WALLACE, R.A.; K. SELMAN. Cellular and dynamic aspect of oocyte growth in teleosts. **Science Zoology**, v. 21, p. 325-343, 1981.

WEST, G. Methods of assessing ovarian development in fishes: a Review. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 41, n.2, p.199 - 222, 1990.

Normas da Revista Ichthyological Exploration of Freshwaters

An international journal for field-orientated ichthyology

Warning

Prospective authors should read carefully the following instructions and follow them when submitting a manuscript. Doing so significantly hastens publication and saves money and efforts. Manuscripts which do not satisfy the instructions below may be rejected at the Editor's discretion and will not be returned.

Submission of manuscripts

The original manuscript should be sent to the Editor, Maurice Kottelat, by e-mail (mkottelat@dplanet.ch). Additional information is requested:

- 1) the name, postal and e-mail addresses, telephone and fax numbers of the corresponding author;
- 2) the names, postal and e-mail addresses of up to four persons outside the authors' institutions who are qualified to review the paper; and
- 3) a statement that the material has not been published and is not considered for publication elsewhere and that it will not be submitted elsewhere unless it is rejected or withdrawn. In submitting a manuscript, the author(s) accept(s) transfer of the copyright to the Publisher.

Pre-submission assistance with manuscripts

Ichthyological Exploration of Freshwater has become an important journal for publication of articles on fish taxonomy. We realise that publication in foreign journals can be a problem for authors whose first language is not English. Editors and reviewers have often provided assistance in correcting manuscripts, but in recent years we observe a sharp decrease in the quality of submitted manuscripts. This results in a sharp increase of the time needed to process manuscripts and it is no longer possible. It is the responsibility of authors to submit manuscripts that are linguistically correct and follow the style of the journal.

If needed, authors should contact a company offering pre-submission editorial services for the revision of text and to bring them is standard acceptable for submission to the journal. The editors will amend your text but of course this will not be an opinion about the quality of the content. The decision on the suitability of a manuscript is the responsibility of the editors.

Co-authors, corresponding author

Authors are those who have played a significant role in designing and conducting the research and in writing the manuscript. Individuals who have only collected data, provided material or financial support, or reviewed the manuscript should be listed in acknowledgments. Honorary authorship is not accepted.

Co-authors should designate a single corresponding author to whom correspondence and proofs will be sent. All correspondence regarding the paper should go through the corresponding author. Correspondence will not be sent to other co-authors and correspondence from other co-authors regarding the manuscript will neither be answered nor taken into consideration.

Format

Files. The manuscript should be submitted in DOC or RTF format only. The text, captions, tables etc. must all be included in the same file. If the manuscript includes only a few illustrations, include them in low resolution in the word file. If the manuscript includes numerous illustrations they must be submitted in a separate PDF file; send all figures in low resolution and with caption in a single file. The files should be less than 8 MB.

Text. All manuscripts are subject to editorial revision before final acceptance for publication. Nothing in the manuscript should be underlined. Titles with numerical series designations are not permitted. Titles should be brief, fewer than 20 words and should indicate clearly the field of study and the group of fishes investigated. All abbreviations should be explained in the Method section (or figure caption when appropriate) or a reference to published explanations should be provided; exceptions are very common abbreviations, such as mm, km, kg, sec, min, yr, vs., SL. Footnotes are not permitted. All measurements must be in metric units. The first page should include: title of the paper, author(s), addresses and abstract, all left justified. The text should be followed by Material Examined (if appropriate), Acknowledgments (if any), Appendix (if any) and Literature Cited, in that order. Keys are desirable in taxonomic papers. They should be dichotomous and not serially indented.

Nomenclature. Names of living organisms should follow the appropriate and current International Codes of Nomenclature. Only formal names of genera and species should be written in italics. Names of authors and publication dates of scientific names should be mentioned once, in introduction or discussion, depending where most convenient, exceptionally as a table; bibliographical references must be included in the Literature cited section. Very old and classical works can be omitted if not absolutely justified.

Language. Manuscripts should be written in English. All papers must have a concise but informative abstract in English. In taxonomic papers, the abstract must include at least clear diagnosis of the new taxa. This maybe omitted for papers including the descriptions of many new taxa; consult the editor first. A second abstract, provided by the author(s), in the language of the country or area concerned by the text is acceptable. A maximum of two abstracts is permitted.

Acknowledgments. Identify individuals by first name(s) and surname. Do not list titles, position or institution. Acknowledge individuals, not positions. Idiosyncrasy and private jokes are not permitted.

Literature cited. Format for Literature Cited is that of the most recent issue. Do not abbreviate the names of journals. For books, give full name of publishing company or institution, and city. Manuscripts in preparation, abstracts, in-house reports and other literature not obtainable through normal library channels cannot be cited. In-press manuscripts can be cited only if they have been formally accepted.

Tables. Tables should be included in the text file, at the end. Use Word format and do not anchor them. Tables must be numbered sequentially with Arabic numerals; they should have concise but self-explanatory headings. Do not insert frames, vertical rules, dotted lines or footnotes. The location of first citation of each table should be clearly indicated in the text.

Figures. Detailed instructions for the preparation of digital images are here: <http://pfeil-verlag.de/div/eimag.php>.

For the submission of new manuscript only low resolution copies are needed. Do not send large files at this stage. Case by case, if needed, we may ask you to send the original files at the time of submission.

All maps, graphs, charts, drawings and photographs are regarded as figures and are to be numbered consecutively and in the sequence of their first citation in the text. When several charts or photographs are grouped as one figure, they must be trimmed and spaced as intended for final reproduction. Each part of such a group figure should be lettered with a lower case block letter in the lower left corner. Where needed, scale should be indicated on the figure by a scale bar.

All illustrations should be designed to fit a width of 68 or 140 mm and a depth no greater than 200 mm. Lettering should be large enough to be easily seen when reduced onto a journal column (68 mm).

If a vector-graphics program is used, the original files saved by this program and all linked files must be submitted. Do not export or save the figure in a different format (for more details see the informations on <http://pfeil-verlag.de/div/dimag.php>).

If line drawings are scanned, the resolution must be 1200 dpi or more and the format must be bitmap (1 pixel = 1 bit).

If halftones are scanned, the resolution should never be lower than 400 dpi, applied to a width of 14 cm, even for photographs designed for column width.

Photographic prints and slides and original drawings must be scanned for submission. We will ask to send the original after acceptance of the manuscript.

Colour illustrations should preferably be submitted as slides (photographic slides, not slides prepared by a printer). Digital images should be only unmodified (raw) data files as originally saved by the camera or the scanner. If the data files are modified, a copy of the original, unmodified file should be submitted too.

The decision to print in colour or in black and white any figure originally submitted in colour remains with the editor and publisher. This decision will be based on scientific justification, quality of the original, layout and other editorial, financial and production constraints. By submitting colour originals, the authors know and accept that they may be published in black and white.

Review

Each manuscript will be sent to two reviewers for confidential evaluation. When justified, the reviewer's comments will be forwarded to the corresponding author. When submitting a revised manuscript, authors should briefly indicate the reasons for disregarding any suggestion they consider unacceptable. Remember that if a reviewer had questions or did not understand you, other readers may make the same experience and the answers should be in the manuscript and not in a letter to the editor. Changes in style, format and layout requested by the Editor are non-negotiable and non-observance will result in rejection of the manuscript.

Revised manuscripts received more than 6 months after the reviewers' comments had been sent will not be considered or will be treated as new submissions.

Proofs, Reprints and Page Charges

A PDF proof file will be sent to the corresponding author; it should be checked and returned to the Editor within one week.

Use the following form to send the corrections to the Editor: IEF-Proof-Corrections

If corrections are not received within this delay, they may be done by the Editor, at the author's risks. Authors may be charged for any changes other than printer's error. Reprint orders must be forwarded with the corrections. The corresponding author is responsible for contacting the co-authors and forwarding their reprint orders.

The authors will receive a PDF file for personal use free of charge; high-resolution PDF files for unlimited use may be ordered. There will be no page charges and no charges for justified colour illustrations.

6 CONCLUSÃO

- A espécie *Prochilodus lacustris* demonstrou ser uma excelente espécie bioindicadora, uma vez que apresentou sensibilidade em diferentes níveis biológicos, por meio dos biomarcadores analisados;
- A avaliação histopatológica de brânquias e fígados, assim como a frequência de micronúcleos em *Prochilodus lacustris*, permitiu concluir que as respostas encontradas estão relacionadas à ação de substâncias xenobióticas e genotóxicas existentes no corpo hídrico, Lago Açu;
- O presente estudo evidenciou que existe uma variação significativa na intensidade e ocorrência dos biomarcadores analisados, entre os pontos de amostragem, onde o ponto S3 mostrou-se como o mais vulnerável ambientalmente, devido às substâncias químicas ali presentes, a posição do ponto amostral em relação ao distrito municipal com influência direta da ocupação urbana, e/ou ao material biológico que é lançado diariamente nessa área, oriundo do descarte “in natura” de peixes e mariscos da comercialização pesqueira na margem do lago. Diferenciando expressivamente a estação em termos de qualidade ambiental;
- As alterações observadas no tecido branquial e no tecido hepático indicaram comprometimento das funções desses órgãos, após a identificação de lesões com alto grau de severidade e de caráter irreversível;
- A análise dos danos ao DNA por meio da frequência de micronúcleos (%MN) e as identificação das alterações nucleares (NA), revelaram que o Lago Açu apresenta um padrão de genotoxicidade diferenciado na escala espacial, porém sem alterações significativas entre o período chuvoso e o de estiagem;
- O uso integrado de diferentes biomarcadores demonstrou resultados convergentes, confirmando a importância desse tipo de análise para o diagnóstico da qualidade de ambientes aquáticos;
- Ao longo do período amostral observou-se predominância de fêmeas em relação aos machos em tamanho, peso e proporção sexual. A população mostrou um crescimento alométrico negativo ($b < 3$) em ambos os sexos, indicando que a espécie possui incremento em peso menor do que em comprimento;
- Os melhores indicativos para o período reprodutivo para *P.lacustris* foram os picos nos valores da relação gonadossomática coincidindo com os maiores resultados da relação hepatossomática e menores valores do fator de condição,

bem como com a frequência de indivíduos em estágios mais avançados de maturação;

- Determinou-se que o ciclo reprodutivo da espécie ocorre entre novembro e janeiro, com pico reprodutivo no mês de janeiro. E a desova da espécie é do tipo periódica, com picos reprodutivos durante a estação chuvosa da região;
- Encontramos algumas diferenças nos parâmetros físico-químicas entre as estações de amostragem, sendo que a maioria dos parâmetros esteve dentro dos valores recomendados com base na legislação brasileira. Quanto a reprodução da espécie, ficou evidente uma associação entre os valores do índice gonadosomático de ambos os sexos, a condutividade elétrica e a precipitação pluviométrica, demonstrando assim, que a reprodução de *P.lacustris* é conduzida a partir das relações estabelecidas com as variáveis ambientais durante o ano;
- Por fim, diante de todos os aspectos avaliados, pode-se concluir que, trabalhos contínuos devem ser realizados para uma completa avaliação sobre a qualidade química e biológica dos lagos em toda a região da Baixada Maranhense, principalmente nos ambientes com um alto grau ocupação urbana, expressiva expansão agrícola ou áreas com grandes empreendimentos instalados, onde a poluição hídrica tende a ser agravante.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M. Biological indicators of stress in fish. Bethesda, Md. **American Fisheries Society**, v.1, p. 190-199, 2002.
- ADAMS, S. M.; CRUMBY, W. D.; GREELEY, M. S.; SHUGART, L. R.; SYLOR, C. F. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.24, p.347-360, 1992.
- AGOSTINHO, A.A.; BARBIERI, G.; VERANI, J. R.; HAHN, N. S. Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis áspera* (Agassiz, 1892) (Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR. **Ciência e Cultura**, v.42, n°9, p.711-714, 1990.
- AGOSTINHO, C. A.; MOLINARI, S. L.; AGOSTINHO, A. A.; VERANI, J. R. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L.) (Osteichthyes, Characidae) do Rio Ivaí, Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, n. 1, p. 31-36, 1984.
- AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.
- ALBA-TERCEDOR, Javier. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. **IV Simposio del Agua em Andalucia (SIAGA)**, Almeria-Espanha, vol. II: 203-213, 1996.
- AMADIO, S.; ROPKE, C.; SANTOS, R, N. Efeito das modificações ambientais naturais e antrópicas na reprodução de peixes amazônicos. **Revista Ciência Animal**, v. 22(1), p. 188-196, 2012.
- ARANTES, F. P.; H. B. SANTOS, E.; RIZZO, Y.; SATO; BAZZOLI, N. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. **Animal Reproduction Science**, v.118, n.2-4, p.330-336, 2010.
- ARAÚJO, R.B. Desova e fecundidade em peixes de água doce e marinhos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 9 (2), p. 24-31, 2009.

ARAÚJO, S.A.; GURGEL, H.C.B. Aspectos da biologia de *Prochilodus cearenses* (Steindachner, 1911) (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Zootecias**. Juiz de Fora, v. 4, n. 1, p. 85-96, 2002.

AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 817-834, 2004.

AYAS, Z.; EKMEKCI, G.; OZMEN, M.; YERLI, S. V. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Tukey. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 242-249, 2007.

BAGGERMAN, B. Sticklebacks. In: **Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences**, A. D. Munro, A. P. Scott, T. J. Lam (eds.), CRC Press, Boca Raton, 79–107, 1990.

BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A.; TEIXEIRA-FILHO, A. R. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2004.

BARBOUR, M.T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B.D.; STRIBLING, J.B. **Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish**. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C, 1999.

BASTOS, I.C.O.; LOVO, I.C.; ESTANISLAU, C.A.M.; SCOSS, L.M. Utilização de bioindicadores em diferentes hidrossistemas de uma indústria de papeis reciclados em Governador Valadares-MG. **Revista de Engenharia Sanitária**, v.11, p.203- 211, 2006.

BAZZOLI, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: GODINHO, HP.; GODINHO, AL (Eds). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**, Belo Horizonte: PUC Minas, 1ª Ed., 2003, p. 291-306.

BENINCÁ, C. **Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho – Jaguaruna (SC) e Santa Marta – Laguna (SC); utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae)**.

2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.
- BONCOMPAGNI-JÚNIOR, O.; NORMANDO, F. T.; BRITO, M. F. G.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Pisces: Prochilodontidae) in Sao Francisco River, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n.1, p.132-138, 2012.
- BOND, C. E. **Biology of fishes**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1979. 514p.
- BOWEN, S. H. Detritivory in neotropical fish communities. **Environmental Biology of Fishes**, v.9, p.137-144, 1983.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. Brasília: CODEVASF/Câmara dos Deputados, 1984.147p.
- BUCKER, A.; CARVALHO, M. S.; CONCEIÇÃO, M. B.; ALVES-GOMES, J. A. Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, n.1, p. 65-73, 2012.
- BUENO, R.M.X.; CHELLAPPA, S.; CHELLAPPA, N.T. Período reprodutivo do cascudo, *Hypostomus pusalum* (Starks) (Osteichthyes, Loricariidae) e limnologia do açude Marechal Dutra no semiárido Brasileiro. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 19, p. 15-27, 2008.
- BURT, A. et al. The tempo of reproduction in *Hyphessobrycon pulchripinnis* (Characidae) with a discussion on the biology of „multiple spawning“ in fishes. **Environmental Biology of Fishes, Netherlands**, v.22, n.1, p15-27, 1988.
- CAMARGO, A. F. M.; VALENTINI, W. C. Características físicas e químicas da água. In: CASTAGNOLLI, N.; PINTO, M. L. G. **Piscicultura**. Jaboticabal: UNESP/CA, 1990, p. 8-13

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n.3, p. 327-336, 2007.

CAMPANA, M.A.; PANZERI, A.M.; MORENO, V.J.; DULOUT, F.N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 438, n. 2, p. 155-161, 1999.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; AND MYERS, M.S. An assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n.11, p. 2123–2136, 1990.

CARROLA, J.; SANTOS, N.; ROCHA, M. J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; PARDAL, M. A.; MONTEIRO, R. A. F. M.; ROCHA, E. Frequency of micronuclei and of other nuclear anomalies in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego Douro and Ave estuaries – Portugal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n.9, p. 6057-6068, 2014.

CARVALHO-NETA, R.N.F.; CASTRO, A.C.L. Diversidade das assembleias de peixes estuarinos na Ilha dos Caranguejos, Maranhão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.41, n.1, p.48-57, 2008.

CASTRO, R. M.C.; R. P. VARI. Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n.622, p.1 – 189, 2004.

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 65-70.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, n.655, p.41-46, 2008.

CAZENAVE, J., BACCHETTA, C., PARMA, M. J., SCARABOTTI, P. A., WUNDERLIN, D. A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allo

assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina).

Environmental Pollution, v. 157, n.11, p. 3025-3033, 2009.

CHANG, C.; SIBLEY, T.H.; Accumulation and transfer of copper by *Oocystis pusilla*.

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, n.50, p.689–695, 1993.

COSSINS, A.; CRAWFORD, D. L. Fish as models for environmental genomics.

Nature. Washington, v. 6, p. 324- 340, 2005.

COSTA NETO, J.P. **Bases limnológicas para manejo de tanques de cultivo de peixes - São Carlos**. 1990. 240p. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo São Paulo-SP, 1990.

COSTA, P. M.; CAEIRO, S.; LOBO, J.; MARTIN, M.; FERREIRA, A. M.;

CAETANO, M.; VALE, C.; DELVALLS, T. A.; COSTA, M. H. Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish.

Marine Pollution Bulletin, v. 62, n.1, p. 55-65, 2011.

COSTA, P. M.; DINIZ, M.S.; CAEIRO, S.; LOBO, J.; MARTIN, M.; FERREIRA, A.

M.; CAETANO, M.; VALE, C.; DELVALLS, T. A.; COSTA, M. H. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n.3, p. 202-212, 2009.

D`AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Diclorodifeniltricloroetano)

Toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 995 -1002, 2002.

DE LUCA, S. J.; CASTRO, C. B.; IDE, C. N. Contaminação de chuva e da drenagem pluvial. **Revista Ambiente**, v. 4, n. 1, p. 49-53, 1990.

DIMITRIOU, E.; ZACHARIAS, I. Identifying microclimatic, hydrologic and land use impacts on a protected wetland area by using statistical models and GIS techniques.

Mathematical and Computer Modelling, v. 51, p. 200-205, 2010.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 14, p.81-95, 2000.

FERNANDES, A.F. The use of biomarks in aquatic toxicology studies. **Revista**

Portuguesa de Zootecnia, v.12, p.67-86, 2005.

FERNANDES, M.N.; E A.F. MAZON. Environmental pollution and fish gill morphology. In: VAI, A. L.; B. G. KAPOOR (Eds.) **Fish adaptations**. Enfield: Science Publishers, 2003. p. 203-231.

FLECKER, A. S. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. **Ecology**, v.77, n.6, p. 1845-1854, 1996.

FONTELES-FILHO, A. A. **Recursos pesqueiros: biologia e dinâmica populacional**. Fortaleza, Imprensa Oficial do Ceará. 296p, 1989.

FOSSI. C.; LEONZIO. C. **Nondestructive biomarkers in vertebrates**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 313, 1993.

FREITAS, C. E. C.; SIQUEIRA- SOUZA, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da Bacia Amazônica. **Revista Afrogeoambiental**, v. 1 (2), p. 39-45, 2009.

FRIBERG, N.; BONADA, N.; BRADLEY, D. C.; DUNBAR, M. J.; EDWARDS, F. K.; GREY, J.; HAYES, R. B.; HILDREW, A. G.; LAMOUREUX, N.; TRIMMER, M.; WOODWARD, G. Biomonitoring of human impacts in natural ecosystems: The good, the bad, and the ugly. **Advances in Ecological Research Journal**, v. 44, p.1-68, 2011.

FROESE, R. Cube law, condition factor and weight-length relationship: history, metaanalysis and recommendations. **Journal Applied of Ichthyology**, Berlin, v.22, p. 241-253, 2006.

GERNHOFER, M.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M.; MULLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 241 – 260, 2001.

GODINHO A.L.; KYNARD, B. Migration and spawning of radio-tagged zulega *Prochilodus argenteus* in a dammed Brazilian river. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.135, p.811-824, 2006.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 351-360, 2007.

GODOY, M.P. **Peixes do Brazil**: Sub-ordem Characoidei; Bacia do Rio Mogi –Guassu: Editora Franciscana, 1975. 846p.

GOMIERO, L.M. & BRAGA, F.M.S. Relação peso-comprimento e fator de condição para *Cichla cf. ocellaris* e *Cichla monoculus* (Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Volta Grande, rio Grande - MG/SP. **Acta Scientiarum**, v.2, n.1, p.79-86, 2003.

GOULDING, M. Man and fisheries on an Amazon frontier. In: DUMONT, H. J. (Ed.) **Developments in Hydrobiology**: The Hague. W. Junk Publishers, 1981, p.137.

GRISOLIA, C.K.; PALHARES, D. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomicin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.3, p.281-284, 2002.

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. CRC press, 245 pp. Florida, USA. 1987.

HILSDORF, A.W.S.; PETRERE JR., M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, v. 30 (180), p. 62-65, 2002.

HILTON, D. E.; COUCH, J. A. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. **Fish Ecotoxicology**, v. 86, p. 141-164, 1998.

HINTON, D. E.; P. C. BAUMANN.; G. R. GARDNER.; W. E. HAWKINS.; J. D. HENDRICKS.; R. A. MURCHELANO & M. S. OKIHIRO. 1992. Histopathologic biomarkers. In: HUGGET, R.; R. KIMERLE, P.; MEHRLE & H. BERGMAN (Eds.) **Biomarkers – biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, p.155-195, 1992.

HINTON, D.E.; D.J. LAUREN. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: MCARTHY, J.F.; L.R. SHUGART (Eds.) **Biomarkers of Environmental Contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 51-65, 1990.

HOAR, W.S.; RANDALL D.J; DONALDSON E.M. In: HOAR, W.S. **Fish physiology reproduction**. Part A- Endocrine Tissues and Hormones, Academic Press, p. 223- 275, New York, 1983.

HOJO.Y.; HATTORI.T.A.; ENAMI.T.; FURUKAWA.A.; SUZUKI.K.; ISHII.H.T.; MUKAI.H.; MORRISON.J.H.; JANSSEN.W.G.; KOMINAMI.S.; HARADA.N.; KIMOTO.T.; KAWATO.S. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 and P450 aromatase localized in neurons.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v 101, p. 865–870, 2004.

IBAÑEZ, M. S. R.; CAVALCANTE, P. R. S.; COSTA NETO, J. P.; BARBIERI, R.; PONTES, J. P.; SANTANA, S. C. C.; SERRA, C. L. M.; NAKAMOTO, N.; MITAMURA, O. Limnological characteristics of three aquatic systems of the pré-amazonian floodplain, Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). **Aquatic ecosystem health and management**, v.3, p. 521-53, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico**. 2010. Disponível em: < <http://cod.ibge.gov.br/19DL>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

IBGE. Perfil dos municípios brasileiros. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/perfildosmunicipios>>. Acesso em: 14 set. 2015.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. **Estações de dados**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

IP C.C.; X.D. LI.; G. ZHANG.; C.S.C. WONG.; W.L. ZHANG. Heavy metal and Pb isotopic compositions of aquatic organisms in the Pearl River Estuary, South China. **Environmental Pollution**, v.138, p. 494–504, 2005.

ISAAC-NAHUM, V. J. & VAZZOLER, A. E. A. DE M. Biologia reprodutiva de *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Teleostei, Scianidae), 1. Fator de condição como indicador do período de desova. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 32(1), p. 63-69, 1983.

JABEEN, G. **Studies on fish species specific metals bioaccumulation patterns in relation to water, sediments, plankton and fish in the river Ravi, Pakistan**. 2011. 184 p. PhD Thesis, Department of Zoology, Wildlife and Fisheries, University of Agriculture Faisalabad (UAF), Faisalabad, Pakistan, 2011.

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

KING, M. **Fisheries biology, assessment and management**. Oxford: Osney Mead, Fishing New Books, 1995.

- LAFONTAINE, T. C. **Implicações ambientais e territoriais: socioeconomia da construção da MA 014 para a Microrregião da Baixada Maranhense**. 2011. 108f. Dissertação (Mestrado em Geografia), Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2011.
- LAM, W. G.; WONG, M. K.; CHEN, N., SIN, Y. M. Effect of combined copper, zinc, chromium and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major*. **Aquaculture**, v. 131, p. 219-230, 1995.
- LE CREN, E.D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, p. 201-219, 1951.
- LEÃO, E.L.M.; LEITE, R.G.; CHAVES, P.T.C.; FERRAZ, R. Aspectos da reprodução, alimentação e parasitofauna de uma espécie rara de piranha, *Serrasalmus altuvei* Ramirez, 1965 (Pisces Serrasalminidae) do baixo rio Negro. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 51(3), p. 545- 553, 1991.
- LEONARDI, M.; TARIFEÑO, E. VERA, J. Diseases of the Chilean flounder, *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867), as a biomarker of marine coastal pollution near the Itata River (Chile): Part II. Histopathological lesion. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 546-556, 2009.
- LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; CALASI, A.; GIORDANO, M.E.; SCHETTINO, T. Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. **BioMedical Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- LOPES-POLEZA, S. D. C. **Avaliação do efeito do metilmercúrio (CHHg+) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios Cometa e Micronúcleo**. 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- LOWE-MCCONNELL, R.H. 1999. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. 1º ed. São Paulo: EDUSP, 584p.
- LUNA, L.G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3.ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258p.

- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences**, v.42, p.630-648, 1985.
- MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. **Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi**. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) A bacia do rio Tibagi. Londrina: 2002. Cap. 29, p. 551 – 577.
- MATSUMOTO, F. E; CÓLUS, I. M. S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 2, p. 489–92, 2000.
- MATTHEWS, G.V.T. **The Ramsar Convention on Wetlands: Its History and Development**. Gland Switzerland: Ramsar Convention Bureau, 1993.
- MCGLASHAN, D. J.; HUGHIES, J. M. Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Diving Range. **Journal of Fish Biology**, v. 59, p. 55-67, 2001.
- MERT, R.; ALAS, A.; BULUT, S.; ÖZCAN, M.M. Determination of heavy metal contents in some freshwater Fishes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 8017-8022, 2014.
- MEYERS, T. R.; HENDRICKS, J.D. **Histopathology**. IN: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Editores). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington: p. 283-331, 1985.
- MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei,Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in fresh water. **Mutation Research**, v. 367, p. 245-251, 1996.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**, p.30, 2011. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

- MONDON, J. A.; DUDA, S.; NOWAK, B. F. Histological, growth and 7-ethoxyresorufin Odeethylase (EROD) activity responses of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* to contaminated marine sediment and diet. **Aquatic Toxicology**, v. 54, n. 3-4, p. 231-247, 2001.
- MORON, S. E.; POLEZ, V. L. P.; ARTONI, R. F.; TAKAHASHI, H. K. Estudo de alterações na concentração de íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida Atrazina. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 27-30, 2006.
- MUNRO, J.J. Aspects of the biology and ecology of Caribbean reef fishes: Mullidae (giat-fishes). **Journal of Fish Biology**, v.9, p.79-97, 1976.
- NEPOMUCENO, J.C.; FERRARI, I.; SPANÓ, M.A.; CENTENO, A.J. Detection of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of *Cyprinus carpio* Exposed to Metallic Mercury. **Environmental and Molecular Mutation**, n. 30, p. 293-297, 1997.
- NOGUEIRA, N. M. C. **Estrutura da comunidade fitoplanctônica, em cinco lagos marginais do Rio Turiaçu, (Maranhão, Brasil) e sua relação com o pulso de inundação**. 2003. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2003.
- NRC. National Research Council. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. **Environmental Health Perspectives**, v. 1, p. 74, 1987.
- OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, vol. 567, n. 2-3, p. 109-149, 2004.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 1, p. 53-69, 2005.
- OLIVEIRA, M. M. **Potencial da Acetilcolinesterase cerebral de peixes marinhos como biomarcadora de exposição a pesticidas**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2000.

- OSSANA, N. A.; EISSA, B. L.; SALIBIAN, A. Cadmium bioconcentration and genotoxicity in the common carp (*Cyprinus carpio*). **Internation Journal of Environmental and Health**, v. 3, p. 302-309, 2009.
- PACHECO, A.O.; HACKEL, C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1675–83, 2002.
- PANTALEÃO, S. M.; ALCANTARA, A. V.; ALVES, J. P.; SPANO, M, A. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japarutuba river in Brazil. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 47 (3), p. 219-224, 2006.
- PEAKALL, D. W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v. 1, p. 55-60, 1994.
- PEREIRA, M. O; CALZA, C.; ANJOS, M.J.; LOPES, R.T.; ARAÚJO, F.G. Metal concentrations in surface sediments of Paraíba do Sul River (Brazil). **Journal Radioanal Nuclear Chemistry**, v. 269, p.707-709, 2006.
- PEREIRA, P.; DE PABLO, H.; VALE, C.; PACHECO, M. Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metal-contaminated coastal system—gills reflect environmental contamination. **Marine Environmental Research**, v.69, n.2, p. 53–62, 2010.
- PIORSKI, N.M.; CASTRO, A.C.L.; SOUSA-NETO, A.M.; Ichthyofauna from the Cerrado of the southern Maranhão. In: L. BARRETO (Ed.) **North Cerrado of Brazil**. Pelotas: USEB, p. 197-212, 2007. 378p.
- PIORSKI, NM. 2010. **Diversidade genética e filogeografia das espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974) e *Prochilodus lacustris* (Steindachner, 1907) no nordeste do Brasil**. PhDthesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2010.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V.; Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. (Eds.) **Sublethal and Chronic effects of Pollutants on Freshwater Fish**. Cambridge: Cambridge University. Press, p. 339-352, 1994.
- PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v. 97, p. 287-292, 2005.

RABELLO-GAY, M.N. Teste de micronúcleo em medula óssea. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.) **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. P.83-90.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 147-156, 2005.

RAMOS, R.O.; PERET, A.C.; RAMOS, S.M.; MELO, J.S.C. Parâmetros reprodutivos do curimatá no rio Mogi-Guaçu. **Revista Ceres**, Viçosa, v.57, n.4, p.520-525, 2010.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp. B e A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri-UFPR)**. 2007. 127f. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES – DIAS, M.; EGAMI, M.I., **Métodos para análise hematologia de peixes**. 1ª ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2013. 29p.

RIBEIRO, C. S.; MOREIRA, R. G. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. **Revista da Biologia**, v. 8, p. 58-61, 2012.

RIBEIRO, M. C. L. B.; PETRERE JUNIOR, M. Fisheries ecology and management of the jaraqui (*Semaprochilodus taeniurus*, *S. insignis*) in Central Amazonian. **River Research and Applications**, v.5, p. 195-205, 1990.

ROCHA, A.C.P.V. **Biologia reprodutiva de cinco espécies ornamentais de *Apistogramma* (Teleostei: cichlidae) da reserva de desenvolvimento sustentável Amanã-Amazonas**. 2009. 99p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Instituto de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

RODRIGUES, A. M.; SANTOS R. A.; GIAMAS, M. T. D.; CAMPOS; E. C.; CÂMARA, J. J. C. Tipo de desova e fecundidade do lambari prata *Astyanax schubarti*

Britski, 1964 (Pisces, Characiformes, Characidae), na represa de Ibatinga, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 22, p. 133-139, 1995.

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoato 500. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, p. 441-450, 1998.

SANTOS, C. A.; D. LENZ, G.; P. BRANDÃO, A. R.; CHIPPARI-GOMES, L. C. Acute toxicity of the water-soluble fraction of diesel in *Prochilodus vimboides* Kner (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v.11, n.1, p. 193-198, 2013.

SANTOS, E.P. **Dinâmica de populações aplicada à pesca e piscicultura**. Hucitec, São Paulo, 129 p. 1978.

SANTOS, G. M. Caracterização, hábitos alimentares e reprodutivos de quatro espécies de “aracus” e considerações sobre o grupo no lago Janauacá, AM. (Characoidei). **Acta Amazonica**, v. 12(4), p. 713-739, 1982.

SCHULZ, U.H.; MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brasil. **Brazilian Journal Biology**, v.61, n.4, p.1-8, 2001.

SCHWAIGER, J.; R. WANKE, S.; ADAM, M. PAWERT.; W. HONNEN.; R. TRIEBSKORN. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v.6, p.75-86, 1997.

SERIANI, R.; ABESSA, D.; KIRSCHBAUM, A. A.; PEREIRA, C. D. S.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ASSUNÇÃO, A.; SILVEIRA, F. L.; ROMANO, P.; MUCCI, J. L. N. Water toxicity and cyto-genotoxicity biomarker in the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n.2, 2012.

SERIANI, R.; ABESSA, D.; MOREIRA, L. B.; CABRERA, J. P.; SANCHES, J. Q.; SILVA, C. L.; CARVALHO-OLIVEIRA, R. In vitro mucus transportability, cytogenotoxicity, and hematological changes as non-destructive physiological biomarkers in fish chronically exposed to metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 162-168, 2015.

- SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, MJT.; SILVA-SOUZA, ÂT.; NAPOLEÃO, SR. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.33, p.107, 2011.
- SILVA, A. C; MOURA, E. G. Atributos e especificidades de solos de baixada no Trópico Úmido. In MOURA, E. G. (org.). **Agroambientes de Transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil**. São Luís: UEMA, 2004.
- SOARES, R. R.; ROSA, I. L.; TORELLI, J. Alimentação e crescimento de *Prochilodus brevis* Steindachner, 1874 (Characiformes, Prochilodontidae) no rio Gramame, Paraíba, Brasil. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 12, n.1/2, p.49-60. 1998.
- SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. **Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo**. In: Congresso Brasileiro de Pesquisa e desenvolvimento em Petróleo e Gás, 4, Campinas, 2007.
- STACEY, N. E. Control of timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. In: G. W. POTTS; R. J. WOOTON (Eds). **Fish reproduction: strategies and tactics**. London: Academic Press, 1984, cap. 12, p. 207-222.
- STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, n. 2, p. 137-159, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; M.L. MARTINS.; F.R. MORAES. Relação hepatossômica e esplenosômica em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.17, n.1, p.273-281, 2000.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características Hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p.107-114, 2003.
- TAYLOR, B. W.; FLECKER, A, S.; HALL JUNIOR, R. O. Loss of a Harvested Fish Species Disrupts Carbon Flow in a Diverse Tropical River. **Science**, v. 313, 2006.
- TEMPRANO, J.; ARANGO, O.; CAGIAO, J.; SUÁREZ, J.; TEJERO, I. Stormwater quality calibration by SWMM; A case study in Northern Spain. Disponível em: <<http://www.wrc.org.za>>. Acesso em: 10 de nov de 2016.

- TYLER, G. **AA or ICP – Which do you choose?** ICP Instruments at work. Varian, Optical Spectroscopy Instruments. Australia, 1991.
- ÜNLÜ E.; GÜMGÜM B. Concentrations of copper and zinc in fish and sediments from the Tigris River in Turkey. **Chemosphere**, v. 26, n.11, p.2055–2061, 1993.
- VAN DER OOST, R.; J. BEYER.; N. P. E. VERMEULEN. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.
- VAZZOLER, A. E. A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá: EDUEM, 1996. 169 p.
- VIEIRA, E.F., ISAAC, V.J. & FABRÉ, N.N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei: Serrasalminidae), no Baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 29 (4), p.625-638, 1999.
- WALLACE, R.A.; K. SELMAN. Cellular and dynamic aspect of oocyte growth in teleosts. **Science Zoology**, v. 21, p. 325-343, 1981.
- WEST, G. Methods of assessing ovarian development in fishes: a Review. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 41, n.2, p.199 - 222, 1990.
- WETZEL, R.G. **Limnology: Lake and River Ecosystems.** Academic Press, San Diego. 850p. 2001.
- WHITFIELD, J. Vital signs. **Nature**, v. 411, n. 28, p. 989 -990, 2001.
- WINEMILLER, K. O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**, v. 81, p. 225-241, 1989.
- YASSER, A. G.; NASER, M. D. Impact of pollutants on fish collected from different parts of Shatt Al-Arab River: a histopathological study. **Environmental monitoring and assessment**, v. 181, p. 175-182, 2011.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis.** Third editions Prentice-Hall International Editions, New Jersey. 1996.