

**EDNILSE LEME**

***ÁGUA DA REPRESA BILLINGS USADA PARA O CONSUMO  
HUMANO APRESENTA CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS E  
INDUZ PREJUÍZOS COMPORTAMENTAIS E ASTROGLIOSE EM  
ZEBRAFISH***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental

**Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten**

**SÃO PAULO  
2017**

Leme, Ednilse.

Água da Represa Billings usada para o consumo humano apresenta contaminantes microbiológicos e induz prejuízos comportamentais e astrogliose em zebrafish / Ednilse Leme. – 2017.

51 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Modelos Experimentais em Patologia e Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten.

1. Abastecimento de água. 2. Qualidade da água. 3. *Danio rerio*. 4. Ansiedade. 5. Neuroinflamação. I. Kirsten, Thiago Berti (orientador). II. Título.

**EDNILSE LEME**

**ÁGUA DA REPRESA BILLINGS USADA PARA O CONSUMO HUMANO  
APRESENTA CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS E INDUZ PREJUÍZOS  
COMPORTAMENTAIS E ASTROGLIOSE EM ZEBRAFISH**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Patologia  
Ambiental e Experimental da  
Universidade Paulista - UNIP, para  
obtenção do título de Doutor em  
Patologia Ambiental e Experimental

Aprovado em : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

Prof. (a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Ao finalizar mais uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten, pela orientação, colaboração, paciência e atenção durante todo o trajeto deste trabalho.

A todos os colaboradores deste trabalho: Érika P. da Silva (mestranda), Paula S. Rodrigues (mestranda) e Igor R. Silva (IC). Também aos funcionários Wilton e Anderson, pelo apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Eduardo F. Bondan e a Maria F. M. Martins por toda a colaboração nas práticas imuno-histoquímicas.

À Universidade Paulista (UNIP), em especial ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental pela estrutura fornecida (instalações, laboratórios e estrutura geral).

Ao meu amigo Alexandre Queiroz pelo apoio durante esses anos e ajuda no Laboratório CRIARELAB.

Aos professores do Programa de Patologia Ambiental e Experimental, em especial à Profa. Dra. Maria Martha Bernardi e à Profa. Dra. Ivana Barbosa Suffredini pelas ideias na construção e execução do projeto.

Aos professores Maristela Dutra-Correa e João Carlos Shimada Borges pela colaboração.

Aos secretários da Pós-Graduação Christina Rodrigues e Germano Schmidt pela prontidão com que atendiam aos meus pedidos.

A Deus, por me dar força para não desistir dos meus objetivos.

Aos meus pais, Nelson e Eni, pelo amor incondicional e incentivo em todos esses anos de estudos. Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, pelo apoio e carinho.

Aos meus colegas de trabalho pelo apoio e compreensão em especial à coordenadora geral do curso de Ciências Biológicas, Profa. Cristiane J. Furlaneto, e demais coordenadores e professores da UNIP.

Ao Prof. Paschoal L. Armônia e Luiz Felipe Scabar pelo incentivo e ao Prof. Glaucio Celso Luz e demais colegas do Campus Sorocaba pela compreensão e apoio.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me acompanharam e que compartilharam os bons e maus momentos desta jornada.

## PREFÁCIO

Este volume refere-se à tese de Doutorado apresentada como requisito para a defesa de Doutorado perante a Banca Examinadora no Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista.

Segundo as normas do Programa, este trabalho é apresentado na forma de artigo científico de autoria do aluno e organizado de acordo com as exigências do veículo de publicação científica escolhido.

O periódico escolhido para a submissão foi o *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier, ISSN: 0147-6513, sendo o título do manuscrito: “*Billings’s reservoir water used for human consumption presents microbiological contaminants and induces behavior impairments and astrogliosis in zebrafish*”.

## RESUMO

A Represa Billings é o maior reservatório de água da Região Metropolitana de São Paulo, mas somente uma pequena parte é utilizada para o abastecimento de água. Recentemente, a Região Metropolitana de São Paulo enfrentou a maior crise hídrica já documentada. Desse modo, deveríamos considerar a intensificação do uso da represa Billings. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade da água de diferentes pontos da Represa Billings relacionados ao consumo humano (abastecimento de água e pesca): Rio Pequeno, Rio Grande e Bororé. Foram realizados testes microbiológicos e físicos nas amostras de água. Zebrafish foram expostos a estas águas e seus comportamentos foram avaliados. Estudamos também a expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que está relacionada a processos neuroinflamatórios. As amostras de água do Rio Pequeno, Rio Grande e Bororé apresentaram contaminação por *Escherichia coli* e bactérias heterotróficas. As águas do Rio Pequeno induziram prejuízos motores/exploratórios e comportamento tipo-ansiosgênico nos zebrafish. As águas do Bororé induziram comportamentos nos zebrafish relacionados a prejuízos respiratórios (hipóxia) assim como maior resposta de alarme. Os zebrafish expostos às águas do Bororé também apresentaram astrogliose, que parece ter ocorrido em decorrência da alta contaminação por bactérias heterotróficas. Considerando os presentes resultados de contaminação microbiológica e prejuízos comportamentais e astrogliose em zebrafish, as águas do Rio Pequeno, Rio Grande e Bororé deveriam ser consideradas como inaceitáveis para o uso humano na sua forma não tratada. A companhia de saneamento básico deveria considerar processos rigorosos de tratamento microbiológico das águas. A autorização para a pesca no Bororé deveria ser repensada.

**Palavras-chave:** Abastecimento de água; Qualidade da água; *Danio rerio*; Ansiedade; Neuroinflamação.

## SUMÁRIO

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                          | <b>09</b> |
| <b>2. ARTIGO.....</b>                                                              | <b>17</b> |
| <b>Highlights.....</b>                                                             | <b>17</b> |
| <b>Cover Page.....</b>                                                             | <b>18</b> |
| <b>Abstract.....</b>                                                               | <b>19</b> |
| <b>1. Introduction.....</b>                                                        | <b>20</b> |
| <b>2. Materials and Methods.....</b>                                               | <b>22</b> |
| <i>2.1 Ethics statement.....</i>                                                   | <i>22</i> |
| <i>2.2 Billings reservoir water samples.....</i>                                   | <i>23</i> |
| <i>2.3 Physical and microbiological analyses.....</i>                              | <i>24</i> |
| <i>2.4 Animals.....</i>                                                            | <i>24</i> |
| <i>2.5 Behavioral analyzes.....</i>                                                | <i>25</i> |
| <i>2.6 GFAP immunohistochemistry.....</i>                                          | <i>26</i> |
| <i>2.7 Statistical analysis.....</i>                                               | <i>26</i> |
| <b>3. Results.....</b>                                                             | <b>27</b> |
| <b>4. Discussion.....</b>                                                          | <b>35</b> |
| <b>5. Conclusion.....</b>                                                          | <b>38</b> |
| <b>Funding sources.....</b>                                                        | <b>38</b> |
| <b>Acknowledgements.....</b>                                                       | <b>38</b> |
| <b>Conflicts of interest.....</b>                                                  | <b>39</b> |
| <b>References.....</b>                                                             | <b>39</b> |
| <b>Supplementary material.....</b>                                                 | <b>46</b> |
| <b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                | <b>48</b> |
| <b>ANEXO: Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....</b> | <b>49</b> |
| <b>ANEXO: Declaração de revisão ortográfica e gramatical.....</b>                  | <b>50</b> |
| <b>ANEXO: Figura Complementar.....</b>                                             | <b>51</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

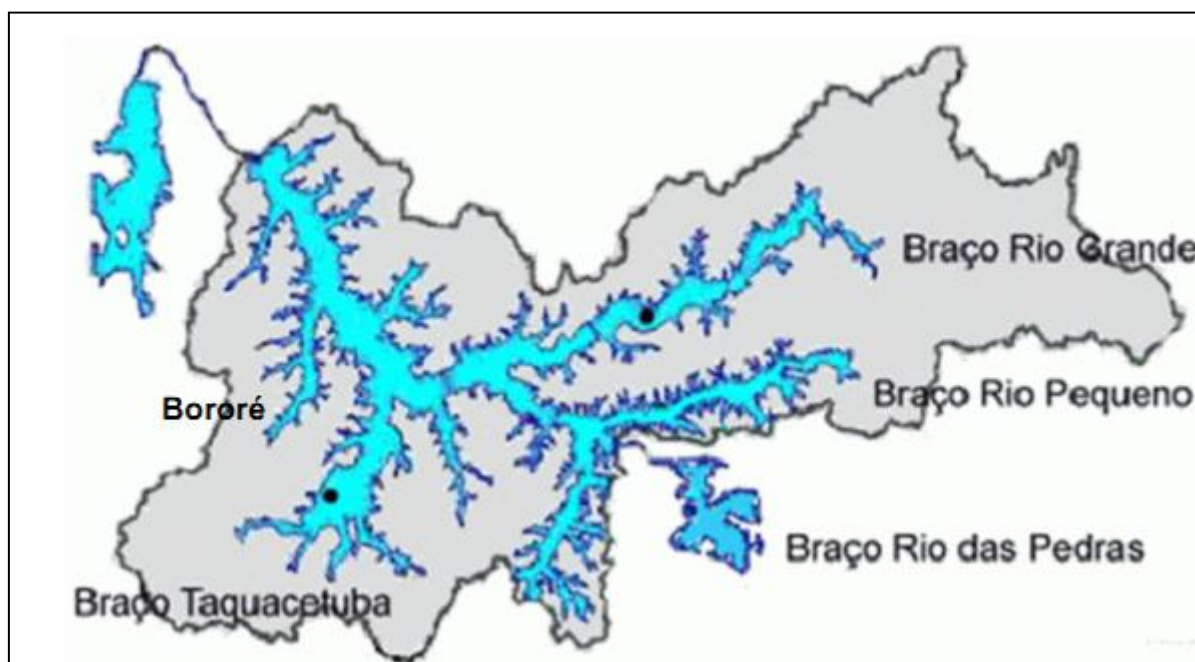
A Represa Billings (Figura 1) localiza-se na Região Metropolitana de São Paulo (23°47'S, 46°40'W), com área de 127 km<sup>2</sup>, volume total de 1228,7 x 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>, com espelho d'água de 10.814,20 hectares e profundidade máxima de 18 metros, sendo considerado o maior reservatório metropolitano de água no Estado de São Paulo (Petrere et al., 2006; Rezende et al., 2014; Wengrat and Bicudo, 2011). Apresenta formato complexo, dendrítico, constituído de um corpo central alongado e estreito, com oito braços: Rio Grande, Rio Pequeno, Capivari, Pedra Branca, Taquacetuba, Bororé, Cocaia e Alvarenga. Faz limites a oeste com a bacia hidrográfica do Guarapiranga e, ao sul, com a Serra do Mar. Seus principais rios e córregos formadores são o Rio Grande ou Jurubatuba, Ribeirão Pires, Rio Pequeno, Rio Pedra Branca, Rio Taquacetuba, Ribeirão Bororé, Ribeirão Cocaia, Ribeirão Guacuri, Córrego Grota Funda e Córrego Alvarenga (Rodrigues et al., 2010; Wengrat and Bicudo, 2011).

A represa foi idealizada na década de 1920 pelo engenheiro Asa W. K. Billings, empregado da extinta concessionária de energia elétrica *Light*, dando origem também ao nome da represa. Inicialmente, a represa tinha o objetivo apenas de armazenar água para gerar energia elétrica para a usina hidrelétrica Henry Borden, em Cubatão (Petrere et al., 2006; Wengrat and Bicudo, 2011). Atualmente possui múltiplos usos, incluindo abastecimento público de água, geração de energia e recreação (Gemelgo et al., 2009; Wengrat and Bicudo, 2011).

Em função do elevado crescimento populacional e industrial da Grande São Paulo, que ocorreu sem planejamento, principalmente ao longo das décadas de 1950 a 1970, a Represa Billings poluiu-se em demasia, devido ao aporte de esgotos doméstico e industrial, incluindo contaminação com metais pesados das indústrias automotivas, metalúrgicas, resíduos agrícolas, etc, e outros, bem como remoção da vegetação do entorno (Gemelgo et al., 2009;

Hortellani et al., 2013). Outro fator determinante da sua poluição excessiva reside no fato de os rios Tietê e Pinheiros terem sido desviados para lá, com o intuito de aumentar a capacidade hidrelétrica de geração de energia (Wengrat and Bicudo, 2011). Por isso, apenas os braços Taquacetuba e Riacho Grande são utilizados para abastecimento de água potável pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP). Atualmente, a represa é responsável pelo abastecimento de 1,6 milhão de pessoas em Diadema, São Bernardo do Campo e parte de Santo André e São Paulo, além de Ribeirão Pires e Rio Grande da Serra. A captação da água para tratamento é feita no braço Rio Grande e são produzidos 4,8 mil litros de água potável por segundo (SABESP, 2015b). Porém, estima-se que a Billings tenha capacidade para fornecer água a cerca de 4,5 milhões de pessoas, o que não ocorre justamente devido à poluição, presença de contaminantes industriais e intensa ocupação irregular nas margens (Wengrat and Bicudo, 2011).

**Figura 1** – Represa Billings (bacia hidrográfica) e seus principais braços



FONTE: adaptado de [http://ecologia.ib.usp.br/porta/index.php?option=com\\_content&view=article&id=163&Itemid=462](http://ecologia.ib.usp.br/porta/index.php?option=com_content&view=article&id=163&Itemid=462), acesso em 18/10/2017

Além do consumo de água, a pesca amadora e comercial é bastante praticada na represa, com uma produção pesqueira (Petrere et al., 2006; Rocha et al., 1985). Essas águas abrigam diversas espécies de peixes, como tilápias, lambaris, carpas, traíras, saguirus e acarás, porém, devido à poluição, essa prática torna-se igualmente preocupante e muitas vezes condenada (Petrere et al., 2006; Rocha et al., 1985).

Se, há anos, muitos consideravam água um bem em abundância em São Paulo, a ponto de subjugar o uso da Represa Billings, essa ideia vem sendo drasticamente repensada. Nos últimos anos, vivemos a maior crise hídrica já registrada. Em julho de 2014, o volume útil do Sistema Cantareira se esgotou. A cidade é bastante dependente deste sistema, que atende 8,8 milhões de pessoas na Grande São Paulo. Desde 2013, a chuva já estava abaixo da média na região. Nos primeiros três meses de 2014, o índice de precipitação atingiu valores inferiores à metade do esperado para o período; um grande contraste com o que ocorrera dois anos antes, quando as precipitações fizeram o sistema operar com um nível superior a 100% (Dobrovolski and Rattis, 2015; Sousa and Silva, 2014). Segundo o Climatempo, em junho de 2015, o Sistema Cantareira operou com 20,1%, já somado o volume da reserva técnica; o Sistema Alto Tietê, que abastece 4,5 milhões de habitantes da Grande São Paulo e parte da capital, operou com 21,3% (Climatempo, 2015).

Somado à redução da chuva, a população da capital cresceu de 4,8 milhões em 1960, para 11,8 milhões em 2013, sem contar o crescimento das outras cidades da Região Metropolitana. Além disso, acrescenta-se a urbanização, que vem aumentando a poluição dos rios e dificultando o acesso à água potável, a verticalização, a impermeabilização do solo, a falta de planejamento, a sobrecarga do sistema de abastecimento e coleta, etc. Um dado alarmante é que 31,8% da água tratada em São Paulo se perde no caminho entre a distribuidora e as torneiras das casas (SABESP, 2016).

Esse cenário caótico levou a Sabesp a usar o volume morto do Sistema Cantareira, Porém, essas são estratégias paliativas, que garantem apenas uns poucos meses de água. Outras medidas como diminuição da pressão da água do abastecimento e descontos para clientes que diminuíssem o consumo também têm sido realizadas. Ainda assim, moradores de diversos pontos da região têm enfrentado períodos de desabastecimento, embora não exista oficialmente racionamento ou rodízio.

Mesmo que chova mais do que qualquer meteorologista é capaz de prever e que a população compreenda a necessidade urgente de uma redução drástica no consumo de água, ainda é preciso haver um plano de gestão mais eficiente. A recuperação do nível do Sistema Cantareira pode levar até 10 anos. Enquanto isso, a população vai continuar a crescer. Em algumas décadas, pode ser que nem os reservatórios atuais deem conta da demanda (Sousa and Silva, 2014). Portanto, fica claro que a crise hídrica é um problema grave da região; medidas a médio e longo prazo devem ser tomadas. Nesse cenário, destaca-se a intensificação do uso da Represa Billings (Brasil, 2015).

A Represa Billings apresenta um potencial 10 vezes maior como reserva hídrica quando comparada ao Sistema Cantareira, sendo assim apontada por organizações não governamentais como alternativa para o abastecimento da Grande São Paulo (SABESP, 2015a). Desse modo, é necessário rever o uso da Billings como parte de um projeto mais sustentável de abastecimento visando a segurança hídrica. É importante recuperar uma represa que já existe, usar uma fonte de água localizada ao lado da cidade e não gastar bilhões para construir novas represas em locais distantes e que, não necessariamente, trarão os mesmos resultados no tempo necessário. Especialistas afirmam ser prioritária a formulação de um plano de contingência articulado entre a sociedade e os governos federal, estadual e municipal, uma vez que a dependência das precipitações sazonais já demonstrou ser uma estratégia fadada ao fracasso (SABESP, 2015a).

A SABESP tem realizado algumas ações para elevar os índices de coleta, afastamento e tratamento de esgoto no entorno da Billings, melhorando as condições ambientais da represa e a qualidade de vida da população (SABESP, 2015b). Por exemplo, a SABESP tem realizado obras de emergência para socorrer o Sistema Alto Tietê durante os meses de seca e evitar o rodízio oficial (Brasil, 2015; SABESP, 2015a). Entretanto, tal manobra não impede a captação de água poluída da Billings. Isso porque a empresa tem explorado um pequeno braço do manancial que está diretamente ligado ao corpo central da represa e também recebe o esgoto do Rio Pinheiros, localizado na Zona Sul da capital paulista. O objetivo dessa obra, segundo a SABESP, é transferir água do Braço Rio Pequeno da Billings para o Braço Rio Grande. Com isso, a empresa espera reduzir a dependência da Grande São Paulo ao Sistema Cantareira, o manancial mais crítico, que pode até esgotar seus recursos, caso o consumo continue desenfreado (Brasil, 2015). Porém, os recentes projetos e manobras da SABESP motivaram críticas de ambientalistas, além do fato de que tal medida aumentaria o custo de tratamento da água. Assim, a companhia constantemente tem revelado reavaliações e readequações dos projetos e das obras, sem um aparente consenso e/ou solução definitiva para os problemas de desabastecimento.

É de suma importância o monitoramento da qualidade da água das cidades. A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº57/2005 define a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (CETESB, 2006). A partir dos limites apresentados nesta resolução é possível fazer comparações quanto aos limites máximos permitidos para avaliar as condições do ambiente, bem como auxiliar em análises de impactos ambientais (Furtado, 2007). Dentre as variáveis utilizadas pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB, órgão que regulariza as normas e índices de qualidade da água no Estado de São Paulo), está a análise microbiológica que procura, por

exemplo, a presença e concentração de coliformes fecais e de bactérias heterotróficas, que, por transmitirem diversas doenças, são de grande interesse para a saúde pública (Martins, 2011). Microcistinas, cianobactérias tóxicas, também têm sido estudadas neste foco ecotoxicológico (Ramos et al., 2014). A análise microbiológica é de total importância, pois os ambientes aquáticos recebem um aporte de efluentes domésticos oriundos do esgoto sanitário, que apresentam agentes patogênicos nocivos à saúde humana, bem como promovem a contaminação do ambiente (Mehnert, 2003).

O zebrafish, ou *Danio rerio*, é também conhecido popularmente como paulistinha, peixe-zebra, bandeirinha, danio-zebra e bandeira-paulista (Bernardi et al., 2013). É um peixe tropical, teleósteo, cipriniforme, da família dos ciprinídeos, uma espécie ovípara ornamental (Martinez-Sales et al., 2015). Seu uso experimental já está firmemente estabelecido como modelo para o estudo do desenvolvimento de vertebrados e também para investigações de mecanismos cerebrais. Algumas vantagens relacionadas a seu estudo incluem seu pequeno tamanho, ciclo de vida curto, facilidade de cultivo e para produzir mutações relevantes para estudos de saúde e doenças humanas, isso tudo mantendo grande similaridade com relação aos vertebrados “superiores” (Joshua and Lisberger, 2015; Kalueff et al., 2014). Outras vantagens de seu estudo incluem: (1) sangue, rins, e sistema óptico bastante similares aos de humanos; (2) seu genoma é a metade do tamanho do genoma de roedores e humanos, tornando-o valioso na identificação de genes “chave” para os vertebrados; (3) seu genoma já foi totalmente sequenciado; e (4) possui aproximadamente 70% de semelhança genética com os humanos (Joshua and Lisberger, 2015; Kalueff et al., 2014). Por tudo isso, o estudo com zebrafish tem gerado nos últimos anos inestimáveis conhecimentos nas áreas da biologia do desenvolvimento, oncologia, toxicologia, estudos de reprodução, teratologia, genética, neurobiologia, ciências ambientais, medicina regenerativa e teoria evolutiva (Goessling and North, 2014; Hwang and Chou, 2013; Martinez-Sales et al., 2015). Algumas indústrias de

medicamento também já os incluem na linha de testes, bem como para avaliação de contaminantes ambientais (Hill et al., 2005; OECD, 2000; Teraoka et al., 2003; Zon and Peterson, 2005). Incluem-se também alguns estudos de desordens neuropsiquiátricas (p. ex., epilepsia e depressão) e estudos imunes/inflamatórios (Brennan, 2011; Jones and Norton, 2015; Kabashi et al., 2011; Norton, 2013). Especificamente com relação ao comportamento dos zebrafish, existem inúmeros padrões comportamentais similares entre peixes e espécies terrestres, e eles cada vez mais têm sido empregados em estudos na neurociência (Bailey et al., 2013; de Esch et al., 2012). Discussões atuais têm contestado o emprego de roedores na pesquisa, tanto por questões bioéticas, como pelos seus custos de criação (D'Amico et al., 2015; Lieschke and Currie, 2007; McGrath and Li, 2008). Ante as dificuldades técnicas, éticas e de alto custo na manutenção desses animais, atualmente, procuram-se modelos alternativos e complementares para a investigação científica. Assim, é uma tendência internacional a introdução de outras espécies animais não mamíferos, incluindo os peixes, para estudos nas diferentes áreas da ciência.

Sabe-se que os peixes são muito utilizados em testes de toxicidade, pois eles podem metabolizar, concentrar e armazenar os poluentes, apresentando assim, características potenciais na etiologia de doenças, mutagênese, carcinogênese, etc (al-Sabti and Metcalfe, 1995; Martinez-Sales et al., 2015). Além disso, o homem sofre exposições a produtos químicos principalmente por meio da alimentação, e nessa cadeia alimentar os peixes são considerados um dos maiores vetores, pois são responsáveis pela transferência de contaminantes aos humanos (Shibata et al., 2004). Da mesma maneira, alterações comportamentais nos peixes são consideradas os indicadores mais sensíveis e precoces de toxicidade a diversas substâncias, fora o fato de que alterações em funções neurológicas geralmente são expressas comportamentalmente (Eissa et al., 2010; Hill et al., 2005; Teraoka

et al., 2003). Muitos dos modelos comportamentais estabelecidos para mamíferos já foram traduzidos para zebrafish (Hill et al., 2005; Kalueff et al., 2014).

Portanto, devido à recente crise hídrica e ao potencial da Represa Billings, acreditamos ser de suma importância continuar estudando os vários aspectos da água dessa represa. Este trabalho realizou estudos microbiológicos e físicos em amostras de água de diferentes pontos da Represa Billings ligados ao consumo humano: Rio Pequeno, Rio Grande e Bororé, a fim de conhecer de maneira aprofundada a qualidade de suas águas. Além disso, foi avaliada a influência dessas águas no comportamento de zebrafish, um modelo bastante sedimentado para estudos neurotoxicológicos. Os zebrafish foram avaliados quanto a parâmetros motores, exploratórios, de intoxicação, prejuízos no sistema respiratório e expressão de ansiedade (Kalueff et al., 2013). Por fim, foi realizado estudo imuno-histoquímico para marcar células tipo-astrocíticas (proteína glial fibrilar ácida, GFAP), ligadas a parâmetros de neuroinflamação dos zebrafish. Assim, este trabalho objetivou documentar a real situação das águas da Represa Billings, inferindo sobre níveis de contaminação das águas e seus efeitos neurobiológicos em modelos animais. Os presentes resultados podem auxiliar na conscientização dos governantes e gerar políticas de monitoramento e controle maior dos responsáveis pelos danos ambientais.

**Title: Billings' reservoir water used for human consumption presents microbiological contaminants and induces both behavior impairments and astrogliosis in zebrafish**

### **Highlights**

Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé rivers are used for water supply and fishing.

We evaluated the quality of the water from Billings reservoir intended for human use.

Samples presented contamination for *Escherichia coli* and heterotrophic bacteria.

Zebrafish exposed to such water, presented motor and anxiety-like impairments.

Zebrafish also presented respiratory impairments (hypoxia) and astrogliosis.

**Billings' reservoir water used for human consumption presents microbiological contaminants and induces both behavior impairments and astrogliosis in zebrafish**

**Short title: Billings' reservoir, microbiology, and zebrafish behavior**

**Ednilse Leme <sup>a</sup>, Ericka P. Silva <sup>a</sup>, Paula S. Rodrigues <sup>a</sup>, Igor R. Silva <sup>a</sup>, Maria F. M. Martins <sup>a</sup>, Eduardo F. Bondan <sup>a</sup>, Maria M. Bernardi <sup>a</sup>, Thiago B. Kirsten <sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Environmental and Experimental Pathology, Paulista University, Rua Dr. Bacelar, 1212, São Paulo, SP, 04026-002, Brazil

**\* Corresponding author:**

Thiago Berti Kirsten

Environmental and Experimental Pathology, Paulista University, UNIP; Rua Dr. Bacelar 1212, São Paulo, SP, 04026-002, Brazil

Tel: +55 11 5594 3207

Email: [thik@outlook.com](mailto:thik@outlook.com)

## Abstract

The Billings reservoir is the largest water-storage facility in the São Paulo Metropolitan Region, with only a small part of the reservoir used for water supply. Recently, the São Paulo Metropolitan Region has experienced the greatest water collapse ever recorded. Thus, the intensification of use of the Billings reservoir should be considered. The objective of this study was to evaluate the quality of the water from different areas of the Billings reservoir related to human consumption (water supply and fishing): Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé rivers. We performed microbiological and physical studies on water samples. Zebrafish were exposed to such water samples and their behaviors were evaluated. Finally, we studied central glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression, which is related to neuroinflammatory processes. Water samples from Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé presented microbiological contamination for *Escherichia coli* and heterotrophic bacteria. Water from the Rio Pequeno river induced both motor/exploratory impairments and anxiogenic-like behavior in zebrafish. Water from the Bororé river induced behaviors in zebrafish related to respiratory impairments (hypoxia) as well as higher alarm reaction. Zebrafish exposed to water from the Bororé also presented astrogliosis, which seems to have happened in detriment of the high heterotrophic bacterial contamination. Considering the present results of microbiological contaminants and behavior impairments as well as astrogliosis in zebrafish, the water from Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé rivers should be considered unacceptable for human use in their untreated state. Basic Sanitation Company should consider adopting rigorous processes of microbiological water treatment. Authorization for fishing at Bororé river should be reconsidered.

**Keywords:** Water supply; Water quality; *Danio rerio*; Anxiety; Neuroinflammation.

## 1. Introduction

The Billings' reservoir is the largest water-storage facility in the São Paulo Metropolitan Region (Wengrat and Bicudo, 2011). It has an area of 127 km<sup>2</sup>, a total volume of 1228.7 x 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup> with a water surface of 10,814.20 hectares, and a maximum depth of 18 meters (Petrere et al., 2006; Rezende et al., 2014). The complex has a dendritic pattern and elongated and narrow central body with eight arms: Rio Grande, Rio Pequeno, Capivari, Pedra Branca, Taquacetuba, Bororé, Cocaia, and Alvarenga rivers (Rodrigues et al., 2010; Wengrat and Bicudo, 2011). The Billings reservoir was conceived as a water storage for hydroelectric power plant (Petrere et al., 2006). However, currently it has multiple uses, including public water supply, energy generation, amateur and commercial fishing, and recreation (Gemelgo et al., 2009; Rocha et al., 1985; Wengrat and Bicudo, 2011).

Population and industrial growth that occurred in a disorganized and indiscriminate way, polluted the Billings reservoir, including domestic and industrial sewage, such as heavy metals from automotive and metallurgical industries, as well as agricultural residues (Gemelgo et al., 2009; Hortellani et al., 2013). The diversion of the Tietê and Pinheiros rivers to the reservoir to increase the hydroelectric capacity also have significantly contributed to increase the pollution of its waters (Wengrat and Bicudo, 2011). Therefore, only the Taquacetuba and Rio Grande arms are used by the Basic Sanitation Company of the State of São Paulo for drinking water supply (SABESP, São Paulo, Brazil). Currently, the reservoir is responsible for supplying 1.6 million people with drinking water, however, it is estimated that 4.5 million people could be supplied by its waters (SABESP, 2015b; Wengrat and Bicudo, 2011).

Recently, the São Paulo Metropolitan Region has experienced the greatest water collapse ever recorded (Dobrovolski and Rattis, 2015; Sousa and Silva, 2014). In July 2014, the Cantareira System, which serves 8.8 million people, was exhausted. This collapse was influenced by low levels of rainfall (Climatempo, 2015; Dobrovolski and Rattis, 2015), the increase in water consumption due to a huge population growth (from 4.8 million in 1960 to 11.8 million in 2013 in the Sao Paulo city alone), and numerous other consequences of such scenario like the waterproofing of soil. Moreover, 31.8% of the treated water in Sao Paulo is lost on the way between the distributor and the households (SABESP, 2016). These have all contributed to the periods of serious water shortage that the São Paulo Metropolitan Region has been through.

Even if there is more rainfall and the population adheres to a drastic reduction in consumption, a more efficient management plan is badly needed. Today's full reservoirs will not be able to meet the demand in a few years (Sousa and Silva, 2014). Therefore, the water supply collapse is a serious problem in the São Paulo Metropolitan Region making changes in the management plan urgently required. The intensification of use of the Billings reservoir should be considered (Brasil, 2015). The Billings reservoir has a potential 10 times higher as a water reservoir when compared to the Cantareira system, and is specified by non-governmental organizations as an alternative to the supply of the São Paulo Metropolitan Region (SABESP, 2015a).

Zebrafish (*Danio rerio*) has been used as an experimental model for developmental toxicology (Bailey et al., 2013; Hill et al., 2005; Teraoka et al., 2003) including neurotoxicity testing and brain disorders understanding (de Esch et al., 2012; Kalueff et al., 2014). Moreover, behavioral study of zebrafish has been used as toxicity biomarker (Eissa et al., 2010) as well as for translational neuroscience, e.g., to understand neural pathways,

physiological biomarkers, and genetic underpinnings of normal and pathological brain function (Kalueff et al., 2013; Kalueff et al., 2014).

The objective of this study was to evaluate the quality of the water from different areas of the Billings reservoir related to human consumption: Rio Pequeno, Rio Grande and Bororé rivers. Rio Pequeno has been considered a possible point of water collection and supply (Brasil, 2015). Rio Grande is routinely used to supply part of the São Paulo Metropolitan Region. Bororé river is a fishing area. We performed microbiological and physical studies on water samples. Those biomarkers, such as total Coliforms, *Escherichia coli*, heterotrophic plate count bacteria, and microcystin are related to human/animal diseases and environmental contamination (Edberg et al., 1997; Ramos et al., 2014). Moreover, zebrafish were exposed to those water samples and their behavior related to motor, exploratory, intoxication, and respiratory system parameters, as well as anxiety were evaluated (Kalueff et al., 2013). Finally, we studied central glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression (an astrocyte biomarker), which is related to neuroinflammatory processes.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Ethics statement*

The present study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NCR, 2011). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Paulista University, Brazil (Permit Number: 374/15). All efforts were made to minimize suffering, reduce the number of animals used, and utilize alternatives to *in vivo* techniques when available. The experiments were also performed in accordance with good laboratory practice protocols and quality assurance methods.

## *2.2 Billings reservoir water samples*

Water samples from Billings reservoir were collected in three different areas related to human consumption: Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé. These areas are all located in Riacho Grande, São Bernardo do Campo, Sao Paulo, Brazil. Recently, (1) Rio Pequeno has been considered as a possible point of water collection and supply. The project aims to connect Rio Pequeno with Rio Grande (Brasil, 2015). Rio Pequeno water collection was performed near the dam (latitude 23°48'59.076", longitude S 46°31'51.484', 12m deep) on December 6 2016, 8:22 A.M, 19°C. (2) Rio Grande is routinely used to supply Diadema, São Bernardo do Campo, Santo Andre, Sao Paulo, Ribeirao Pires, and Rio Grande da Serra. It has approximately 7.4 km<sup>2</sup> of area and supplies 1.2 million people with water (Gemelgo et al., 2009; Wengrat and Bicudo, 2011). Rio Grande water collection was performed near the dam (latitude 23°46'15.998, longitude S46°31'17.756", 14m deep) on December 13 2016, 8:11 A.M, 21°C. (3) Bororé is a fishing area used by a large community of fishermen for many years, including for commercial purposes (Bazante-Yamaguishi et al., 2015; Petrere et al., 2006). Bororé water collection was performed near the Bororé island (latitude 23°47'37.317', longitude S46°39'05.416", 15m deep) on December 17 2016, 7:40 A.M, 17°C. The reason for electing these three Billings reservoir areas was their connection with human consumption (water and food).

Water samples collection was performed based on guides of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Eaton et al., 2005). Briefly, water was collected in sterile polyethylene 5-liter gallons and sterile conical tubes with asepsis techniques and using personal protective equipment (PPEs). Immediately after water collection, samples were transported to our laboratory with continuous temperature control (thermal boxes) and sun protection.

### 2.3 Physical and microbiological analyses

For the physical and microbiological analysis, we used sterile conical tubes containing 1.8% sodium thiosulphate solution. Studies were performed at CRIRELAB (Sao Paulo, SP) and LABORTECHNIC (Sao Paulo, SP). Water samples were refrigerated ( $2 \pm 1$  °C) for up to 24h before the analysis. The performed tests and their respective standardized methods (Eaton et al., 2005) were: (1) temperature, SMEWW2550B (laboratory and field method); (2) pH, SMEWW4500-H+B (electrometric method); (3) total Coliforms, SM9223B; (4) *Escherichia coli*, SM9222; (5) heterotrophic plate count bacteria, SM9215 A and B; and (6) microcystin kit, Beacon Analytical Systems (Maine, USA). Besides physical and microbiological analysis of Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé (Billings reservoir), water samples from our lab were used as control group (dechlorinated water from Basic Sanitation Company of the State of Sao Paulo (SABESP, Sao Paulo, Brazil); collected on November 28 2016, 8:15 A.M, 21°C

### 2.4 Animals

A total of 104 adult zebrafish (*Danio rerio*), of 4-5 cm and 3-4 months of age were obtained from a commercial breeder (Okani Uwataira-Piscicultura LTDA-EPP, Sao Paulo, Brazil). Zebrafish transportation and water acclimation were based on standard methods (Bernardi et al., 2013). They were housed at Paulista University (Sao Paulo, Brazil). Maintenance glass aquarium of 200L, which was connected to a water biological filtration system with acrylic wool and active charcoal. Dechlorinated water from Basic Sanitation Company of the State of Sao Paulo (SABESP, Sao Paulo, Brazil) was used and maintained at a temperature of  $26 \pm 2$  °C by heaters. pH was  $6.9 \pm 0.1$ . The room had artificial lighting (12-hr light/12-hr dark cycle, lights on at 7:00 AM). The animals were fed with specific zebrafish

chow (sera Vipar Tropical Flakes, Heinsberg, Germany) as recommended by the manufacturer. Every 7 days, 50% of the total water volume was changed.

## *2.5 Behavioral analysis*

Zebrafish were studied for behavior. They were exposed to Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé (Billings reservoir) water samples up to 2h after the water collection. Each group was exposed to different concentrations of Billings reservoir water diluted in control (maintenance) water: 12.5, 25, 50, and 100% ( $n = 8$  per group). Thus, each one of the three studied areas of Billings reservoir had four subgroups (four concentrations), using different zebrafish for each analysis. Control group was evaluated under the same conditions in the maintenance water ( $n = 8$  per group).

Each zebrafish was individually evaluated in a glass aquarium 21 X 10 X 21.5 cm wide. The front wall of the aquarium was divided into nine equal rectangles (7 X 5 cm). The behavioral analysis was initiated immediately after the gentle insertion of the zebrafish into the aquarium with water. The test room was a small room with dim lighting, isolated from the experimenter, with a video camera fitted in front of the aquariums to collect the data, which were analyzed after the end of the experiment. The total time of behavioral analysis was 1h, subdivided into five 1-min sessions: 0-1, 15-16, 30-31, 45-46, and 59-60 min. The following parameters were evaluated: exploratory activity (number of front wall units entered with whole body), surfacing time (time spent in s in the three upper rectangles of the front wall – shallow water), bottom time (time spent in s in the three lower rectangles of the front wall), and erratic movements (number of episodes of sharp changes in direction or velocity and repeated rapid darting; also known as zig-zagging). Those parameters represent different behavioral patterns related to motor and exploratory changes, intoxication, respiratory system

impairments, and anxiety expression and were based on a catalog of zebrafish behavior (Kalueff et al., 2013).

## *2.6 GFAP immunohistochemistry*

Immediately after the 1h-behavioral evaluation, the eight zebrafish from each group were grouped in glass aquariums (20 X 20 X 20 cm, aerated using air compressors) containing the same water samples of the behavioral test. The brains of the zebrafish (n = 4 per group) were collected after spontaneous death or after up to 96h-exposure to each water sample (decapitation). They were fixed in 10% buffered formalin for 48 h. Sagittal sections of each brain were made to reach the brainstem. GFAP immunohistochemistry was performed using the chain polymer-conjugated staining method (Dako EnVision system, Glostrup, Denmark). We used polyclonal rabbit anti-GFAP immunoglobulin (1:50; Z033401, Dako, Glostrup, Denmark) as the primary antibody followed by the EnVision+ Kit (HRP, Rabbit, DAB+, K4011, Dako, Glostrup, Denmark). Two photomicrographs from each individual brainstem section were made using a 40x objective. The area of GFAP+ astrocyte-like cells and their processes, marked in brown, was automatically calculated, in pixels, using Image-ProPlus 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) calibrated with digital color filters that only positive cells were included and background staining was excluded from the measurement.

## *2.7 Statistical analysis*

Homogeneity and normality were verified using the Bartlett's test. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Holm-Sidak multiple comparison test and one-way ANOVA followed by Newman-Keuls's multiple comparison test were used to compare

parametric data. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. In all cases, the results were considered significant at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

Water samples from Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé presented microbiological contamination for *Escherichia coli* and heterotrophic bacteria. Water from the Rio Pequeno river induced both motor/exploratory impairments and anxiogenic-like behavior in zebrafish. Water from the Bororé river induced behaviors in zebrafish related to respiratory impairments (hypoxia) as well as higher alarm reaction. Zebrafish exposed to water from the Bororé also presented astrogliosis, which seems to have happened in detriment of the high heterotrophic bacterial contamination. Considering the present results of microbiological contaminants and behavior impairments as well as astrogliosis in zebrafish, the water from Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé rivers should be considered unacceptable for human use in their untreated state. Basic Sanitation Company should consider adopting rigorous processes of microbiological water treatment. Authorization for fishing at Bororé river should be reconsidered.

*Este volume de tese de doutorado apresenta somente o resumo dos principais resultados obtidos com este estudo. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, [thiago.kirsten@docente.unip.br](mailto:thiago.kirsten@docente.unip.br) ou [thik@outlook.com](mailto:thik@outlook.com)*

#### 4. Discussion

*Este volume de tese de doutorado apresenta somente as conclusões do trabalho, sem sua discussão. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, [thiago.kirsten@docente.unip.br](mailto:thiago.kirsten@docente.unip.br) ou [thik@outlook.com](mailto:thik@outlook.com)*

#### 5. Conclusion

Water samples from Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé (Billings reservoir) presented microbiological contamination for *Escherichia coli* and heterotrophic bacteria. Rio Pequeno water induced both motor/exploratory impairments and anxiogenic-like behavior in zebrafish. Bororé water induced behaviors in zebrafish related to respiratory impairments (hypoxia) as well as higher alarm reaction. Zebrafish exposed to Bororé water presented astrogliosis, which seems to have happened in detriment of the high heterotrophic bacterial contamination found at Bororé water. The three studied areas of the Billings reservoir are directly related to present human consumption (water supply and fishing). But, considering the present results of microbiological contaminants and behavior impairments and astrogliosis in zebrafish, the water from Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé should be considered unacceptable for human use in their untreated presentation. The Basic Sanitation Company should consider rigorous processes of microbiological treatment of water. Authorization for fishing at Bororé should also be reconsidered.

## **Funding sources**

This research was supported by the Paulista University (UNIP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## **Acknowledgements**

The authors are grateful to Wilton Pereira dos Santos (UNIP) for technical support.

## **Conflicts of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest.

## **References**

- al-Sabti, K., Metcalfe, C. D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*. 343, 121-35.
- Bailey, J., et al., 2013. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 99, 14-23.
- Bazante-Yamaguishi, R., et al., Estudo da Contaminação por Metais e Microbiológico da Água Subterrânea (Poços) na Comunidade Pesqueira do Bororé: Sustentabilidade e Educação Voltada ao Saneamento Ambiental no Reservatório Billings (SP). Associação de Turismo da Ilha do Bororé. ATIBORÉ ONG, São Paulo, 2015.

- Bernardi, M. M., et al., 2013. Neurotoxicity of neem commercial formulation (*Azadirachta indica* A. Juss) in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36, 1276-82.
- Brasil, Represa Billings pode ser alternativa de água em SP. Agência Brasil, 2015.
- Brennan, C. H., 2011. Zebrafish behavioural assays of translational relevance for the study of psychiatric disease. *Reviews in the Neurosciences*. 22, 37-48.
- CETESB, Variáveis de qualidade das águas. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Sao Paulo, 2006.
- Climatempo, Nível dos Mananciais 2015. Vol. 2015. Climatempo, São Paulo, 2015.
- D'Amico, D., et al., 2015. Switching to zebrafish neurobehavioral models: The obsessive-compulsive disorder paradigm. *European Journal of Pharmacology*. 759, 142-50.
- de Esch, C., et al., 2012. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. *Neurotoxicology and Teratology*. 34, 545-53.
- Dobrovolski, R., Rattis, L., 2015. Water collapse in Brazil: the danger of relying on what you neglect. *Brazilian Journal of Nature Conservation*. 13, 80-83.
- Eaton, A. D., et al., 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: Centennial Edition*. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Edberg, S. C., et al., 1997. Natural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. II. Indicators and monitoring parameters for parasites. *Critical Reviews in Microbiology*. 23, 179-206.
- Eissa, B. L., et al., 2010. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58, 1032-9.
- Furtado, J. G. C., Estudo de impactos ambientais causados por metais pesados em água do mar na baía de São Marcos: correlações e níveis de background. Dissertação

- (Mestrado em Química Analítica), Faculdade de João Pessoa. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007, pp. 74.
- Gemelgo, M. C., et al., 2009. Population dynamics: seasonal variation of phytoplankton functional groups in brazilian reservoirs (Billings and Guarapiranga, Sao Paulo). *Brazilian Journal of Biology*. 69, 1001-13.
- Goessling, W., North, T. E., 2014. Repairing quite swimmingly: advances in regenerative medicine using zebrafish. *Dis Model Mech*. 7, 769-76.
- Hill, A. J., et al., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*. 86, 6-19.
- Hortellani, M. A., et al., 2013. Assessment of Metal Concentration in the Billings Reservoir Sediments, São Paulo State, Southeastern Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 24, 58-67.
- Hwang, P. P., Chou, M. Y., 2013. Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflugers Arch*. 465, 1233-47.
- Jones, L. J., Norton, W. H., 2015. Using zebrafish to uncover the genetic and neural basis of aggression, a frequent comorbid symptom of psychiatric disorders. *Behavioural Brain Research*. 276, 171-80.
- Joshua, M., Lisberger, S. G., 2015. A tale of two species: Neural integration in zebrafish and monkeys. *Neuroscience*. 296, 80-91.
- Kabashi, E., et al., 2011. Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1812, 335-45.
- Kalueff, A. V., et al., 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*. 10, 70-86.
- Kalueff, A. V., et al., 2014. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*. 35, 63-75.

- Lieschke, G. J., Currie, P. D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*. 8, 353-67.
- Martinez-Sales, M., et al., 2015. Zebrafish as a possible bioindicator of organic pollutants with effects on reproduction in drinking waters. *Journal of Environmental Sciences (China)*. 33, 254-60.
- Martins, J. R., Adenovírus em ambientes aquáticos, uma revisão de literatura. Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Especialização em Microbiologia. Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 2011.
- McGrath, P., Li, C. Q., 2008. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today*. 13, 394-401.
- Mehnert, D. U., 2003. Reúso de efluente doméstico na agricultura e a contaminação ambiental por vírus entéricos humanos. *Instituto Biológico*. 65, 19-21.
- NCR, 2011. National Research Council. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press, Washington (DC).
- Norton, W. H., 2013. Toward developmental models of psychiatric disorders in zebrafish. *Front Neural Circuits*. 7, 79.
- OECD, 2000. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. *Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment*. 23, 1-53.
- Petrere, M., Jr., et al., 2006. Income evaluation of small - scale fishers in two Brazilian urban reservoirs: Represa Billings (SP) and Lago Paranoá (DF). *Brazilian Journal of Biology*. 66, 817-28.

- Ramos, C. P. S., et al., 2014. Study on the occurrence of microcystin toxin in water reservoir of Mundaú (Garanhuns-PE) by ELISA and HPLC methodologies. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 73, 169-77.
- Rezende, K. F., et al., 2014. Histopathological and genotoxic effects of pollution on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) in the Billings Reservoir (Brazil). *Toxicology Mechanisms and Methods*. 24, 404-11.
- Rocha, A. A., et al., 1985. [Fishing yield and chemical pollutants in the water of Billings Reservoir, Sao Paulo (Brazil)]. *Revista de Saude Publica*. 19, 401-10.
- Rodrigues, L. L., et al., 2010. Chlorophyceae das Represas Billings (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga, SP, Brasil. *Brazilian Journal of Botany*. 33, 247-264.
- SABESP, Crise hídrica, estratégia e soluções da SABESP. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, São Paulo, 2015a.
- SABESP, Os 85 anos da Represa Billings. Agência de notícias. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, São Paulo, 2015b.
- SABESP, Controle de perdas. Agência de Notícias. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, São Paulo, 2016.
- Shibata, T., et al., 2004. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. *Water Research*. 38, 3119-31.
- Sousa, V. A. S., Silva, D. R. M., 2014. Abastecimento público de água da região metropolitana de São Paulo. *Revista Interação*. X, 10-28.
- Teraoka, H., et al., 2003. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. *Congenit Anom (Kyoto)*. 43, 123-32.
- Wengrat, S., Bicudo, D. C., 2011. Spatial evaluation of water quality in an urban reservoir (Billings Complex, southeastern Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*. 23, 200-216.

Zon, L. I., Peterson, R. T., 2005. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov.* 4, 35-44.

## Supplementary material

**S1 Table. Values of two-way analysis of variance.** Effects of exposure to Rio Pequeno, Rio Grande, and Bororé (Billings reservoir) water samples on behavior of adult zebrafish during 1h. Each group was evaluated at different concentrations of Billings reservoir water diluted in control water: 12.5, 25, 50, and 100% (n = 8 per group). The data are expressed as statistical values of F, DF<sub>n</sub>, DF<sub>d</sub>, and *p* of two-way analysis of variance.

|                            | Water |                 |                 |              | Time |                 |                 |          | Interaction |                 |                 |          |
|----------------------------|-------|-----------------|-----------------|--------------|------|-----------------|-----------------|----------|-------------|-----------------|-----------------|----------|
|                            | F     | DF <sub>n</sub> | DF <sub>d</sub> | <i>p</i>     | F    | DF <sub>n</sub> | DF <sub>d</sub> | <i>p</i> | F           | DF <sub>n</sub> | DF <sub>d</sub> | <i>p</i> |
| exploratory activity freq. |       |                 |                 |              |      |                 |                 |          |             |                 |                 |          |
| 12.5%                      | 3.30  | 3               | 140             | 0.0223*      | 0.58 | 4               | 140             | 0.6782   | 0.49        | 12              | 140             | 0.9185   |
| 25%                        | 2.28  | 3               | 140             | 0.0821       | 0.87 | 4               | 140             | 0.4809   | 0.71        | 12              | 140             | 0.7435   |
| 50%                        | 7.64  | 3               | 140             | <0.0001***** | 0.78 | 4               | 140             | 0.5431   | 0.65        | 12              | 140             | 0.7946   |
| 100%                       | 6.87  | 3               | 140             | 0.0002***    | 2.63 | 4               | 140             | 0.0369*  | 0.65        | 12              | 140             | 0.7955   |
| surfacing time (s)         |       |                 |                 |              |      |                 |                 |          |             |                 |                 |          |
| 12.5%                      | 6.55  | 3               | 140             | 0.0004***    | 1.21 | 4               | 140             | 0.3101   | 0.70        | 12              | 140             | 0.7477   |
| 25%                        | 3.86  | 3               | 140             | 0.0109*      | 0.78 | 4               | 140             | 0.5426   | 0.48        | 12              | 140             | 0.9215   |

|                         |       |   |     |              |      |   |     |          |      |    |     |          |
|-------------------------|-------|---|-----|--------------|------|---|-----|----------|------|----|-----|----------|
| 50%                     | 13.89 | 3 | 140 | <0.0001***** | 2.38 | 4 | 140 | 0.0549   | 0.76 | 12 | 140 | 0.6940   |
| 100%                    | 0.72  | 3 | 140 | 0.5443       | 2.97 | 4 | 140 | 0.0215*  | 0.95 | 12 | 140 | 0.4955   |
| bottom time (s)         |       |   |     |              |      |   |     |          |      |    |     |          |
| 12.5%                   | 6.30  | 3 | 140 | 0.0005***    | 1.20 | 4 | 140 | 0.3141   | 0.48 | 12 | 140 | 0.9262   |
| 25%                     | 1.62  | 3 | 140 | 0.1876       | 1.23 | 4 | 140 | 0.3026   | 0.35 | 12 | 140 | 0.9785   |
| 50%                     | 17.00 | 3 | 140 | <0.0001***** | 1.80 | 4 | 140 | 0.1322   | 0.62 | 12 | 140 | 0.8235   |
| 100%                    | 0.09  | 3 | 140 | 0.9642       | 4.08 | 4 | 140 | 0.0037** | 0.64 | 12 | 140 | 0.8019   |
| erratic movements freq. |       |   |     |              |      |   |     |          |      |    |     |          |
| 12.5%                   | 15.05 | 3 | 140 | <0.0001***** | 0.57 | 4 | 140 | 0.6869   | 0.97 | 12 | 140 | 0.4764   |
| 25%                     | 10.69 | 3 | 140 | <0.0001***** | 0.51 | 4 | 140 | 0.7282   | 1.42 | 12 | 140 | 0.1631   |
| 50%                     | 7.77  | 3 | 140 | <0.0001***** | 2.42 | 4 | 140 | 0.0512   | 2.40 | 12 | 140 | 0.0075** |
| 100%                    | 15.01 | 3 | 140 | <0.0001***** | 0.67 | 4 | 140 | 0.6160   | 1.23 | 12 | 140 | 0.2664   |

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\*\* p < 0.0001 (two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak test).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As amostras de água do Rio Pequeno, Rio Grande e Bororé (Represa Billings) apresentaram contaminação microbiológica para *Escherichia coli* e bactérias heterotróficas.
- As águas do Rio Pequeno induziram prejuízos motores e exploratórios, bem como comportamento tipo-ansiogênico em zebrafish.
- As águas de Bororé induziram comportamentos nos zebrafish ligados a prejuízos respiratórios (hipóxia) e maior reação de alarme.
- Os zebrafish expostos às águas de Bororé apresentaram astrogliose, que parece ter ocorrido em consequência da alta contaminação por bactérias heterotróficas.
- Todas as três áreas da Represa Billings estudadas estão diretamente relacionadas ao consumo humano na atualidade (abastecimento de água e pesca), mas, considerando os presentes resultados de contaminação microbiológica, prejuízos comportamentais e astrogliose em zebrafish, as águas do Rio Pequeno, Rio Grande e Bororé deveriam ser consideradas inaceitáveis para o uso humano na sua apresentação não tratada.
- A Companhia de Saneamento Básico deve considerar processos rigorosos de tratamento das águas da Billings. A autorização para a pesca em Bororé deve ser repensada.

## C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº374/15 CEUA/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Estudos microbiológicos, físico-químicos e no comportamento de zebrafish da água da represa Billings”, “Espécie utilizada: Danio rerio (Zebrafish) ” “Número de animais utilizados: 117 ” sob a responsabilidade de ‘THIAGO BERTI KIRSTEN e EDNILSE LEME ’ ”, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Federal nº 11.794/08 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 12 dias do mês agosto de 2015.



Juliana Guizi  
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Universidade Paulista – UNIP

## **REVISORES ORTOGRÁFICOS E GRAMATICAIS**

### **DECLARAÇÃO**

DECLARO que a Tese do Programa de Doutorado em *Patologia Ambiental e Experimental* da Universidade Paulista – UNIP foi devidamente revisada.

Título: *ÁGUA DA REPRESA BILLINGS USADA PARA O CONSUMO HUMANO APRESENTA CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS E INDUZ PREJUÍZOS COMPORTAMENTAIS E ASTROGLIOSE EM ZEBRAFISH*

Autoria: *Ednilse Leme*

Orientador(a): *Thiago Berti Kirsten*

Dados do Revisor(a)

Nome: *Marise Rauen Vianna*

RG: *1147428-4*

Telefone de contato: *(11) 9 9656-5121*

E-mail: *mariserv@hotmail.com*

Tipo de revisão:

|                                                 |                                                |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Total                  | <input checked="" type="checkbox"/> Parcial    |
| <input checked="" type="checkbox"/> Ortográfica | <input checked="" type="checkbox"/> Gramatical |
| <input type="checkbox"/> Formatação             | <input type="checkbox"/> Normatização          |
| <input checked="" type="checkbox"/> Inglês      | <input checked="" type="checkbox"/> Português  |

29 de novembro de 2017.



Assinatura do(a) Revisor(a)

**Figura Complementar.** Efeitos da exposição a amostras de águas do Rio Pequeno, Rio Grande e Bororé (Represa Billings, 100%) no comportamento de zebrafish adultos durante 1h (n = 8 per group). ANOVA de duas vias seguido pelo teste Holm-Sidak. Os dados são expressos pelas médias  $\pm$  EP

