TIAGO GABRIEL CORREIA

**Evidências de desregulação endócrina causada pela exposição
aquática ao Alumínio e ao Manganês em**

***Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**

**Evidences of endocrine disruption caused by aquatic exposure
to Aluminum and Manganese in**

***Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**

São Paulo

2012

TIAGO GABRIEL CORREIA

**Evidências de desregulação endócrina causada pela exposição
aquática ao Alumínio e ao Manganês em *Astyanax
bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**

**Evidences of endocrine disruption caused by aquatic exposure
to Aluminum and Manganese in *Astyanax bimaculatus*
(Linnaeus, 1758)**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Renata Guimarães Moreira

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Correia, Tiago Gabriel

**Evidências de desregulação endócrina causada pela exposição aquática
ao Alumínio e ao Manganês em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**

140 pág.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia

1 – Ecotoxicologia; 2 – Alumínio; 3 – Manganês; 4 – peixes;
5 – reprodução; 6 – desregulador endócrino; 7 – metais

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof(a). Dr (a). Renata Guimarães Moreira

Orientador (a)

*à minha avó, Dona Tereza
cujo amor e dedicação
serão lembrados para sempre*

*aos meus pais Carlos Alberto Correia
e Sônia Pinheiro Correia e às minhas irmãs
Ana Flavia Correia e Thaís Iara Correia, que além de laços de
sangue são a essência de tudo que sou*

à minha amada Roberta Mayer

DEDICO.

Epígrafes

*Combatí o bom combate,
acabei a carreira, guardei a fé. 2 Tímóteo 4:7*

*... “mas uma coisa faço, e é que, esquecendo-me das
coisas que para trás ficam, e avançando para
as que estão diante de mim, prossigo para o alvo”...*

Filípenses 3:13 -14

Agradecimentos

Ao autor e consumidor da vida Jesus Cristo, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Ao Deus que criou os céus, a Terra e todos os seres vivos, por me sustentar todos os dias da minha vida com sua graça, misericórdia, provisão e amor.

Foram anos áridos, sofríveis, inconstantes, incertos e não por poucas vezes cheguei a pensar, não tenho neles contentamento. Passei crises emocionais, desertos financeiros, desespero, solidão e angústia. Morei em vários lugares, cheguei a me mudar mais de dez vezes, tive que encarar desastres experimentais, morte de animais, fiquei a mercê do favor de pessoas e da incerteza do amanhã.

Mas eu posso dizer que eu passei por tudo isso, e só consegui graças a Deus, à minha família, à Roberta e a um mundo de pessoas que se doaram e se envolveram. Infelizmente não serei capaz de me lembrar de todos, mas mesmo assim eu posso dizer uma coisa:

Muito obrigado!

Primeiramente à minha mentora científica, Renata Guimarães Moreira, por sua orientação, apoio, paciência e incomparável amor, investimento e dedicação na formação científica de seus alunos.

À CESP de Paraibuna, na figura do biólogo Danilo Caneppele por conceder espaço na piscicultura para manutenção dos peixes e por ceder os exemplares de *Astyanax bimaculatus* utilizados neste estudo.

Ao Rubens Prado (Juntão), Felipe Rissete (Pelúcio) e ao Richard Ponciano (Madruga) por se mostrarem os melhores amigos nos momentos de tribulação.

Ao Erik Stromfeld e toda galera da Bola de Neve Church – célula Sumaré três por intercederem pela minha vida.

A todos os integrantes do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA): Aline, Andreone, Bruno, Cristiële, Cadu, Jandyr, Gabriela, Paulo e Renato. E em especial para:

Amanda, por ter despendido parte do seu tempo e me ensinado na medida do possível práticas laboratoriais da biologia molecular; ao Jaboti por compartilhar o pesadelo da expressão gênica e as infindáveis dúvidas; à Bianca (Neusa) por me permitir vivenciar mesmo que superficialmente as alegrias e desatinos de uma orientação acadêmica e por dar sequência a pesquisa científica que iniciei sete anos atrás; à Vanessa (Dirty Mouth) companheira de biotério, por se entregar avidamente a pesquisar os efeitos metabólicos do Al e do Mn, dos quais fui incapaz de executar; e à Raísa pela colaboração inestimável nas análises de fecundidade.

Em especial à professora Dra Lucile Maria Floeter-Winter, por sua colaboração teórica e logística na execução deste trabalho; à sua aluna Carmen. Em especial também ao técnico Ricardo Andrade Zampieri, sem o qual eu não teria concluído as análises moleculares.

Ao Vagnão, Eduardo e Telma (técnicos); às secretarias do Departamento de Fisiologia (Gisele, Roseli e Marcilene) e ao Coordenador do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Geral, Prof. Dr. José Guilherme S. C. M. Berlinck (ZéGui).

Ao professor Dr. Breno Pannia Espósito por todo entusiasmo inicial com as ideias relacionadas ao manganês, disposição em ceder o seu laboratório e colaboração nas tentativas de dosagens de alumínio e de manganês.

À Marina Granado Sá por sua amizade, sugestões e críticas ao meu trabalho e por diversas vezes ter se mostrado um “divã” de plantão.

À professora Dra. Zulma Felisbina da Silva Ferreira, por permitir a utilização das instalações de seu laboratório, centrífuga e *Nanodrop*.

Ao professor Dr. Pedro Augusto C. M. Fernandes por permitir a utilização dos equipamentos de seu laboratório.

À professora Dra. Débora Rejane Fior Chadi por permitir a utilização dos equipamentos de seu laboratório e aos seus alunos João Paulo, Sérgio e Maísa, por toda

paciência, compreensão e solidariedade, os quais por tantas vezes importunei implorando permissão para o uso dos equipamentos.

A professora Dra. Maria Inês Borella por ceder os *primers* do ELF1 α e ao seu aluno Lázaro pelo apoio.

A professora Dra Cláudia Bueno dos Reis Martinez da Universidade Estadual de Londrina pelo fornecimento do protocolo de digestão ácida de órgãos para quantificação de metais.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Projeto Temático 2008/57687- 0, pelo auxílio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

A minha família por me apoiar em todos os momentos e sempre me incentivar a seguir com os meus sonhos.

E a Roberta Mayer por ter sido uma providência de Deus na minha vida, por ter se mostrado um raio de Sol em meio às densas trevas que me cercavam e por me fazer entender o significado da palavra amor.

ÍNDICE GERAL

Resumo Geral	X
Abstract	XI

Capítulo 1. Introdução Geral

1 – Introdução Geral	1
2 - Objetivos	9
3 – Referências bibliográficas	10

Capítulo 2. 15

Exposição aquática de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae) ao alumínio: efeitos endócrinos, reprodutivos e de bioconcentração

1 – Introdução	16
2 – Materiais e Métodos	20
3 – Estatística	32
4 – Resultados	32
5 – Discussão	51
6 – Referências Bibliográficas	65

Capítulo 3 79

Exposição aquática de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae) ao manganês: efeitos endócrinos, reprodutivos e de bioconcentração

1 – Introdução	80
2 – Materiais e Métodos	82

3 – Estatística	83
4 – Resultados	84
5 – Discussão	95
6 – Referências Bibliográficas	102

Capítulo 4 **108**

Efeitos endócrinos, reprodutivos e de bioconcentração resultantes da exposição sincrônica ao alumínio e ao manganês em fêmeas de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae)

1 – Introdução	109
2 – Materiais e Métodos	112
3 – Estatística	113
4 – Resultados	114
5 – Discussão	124
6 – Referências Bibliográficas	128

Capítulo 5. **131**

Discussão e Considerações Finais

1 – Discussão e Considerações Finais	132
2 – Referências Bibliográficas	136
6 – Anexos	137

Resumo Geral

Metais como o alumínio (Al) e o manganês (Mn) são encontrados na natureza como também em efluentes industriais, e podem ser tóxicos para a biota aquática, apresentando efeitos de desregulação endócrina, por exemplo, para os peixes, podendo afetar o desempenho reprodutivo de uma espécie. Rios e tributários do Estado de São Paulo, mesmo em áreas teoricamente conservadas, têm demonstrado um aumento no aporte destes metais, em concentrações superiores ao permitido pela legislação, e a consequência disso para os peixes é pouco conhecida. Neste estudo foram delineados ensaios de toxicidade para exposição aquática aguda (96 horas) ao Al e ao Mn, de forma isolada e sincrônica, em fêmeas vitelogênicas do teleósteo *Astyanax bimaculatus*. Este período de exposição foi seguido de um período em água limpa (96 horas) para avaliar a possibilidade de recuperação dos efeitos tóxicos promovidos por estes metais, avaliando-se os seguintes parâmetros: a fecundidade relativa (FR), potencial de bioconcentração destes metais, concentração plasmática de Estradiol (E_2), 17α hidroxiprogesterona (17α -OHP), Cortisol (CT), Triiodotironina (T_3), Tiroxina (T_4) e a expressão do mRNA do β FSH e β LH. Foram estabelecidos cinco grupos experimentais: Controle em pH neutro, pH ácido, Al, Mn e exposição Sincrônica ao Al e ao Mn. Os resultados demonstraram que o pH ácido e o Al reduziram a FR sem efeito de recuperação. O Al se bioconcentrou principalmente nas brânquias, fígado e encéfalo, enquanto que o Mn se bioconcentrou principalmente nas brânquias, mas em menor intensidade que o Al. Quando expostos sincronicamente, o Mn potencializou os efeitos de bioconcentração do Al, causando a redução na concentração plasmática de E_2 e 17α -OHP, para este progestágeno apenas na exposição ao Mn, tanto isolada quanto em exposição sincrônica. Contudo não foi observada recuperação na concentração de E_2 . Ambos os metais, em exposição isolada, causaram redução na concentração plasmática de CT, todavia nenhuma alteração foi registrada na exposição sincrônica. Da mesma forma, ambos os metais causaram redução na concentração plasmática de T_4 , inclusive a exposição sincrônica, enquanto que o T_3 se alterou diferentemente em cada grupo de exposição metálica. Possivelmente os efeitos sobre os hormônios tireoidianos tenham refletido uma resposta de modulação endócrina, enquanto que sobre os esteroides foram efeitos de desregulação endócrina, em uma via anti-esteroidogênica. Nenhum efeito foi observado na expressão gênica do mRNA β LH e não foi possível obter resultado sobre o β FSH, embora os *primers* tenham sido desenhados especialmente para *A. bimaculatus* e tenham funcionado corretamente na elaboração da curva padrão para o qRT – PCR. Os resultados encontrados em fêmeas vitelogênicas de *A. bimaculatus* podem ser relacionados ao tipo de exposição e a interação, que foram variáveis, entre os íons de Al e de Mn.

General Abstract

Metals such as Aluminum (Al) and Manganese (Mn) are found in nature as well as in industrial effluents, and can be toxic to aquatic biota, with endocrine disrupting effects, e.g. for fish, which can affect the reproductive performance of a species. Rivers and tributaries of São Paulo State, even in theoretically preserved areas, have shown an increase in the supply of these metals in concentrations greater than allowed by law, and the consequence for the fish is poorly understood. In this study, toxicity tests were designed for acute aquatic exposure (96 hours) to Al and Mn, in isolated and synchronous forms, in vitellogenic females of *Astyanax bimaculatus*, a teleost fish species. This exposure period was followed by a period in clean water (96 hours) to assess the possibility of recovery of toxic effects promoted by these metals, evaluating the following parameters: relative fecundity (FR), bioconcentration potential of these metals, plasma concentration of Estradiol (E_2), 17α hydroxyprogesterone (17α -OHP), Cortisol (CT), triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4) and mRNA gene expression of β FSH and β LH. Five experimental groups were established: Control at neutral pH, acidic pH, Al, Mn and synchronic exposure to Al and Mn. The results showed that acidic pH and Al reduced FR with no recovery effect. Al was mainly bioconcentrate in gills, liver and brain, whereas Mn was mainly bioconcentrate in gills, but with less intensity than Al. When exposed synchronously, Mn potentiated the effects of Al bioconcentration, causing a reduction in the plasma levels of E_2 and 17α -OHP, for this progestogen only to Mn exposure, both, in isolated and synchronous exposure. But recovery was not observed in E_2 levels. Both metals, in isolated exposure caused a reduction in plasma CT, but no change was recorded in synchronous exposure. Likewise, both metals induced reduction in plasma T_4 levels, including synchronous exposure, whereas T_3 levels were differently altered in each metal exposure group. Possibly the effects on thyroid hormones have reflected a response to endocrine modulation, whereas steroids showed endocrine disrupting effects in an antiesteroidogenic way. No effects were observed in mRNA β LH gene expression and it was not possible to achieve β FSH results, although the primers were designed especially for *A. bimaculatus* and have worked properly in the preparation of the standard curve for qRT - PCR. The results found in vitellogenic *A. bimaculatus* females may be related to the type of exposure and interaction, which were variable between Al and Mn ions.

CAPÍTULO

1 – Introdução Geral

1 – Introdução Geral

A contemporaneidade do século XXI arrasta consigo um mundo de interesses, paradigmas, superstições, preocupações, eventos ecológicos, antropomórficos e científicos, que inflam, sufocam e direcionam a sociedade humana para um mundo pluralista, multicultural, relativista e condensado, preocupado com as Olimpíadas, com a convenção Rio + 20 e até mesmo com credices de fim do mundo sem se dar conta, como deveriam, de que tudo está sendo arrasado e degradado pela poluição, principalmente aquática.

De acordo com Azizullah *et al.*, (2011), estima-se que cerca de 1.1 bilhão de pessoas no mundo não tem acesso a água potável; 2,5 bilhões de pessoas não tem acesso ao saneamento básico e mais de 5 milhões de pessoas morrem anualmente de doenças transmitidas pela água, sendo este número 10 vezes maior do que o número de pessoas que a cada ano morrem em guerras. A água doce global compreende apenas 3% do total da água do planeta, e apenas 0,01 % desta água está disponível para uso humano.

O aumento populacional humano implica em um maior consumo de água, seja em nível industrial, agrícola ou doméstico, resultando em modificações dos ecossistemas aquáticos tais como, represamentos, desflorestamentos da mata ciliar, entre outros; e consequentemente no aumento da emissão de efluentes líquidos para tais ecossistemas gerando poluição. Pelo fato de que muitos dos efluentes são complexos, instáveis e capazes de interações entre si, há uma necessidade da aplicação de análises físico-químicas e de biomarcadores como ferramentas adequadas para a caracterização, controle e previsão de risco em áreas contaminadas (Zagatto e Bertolotti, 2006).

O estado irresoluto da poluição aquática em todo planeta não é marca da sociedade atual, uma vez que tais origens remontam ao império romano; entretanto, a concepção deste assunto como um problema ecológico data do século XIX, quando os testes de toxicidade com despejos industriais foram inicialmente realizados, embora somente na década de 1930 os primeiros testes começaram a ser sistematizados (Zagatto e Bertolotti, 2006). Atualmente, ainda não se dispõe de um modelo teórico e instrumental adequado para interagir com esta complexa temática ambiental que governa o planeta (Elliott, 2002).

A ecotoxicologia se afigura para propor modelos e diretrizes para as questões de toxicidade causada pela poluição ambiental, sendo definida como a “*ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado*” (Zagatto e Bertoletti, 2006), pois agrega e normaliza as atividades científicas desta natureza.

Neste âmbito merecem destaque algumas instituições que tem direcionado muitas das atividades ecotoxicológicas em todo mundo, tais como a USEPA (Agência Americana de Proteção Ambiental), do inglês *United States Environmental Protection Agency*, o ECETOC (Centro Europeu de Ecotoxicologia e de Toxicologia das Substâncias Química), do inglês *European Centre for Ecotoxicology And Toxicology Of Chemicals* e o SETAC (Sociedade de Toxicologia Ambiental e Química), do inglês *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*.

No Brasil, se destaca principalmente a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) a qual tem padronizado e estabelecido protocolos de toxicidade com organismos aquáticos em nível nacional. Infelizmente a regulamentação da legislação brasileira para limites máximos toleráveis de emissão de efluentes carece de dados que subsidiem a realidade neotropical, pois muitos dos parâmetros utilizados são provenientes de agências internacionais em áreas de clima temperado, tais como as supracitadas.

A dificuldade da sistematização de protocolos e métodos para elucidar os efeitos dos poluentes sobre os organismos aquáticos em grupos e/ou instituições de pesquisa interdisciplinares deve-se principalmente ao fato de que centenas de novos poluentes são lançados anualmente nos ecossistemas aquáticos e, pouquíssimos têm seus efeitos identificados e descritos sobre a biota; paralelamente, os poluentes estão em constante processo dinâmico de: transporte, degradação, transformação, especiação, bioconcentração, bioacumulação, biomagnificação e distribuição entre os organismos e o ambiente (Venkatesan *et al.*, 2010).

Além da interação química e biológica referentes aos compostos químicos lançados na água, outros fatores como as características do solo, a topografia, o índice pluviométrico, o ciclo hidrológico, o aporte de nutrientes e entre tantos que diferem

entre as bacias hidrográficas e até mesmo em regiões marítimas dificultam a elaboração de um modelo para o monitoramento e a predição de efeitos tóxicos e da identificação da fonte poluidora (Lai *et al.*, 2011). Para agravar este quadro, de acordo com a categoria química, os poluentes possuem comportamentos diferentes, os metais, por exemplo, apresentam um comportamento físico-químico específico, diferente do observado para poluentes orgânicos, dentre os quais, muitos além de serem poluentes orgânicos persistentes (POPS), podem causar efeitos nocivos sobre os organismos em concentrações da ordem de ng.L^{-1} a pg.L^{-1} (Rudder *et al.*, 2004; Matthiessen e Johnson, 2007).

As substâncias presentes nos ecossistemas aquáticos de origem predominantemente antropogênicas, capazes de alterar o sistema endócrino dos animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução, podendo apresentar-se como micropoluentes (ng. L^{-1} a pg. L^{-1}), são definidos como desreguladores endócrinos (DEs), do inglês *endocrine disruptors chemicals*. De acordo com IPCS (Programa Internacional de Segurança Química, do inglês, *International Programme on Chemical Safety*), os DEs são agentes exógenos, substâncias ou misturas capazes de alterar a função de um sistema endócrino e consequentemente causar efeitos adversos em um organismo intacto, ou sua progênie ou (sub) populações (IPCS, 2002).

Não existe na língua portuguesa uma tradução literal para *endocrine disrupting*, portanto referir-se a este assunto com o termo “*disrupção*” *endócrina* tratar-se ia de um neologismo, que é um fenômeno linguístico que consiste na criação de uma palavra ou expressão nova, ou ainda na atribuição de um novo sentido a uma palavra já existente. Bila e Dezotti (2007) destacam este assunto ao alertarem para o fato de que a tradução do termo “*endocrine disrupting chemicals*” não é simples, sendo que existem cinco possíveis traduções: perturbadores endócrinos, interferentes endócrinos, desreguladores endócrinos, disruptores endócrinos e interferentes hormonais.

Mesmos os termos em inglês geram dúvidas em relação aos seus efeitos e a existência de vários termos confirma isso. Na literatura podem ser encontrados “*endocrine disrupting*”, “*endocrine modulator*”, “*environmental estrogen*”, sendo o primeiro termo o mais usado. Segundo o “*American Council on Science and Health*” (ACSH), o termo “*endocrine disrupting*” sugestiona que os efeitos de tais substâncias são negativos, mas é também concebível que a exposição a essas substâncias

hormonalmente ativas pode conduzir a resultados benéficos. Já, segundo a ACHS, as substâncias “*endocrine modulator*” referem-se às substâncias químicas industriais, tais como, policlorados de bifenilas e pesticidas. A comunidade científica ainda não entrou em consenso sobre qual a nomenclatura correta que deve ser empregada para essa classe de substâncias, no que se refere a todos os seus efeitos causados, mesmo porque metais podem ser incluídos nesta categoria de poluentes aquáticos. Os termos mais usados são perturbadores endócrinos e desreguladores endócrinos (Bila e Dezotti, 2007); portanto, neste estudo será utilizado o termo desregulador endócrino.

O mecanismo de ação dos DEs consiste em mimetizar ou inibir a ação natural de um hormônio no sistema endócrino ou órgão alvo, interferindo na síntese, secreção, transporte ou na interação hormônio-receptor nas células alvo (Chang *et al.*, 2009) como agonistas ou antagonistas, resultando em estímulo, redução e/ou bloqueio destes processos (Matthiessen e Johnson, 2007). Observações dos efeitos da exposição aos DEs em peixes e outras espécies aquáticas, como por exemplo, invertebrados, anfíbios e até mesmo aves, têm contribuído para um esforço global na tentativa de estabelecer métodos para a detecção dos efeitos destes compostos para avaliação dos riscos ecológicos, e podem ser, desde compostos químicos sintéticos tais como pesticidas e fertilizantes, a xenoestrógenos, fitoestrógenos e metais (Owen *et al.*, 2008).

Há um consenso de que em sua grande maioria esses compostos antropogênicos interferem sobre a afinidade hormônio- receptor, especialmente os envolvidos na reprodução, pois esses parecem ser mais vulneráveis. Dessa forma, são frequentes, por exemplo, em mamíferos: alterações gonadais, má formação do trato genital, infertilidade e tumores; em outros vertebrados como aves e crocodilianos há a inibição da reprodução devida a alterações no comportamento de corte e anormalidades nos órgãos reprodutivos (Depledge e Billingham, 1999).

Sob uma perspectiva ecotoxicológica, uma das principais preocupações globais para a fauna aquática está em torno de quatro tipos de desregulações endócrinas, a saber: antiestrógenos e antiandrógenos (inibidores da esteroidogênese), perturbadores da tireoide e os compostos capazes de alterar o sistema endócrino de invertebrados uma vez que mais de 95% das espécies animais são invertebrados, para estes animais o hormônio juvenil e os hormônios ecdiesteroides são os mais afetados (Hutchinson e Pickford, 2002).

Possivelmente os DEs inicialmente agem em nível molecular para em seguida interagirem com níveis de organização biológica maiores e consequentemente afetarem o sistema endócrino em sua totalidade. Entretanto, devido a complexidade do sistema endócrino dos vertebrados é praticamente impossível prever qual será o nível de organização biológica afetado, portanto é necessário identificar *endpoints* espécie-específicos em níveis individuais e populacionais (Baatrup e Junge, 2001).

Diante das diferenças filogenéticas e especializações fisiológicas em determinados táxons, torna-se quase impossível extrapolar dados registrados, por exemplo, da exposição a DEs em mamíferos para vertebrados ectotérmicos como, por exemplo, peixes e anfíbios e semelhantemente para invertebrados, sendo, portanto necessários testes específicos para cada composto em que exista a possibilidade de alterações endócrinas (Kendall *et al.*, 1998). Não obstante, moléculas de determinados hormônios, apesar de apresentarem certo grau de conservação evolutiva, desempenham diferentes funções fisiológicas, por exemplo, enquanto o papel principal da prolactina (PRL) em mamíferos é a estimulação da lactação, em peixes a PRL está envolvida na osmorregulação e em anfíbios desempenha um papel na metamorfose e crescimento (Norris, 1996). Enquanto um mesmo DE pode vir a afetar um mamífero de uma determinada maneira, o mesmo nem sempre poderá ser aplicado a outros vertebrados, ou invertebrados.

Apesar de ser reconhecido que muitos DEs alteram as funções reprodutivas, o entendimento a cerca dos mecanismos pelos quais tais alterações ocorrem ainda são incipientes em muitos aspectos (Thibaut e Porte, 2004). A maioria dos estudos ecotoxicológicos cujo objetivo é o de avaliar possíveis efeitos de desregulação endócrina considera apenas dados para animais vertebrados, negligenciando representantes dos filos de invertebrados. Isto é alarmante, tendo em conta a importância ecológica dos invertebrados. Eles são componentes essenciais de todos os ecossistemas e, portanto, a ameaça de desregulação endócrina deve ser avaliada para assegurar a proteção ambiental (Matthiessen e Law, 2002).

Alguns estudos realizados em laboratório sob condições controladas demonstram que compostos metálicos (íons ou substâncias contaminantes) podem afetar o controle hormonal da muda, a regeneração de membros, a concentração de glicose na hemolinfa e causar alterações na pigmentação e na reprodução de crustáceos (Depledge

e Billinghamurst, 1999). O Cd e o Se são um dos elementos mais deletérios, chegando a afetar o processo de muda (crustáceos), o desenvolvimento gonadal em mexilhões, a ovogênese de ouriços do mar e o metabolismo de esteroides na estrela do mar *Asterias rubens* (neste caso, Cd e Zn) (Depledge, 1999). Apesar do número de trabalhos publicados na literatura sobre desregulação endócrina ter aumentado muito nos últimos anos, para os invertebrados, com exceção de crustáceos e insetos, estes dados são escassos.

Os primeiros relatos dos efeitos dos DEs em humanos datam dos anos 1940 quando aviões agrícolas pulverizaram DDT sobre plantações e todas as pessoas envolvidas diretamente ou indiretamente com a produção agrícola tiveram diminuição na libido e na fertilidade. Posteriormente, em meados da década de 1980, a exposição de pessoas ao nonilfenol e ao bisfenol - A na produção de plásticos resultou em efeitos estrogênicos; subsequentemente ao longo de mais de 50 anos, diversos agravos na saúde humana têm sido relatados e diretamente relacionados aos DEs, entre os quais, estão certos tipos de câncer no trato reprodutivo, tanto masculino quanto feminino e sobre a tireoide, além de severos efeitos sobre o sistema nervoso central (Mendes, 2002).

Peixes teleósteos constituem o grupo cujos efeitos de desregulação endócrina estão mais bem documentados, pois se conhecem desde alterações morfológicas (Boudreau *et al.*, 2005); histológicas (Sanchez *et al.*, 2011) a alterações: celulares (Arukwe, 2001), moleculares (Scholz e Mayer, 2008); sobre expressão gênica de gonadotropinas (Narcizo, 2009); enzimáticas (Cheshenko *et al.*, 2008); na circulação de hormônios esteroides plasmáticos (Correia *et al.*, 2010); metabólicos (Vieira *et al.*, 2012) além de efeitos relacionados a vitelogenina (VTG), como por exemplo: na síntese (Jubeaux *et al.*, 2012); transporte (Scott *et al.*, 2006); expressão gênica (Puinean e Rotchell, 2006; Biales *et al.*, 2007) e viabilidade dos ovos e gametas (Kime e Nash, 2005). Além destes efeitos, consequências ecológicas também estão descritas (Taylor *et al.*, 1999; Mills e Chichester, 2005; Ankley *et al.*, 2009).

Os anfíbios, notoriamente os anuros, têm sido considerados o táxon ideal para estudos sobre desregulação endócrina. Seu ciclo de vida, reprodução e vida semi – aquática estão entre alguns dos fatores que tornam este grupo um promissor modelo para estudos dos defeitos dos DEs (Bogi *et al.*, 2003). As principais consequências da

exposição aos DEs sobre os animais desta classe destacam-se sobre a reprodução e a metamorfose, com destaque aos efeitos sobre a tireoide (Heimeier e Shi, 2010).

Répteis são considerados um táxon globalmente em declínio. Hipóteses para o declínio dos répteis incluem: perda e degradação de habitat, as espécies invasoras, doenças, parasitismo, as mudanças climáticas globais e poluição ambiental. No entanto, a nossa compreensão dos efeitos dos poluentes sobre os répteis ainda apresenta muitas lacunas (Gibbons *et al.*, 2000).

Um estudo realizado para avaliar o estado de conservação de *Alligator mississippiensis* e a possível suscetibilidade desta espécie aos DEs foi conduzido administrando-se o estrógeno sintético 17 β - estradiol aos ovos deste crocodilo durante o período incubação, fato que resultou em feminização, sugerindo que produtos químicos sintéticos ou metais pesados, se absorvidos pelos ovos, podem alterar a via normal de determinação do sexo (fenotípico) nestes animais (Crain e Guillette Jr, 1998)

As aves correspondem a um táxon cujos efeitos dos DEs afetam diretamente a reprodução. Relatos de aves marinhas cujos ovos apresentaram a casca com menor espessura levando os mesmos a se quebrarem durante a incubação tornaram-se um caso clássico. Dentre as espécies afetadas incluem-se pelicanos, pinguins e gaivotas, e os resultados destes efeitos são primariamente declínios populacionais (Burger *et al.*, 2007). Entre outros efeitos, devidos principalmente a poluentes estrogênicos, podem ser citados, a má formação dos órgãos reprodutores (Berg *et al.*, 1999), a redução na capacidade de imunocompetência e consequentemente aumento na suscetibilidade a doenças e parasitas, aberrações morfológicas (neonatos) e principalmente desvios comportamentais, especificamente no comportamento de corte e cuidado parental (Carere *et al.*, 2010).

Não somente compostos orgânicos podem provocar efeitos sobre o sistema endócrino, compostos inorgânicos, metais e até mesmo hipóxia (Rudolf *et al.*, 2003) estão associados a estes efeitos. Em relação aos metais, as atividades antropogênicas têm aumentado este tipo de poluição em muitas partes do mundo, permitindo que estes compostos se acumulem em grandes quantidades nos sedimentos dos ecossistemas aquáticos e apresentem elevado potencial de biodisponibilidade para os organismos (Pascal *et al.*, 2010).

Alguns metais, como o Cu, Pb, Zn, Cd tem se destacado como poluentes em ecossistemas marinhos com ocorrência simultânea, entretanto, a análise comparativa dos efeitos tóxicos individuais e como mistura (dois ou mais metais) em organismos aquáticos ainda são escassos (Xu *et al.*, 2011). Interações toxicológicas entre metais podem resultar em diversos tipos de efeitos, tais como antagônicos, sinérgicos, de potenciação, entre outros (Zagatto e Bertoletti, 2006) os quais dependem dos metais e das condições abióticas, e assim como no ambiente marinho, muitas bacias hidrográficas brasileiras encontram-se poluídas por metais. Dados da CETESB (CETESB 2006, 2008, 2010) no Estado de São Paulo indicam áreas com concentração metálica acima do padrão permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA (CONAMA, 2005), por exemplo, para o Al e para o Mn, os quais podem ser tóxicos para a biota.

Atualmente é prioridade para a comunidade científica e reguladora internacional o estabelecimento de métodos de ensaio de ecotoxicidade a avaliação de risco ecológico e programas de monitoramento ambiental e em última instância, avaliar se os dados obtidos em laboratório, que são essenciais, não são contraproducentes quando comparados com a realidade observada no meio ambiente e assim possam apoiar cientificamente, de forma significativa e eticamente justificável, orientações para testes de desregulação endócrina (Hutchinson e Pickford, 2002).

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi de verificar possíveis disfunções reprodutivas, principalmente na esteroidogênese ovariana de *Astyanax bimaculatus* expostos a concentrações subletais de alumínio e manganês, isolados e em exposição sincrônica.

2.2 – Objetivos Específicos

- Considerar os efeitos da exposição aquática ao alumínio e ao manganês de forma isolada e sincrônica na concentração plasmática dos principais hormônios esteroides envolvidos no processo de vitelogênese e maturação final dos oócitos: 17 β Estradiol (E₂) e 17 alfa hidroxiprogesterona (17 α OHP), respectivamente, além do Cortisol (CT), a Triiodotironina (T₃) e a Tiroxina (T₄).
- Caracterizar a dinâmica de bioconcentração destes metais em diferentes órgãos e tecidos.
- Analisar as possíveis consequências sobre a fecundidade.
- Avaliar a influência da exposição aos metais sobre a expressão gênica do hormônio folículo estimulante (β FSH) e do hormônio luteinizante (β LH).
- Verificar se os animais são capazes de se recuperar dos efeitos tóxicos da exposição aos metais.

3 – Referências bibliográficas

- Ankley, G. T., Bencic, D. C., Breen, M. S., Timothy, W., Collete, T. W., Conolly, R. B., Denslow, N. D., Edwards, S. W., Ekman, D. R., Garcia – Reyero, N., Jensen, K. M., Lazorchak, J. M., Martinovic, D., Hiller, D. H., Perkins, E. J., Orlando, E. F., Villeneuve, D. L., Wang, R. L., Watanabe, K. H. 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquatic Toxicology* 92, 168 – 178.
- Arukwe, A. 2001. Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact of fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin* 42, 643 – 655.
- Azizullah, A., Khattak, M. N.K., Richter, P., Häder, D. P. 2011. Water pollution in Pakistan and its impact on public health — A review. *Environment International* 37, 479 – 497.
- Baattrup, E., Junge, M. 2001. Antiandrogenic Pesticides Disrupt Sexual Characteristics in the Adult Male Guppy (*Poecilia reticulata*). *Environmental Health Perspectives* 109, 1063 – 1070.
- Berg, C., Halldin, K., Fridolfsson, A. K., Brandt, I., Brunstrom, B. 1999. The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *The Science of the Total Environment* 233, 57 – 66.
- Biales, V. V. D., Riordan, A., Markiewicz, D., Holmes, D., Otis, P. 2007. Screening California surface waters for estrogenic endocrine disrupting chemicals (EEDC) with a juvenile rainbow trout liver vitellogenin mRNA procedure. *Exposure* 385, 66 - 79.
- Bila, D. M., Dezotti, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova* 30. (3), 651-666.
- Boudreau, M., Courtenay, S. C., MacLatchy, D. L., Bérubé, C. H., Hewitt, L. M., Van der Kraak, G. J. 2005. Morphological abnormalities during early-life development of the estuarine mummichog, *Fundulus heteroclitus*, as an indicator of androgenic and anti-androgenic endocrine disruption. *Aquatic Toxicology* 71, 357 – 369.
- Burger, J., Fossi, C., McClellan-Green, P., Orlando, E. F. 2007. Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environmental Research* 104, 135 – 152.

- Carere, C., Constantini, D., Sorace, A., Santucci, D., Alleva, E. 2010. Bird populations as sentinels of endocrine disrupting chemicals. *Ann Ist S. S* 46 (1), 81- 88.
- CETESB. 2006. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.
- CETESB. 2008. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.
- CETESB. 2010. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.
- Chang, H. S., Choo, K. H., Lee, B., Choi, S. J. 2009. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials* 172, 1-12.
- Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R. I. L. 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155, 31– 62.
- CONAMA, 2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. 1-23.
- Correia, T, G., Narcizo, A, M., Bianchini, A., Moreira, R, G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151, 461 – 466.
- Crain, D. A., Guillette Jr, L. J. 1998. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Animal Reproduction Science* 53, 77 – 86.
- Depledge, M, H., Billingham, T, Z. 1999. Ecological Significance of Endocrine Disruption in Marine Invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*. 39, 32 – 38.
- Elliott, M. 2002. The role of DSPIR approach and conceptual models in marine environmental management: an example for offshore wind power. *Marine Pollution Bulletin* 44, iii - vii.
- Gibbons, J. W., Scott, D. E., Ryan, T. J., Buhlmann, K. A., Tuberville, T. D., Metts, B. S., Greene, J. L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S., Winne, C. T. 2000. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *Bioscience* 50, 653 – 666.

- Heimeier, R. A., Shi, Y, B. 2010. Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development: Effect of bisphenol A on thyroid hormone action. *General and Comparative Endocrinology* 168, 181–189.
- Hutchinson, T, H., Pickford, D, B. 2002. Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. *Toxicology* 181: 182, 383 – 387.
- IPCS. 2002. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. In: Damstra, T., Barlow., S. Bergman, A., Kavlock, R., Kraak Van der (Eds). World Health Organisation. International Programme on Chemical Safety, Geneva, 180p.
- Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A. 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic Toxicology* 112 – 113, 72– 82.
- Kendall, R., Dickerson, R., Giesy, J., Suk, W. (Eds.), 1998. Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife. SETAC Technical Publications. SETAC Press. 491p.
- Kime, D. D., Nash, J. P. 2005. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *The Science of the Total Environment* 233, 123 – 129.
- Kloas, W., Lutz, I. 2006. Amphibians as model to study endocrine disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130, 16 – 27.
- Lai, Y.C., Yang, C. P., Hsieh, C.Y., Wu, C. Y., Kao, C. M. 2011. Evaluation of non-point source pollution and river water quality using a multimedia two-model system. *Journal of Hydrology*. 409, 583 – 595.
- Matthiessen, P., Law, R, J. 2002. Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental Pollution*. 120.739 – 757.

- Matthiessen, P., Johnson, I. 2007. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environmental Pollution* 146, 9 – 18.
- Mendes, J. J. A. 2002. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 781–788.
- Mills, L. J., Chichester, C. 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment* 343,1– 34.
- Narcizo, A. M. 2009. Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia. Dissertação de Mestrado. 92p.
- Norris, D.O. 1996. *Vertebrate Endocrinology*, 3rd ed. Academic Press.
- Owen, R., Galloway, T, S., Hagger, J, A., Jones, M, B., Depledge, M, H. 2008. Biomarkers and environmental risk assessment: Guiding principles from the human health field. *Marine Pollution Bulletin* 56, 613 – 619.
- Pascal, P., Fleeger, J. W., Galvez, F., Carman, K. R. 2010. The toxicological interaction between ocean acidity and metals in coastal meio benthic copepods *Marine Pollution Bulletin* 60, 2201-2208.
- Puinean, A. M., Rotchell, J. M. 2006. Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 62, 211 – 214.
- Rudder, J., Van de Wiele, T., Dhooze, W., Comhaire, F., Verstraete, W. 2004. Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2). *Water Research* 38, 184 – 192.
- Rudolf, S., Zhou, B. S., Randall, D. J., Woo, N. Y. S., Lam. P. K. S. 2003. Aquatic Hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction. *Environ. Sci. Technol* 37, 1137 – 1141.

- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, e., Hinfrey, N., Porcher, J. M. 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International* 37, 1342–1348.
- Scholz, S., Mayer, I. 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 293, 57–70.
- Scott, A. P., Katsiadaki, I., Witthames, P. R., Hylland, K., Davies, I. M., McIntosh, A. D., Thain, J. 2006. Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea? *Marine Environmental Research* 61, 149 – 170.
- Taylor, M. R., Holmes, P., Duarte – Davidson, R., Humfrey, C. D. N. Harrison, P. T. C. 1999. A research strategy for investigating the ecological significance of endocrine disruption: report of a UK workshop. *The Science of the Total Environment* 233, 181 – 191.
- Thibaut, R., Porte, C. 2004. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 92 485 – 494.
- Venkatesan, M. I., Merino, O., Baek, J., Northrup, T., Sheng, Y., Shisko, J. 2010. Trace organic contaminants and their sources in surface sediments of Santa Monica Bay, California, USA. *Marine Environmental Research* 69, 350 – 362.
- Vieira, V. A. R. O., Correia, T. G., Moreira, R. G. 2012. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, In Press*.
- Xu, X., Li, Y., Wang, Y., Wang, Y. 2011. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. *Toxicology in Vitro* 25, 294 – 300.
- Zagatto, A. P.; Bertoletti, E. (Eds) 2006. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima. 478p

CAPÍTULO 2

Exposição aquática de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae) ao alumínio: efeitos endócrinos, reprodutivos e de bioconcentração

1 – Introdução

O alumínio (Al) é amplamente utilizado pela sociedade humana. Sua aplicação vai desde a industrial, a construção civil, equipamentos eletrônicos, utensílios de cozinha, embalagens para alimentos, latas para refrigerantes a produtos de uso pessoal e farmacêuticos (Constantino *et al.*, 2002; Dávila *et al.*, 2012). Historicamente sua importância remonta aos primórdios da civilização, sendo empregado pelos egípcios no tingimento de tecidos, para fins medicinais pelos gregos e romanos, chegando até mesmo a ser considerado precioso, e devido a sua raridade no século XIX foi utilizado para adornar joias de coroas (Constantino *et al.*, 2002).

Em sua forma metálica não ocorre em estado puro (elementar) na natureza, ele é encontrado de forma combinada com rochas e minerais devido à alta afinidade pelo oxigênio. Embora constitua apenas cerca de 1% da massa da Terra, o Al é o primeiro metal e o terceiro elemento químico (O = 45,5%; Si = 25,7%; Al = 8,3%; Fe = 6,2%; Ca = 4,6%; outros = 9,7%) em massa mais abundante da crosta e que pode ser economicamente explorado pelo homem (Constantino *et al.*, 2002).

Na crosta terrestre o Al é encontrado em rochas ígneas, como feldspatos (aluminossilicatos tridimensionais), micas (silicatos lamelares) e em minerais como a criolita, espinélio, granada, berilo e coríndon. Muitas pedras preciosas contêm Al, como o rubi e a safira, por exemplo. O minério de importância industrial para obtenção do Al é a bauxita, que se forma em regiões tropicais e subtropicais pela força das intempéries (Constantino *et al.*, 2002). A forma natural do óxido de alumínio ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) é utilizada industrialmente como um abrasivo e a forma Al (OH)₃ tem aplicação direta nas indústrias de papel, tintas, vidros, cerâmicas, cremes dentais e retardantes de chamas (Dill, 2007).

O Al é encontrado nos ecossistemas aquáticos nas formas particulada e dissolvida. Em condições naturais ocorre a partir da erosão do solo formando Al particulado (Al_p), já a molécula Al (OH)₃ (forma precipitada) se forma na superfície das águas devido a hidrólise do Al dissolvido, que é mobilizado a partir da diminuição do pH da água a qual pode ocorrer naturalmente por desgaseificação do CO₂. A forma dissolvida deste metal é exportada do solo para a coluna d'água sob formas iônicas: mais comumente Al³⁺, formas hidroxiladas de Al ou complexado com flúor, silicatos sulfatos como também em complexos orgânicos, entre outros (Kopáček *et al.*, 2009).

A distribuição do Al em regiões litorâneas do mundo todo tem sido bem documentada, fato que permite reconhecer uma ampla variabilidade de formas complexadas deste metal. Esta distribuição é causada principalmente por fontes fluviais, especiação do sedimento para coluna d' água, dissolução de poeira eólica, chuvas, circulação de diferentes massas de água e atividade biológica (Ren *et al.*, 2006). A caracterização do Al para massas d'água continentais, com exceção da América do Norte, ainda é incipiente.

Por estar amplamente associado a minerais aluminossilicatos, o Al geralmente está indisponível para reações biogeoquímicas; contudo, atividades antropogênicas influenciam a ciclagem litosférica do Al, proporcionando um rápido influxo deste para a biosfera resultando no aumento da concentração deste metal para a coluna d' água (Krám *et al.*, 2009). Neste sentido, o principal responsável pelo aumento do aporte deste metal para os ecossistemas aquáticos é a acidificação do solo por chuvas ácidas, as quais promovem um aumento dos íons H^+ reduzindo o pH (Kroglund *et al.*, 2011; McCormick *et al.*, 2011). Além disso, outro efeito promovido pela chuva ácida é o esgotamento de formas lábeis de íons como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} (Krám *et al.*, 2009).

O $Al_2(SO_4)_3$ particularmente tem sido utilizado para reduzir o desenvolvimento do fitoplâncton e melhorar a transparência da água na precipitação de sólidos em suspensão em estações de tratamento de água mesmo tendo sido reconhecido que esta prática causa um aumento na concentração deste metal (Medina *et al.*, 2011). Adicionado a água, este sal de Al é conhecido por formar complexos hidrolisados e reações de polimerização com destaque as formas $(AlO_4, Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)^{7+}_{12})$ (Anderson e Berkovitz, 2010). Diferentes formas do Al aquoso apresentam toxicidade para a biota e a forma inorgânica tem sido considerada a mais tóxica (Krám *et al.*, 2009).

No pH neutro encontrado na maioria das águas naturais, a concentração de Al dissolvido (biodisponível) geralmente é baixa devido a pouca solubilidade do Al mineral, a hidrólise e a formação de Al $(OH)_3$ e a alta reatividade de hidróxidos polimerizados deste metal com ligantes insolúveis orgânicos e inorgânicos; contudo este metal é altamente solúvel em $pH < 6,0$ e $> 9,0$, (Vázquez *et al.*, 2010).

As formas insolúveis de Al geralmente são consideradas bioindisponíveis e, portanto pouco tóxicas aos organismos quando comparadas a forma iônica dissolvida

Al^{3+} ; (encontrada em pH ácido); entretanto estudos de laboratório têm demonstrado que em condições de pH neutro esta pode se bioconcentrar e portanto causar disfunções fisiológicas e comportamentais (Vázquez *et al.*, 2010). Os ligantes orgânicos e inorgânicos também apresentam um importante papel na solubilidade do Al, entre os quais poderiam se destacar a matéria orgânica, o Ca e o Si, respectivamente (Vázquez *et al.*, 2010). É importante destacar que a toxicidade do Al deve-se em parte a habilidade deste metal de se ligar ao fósforo (Exley *et al.*, 1993; Vrba *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2010).

A biodisponibilidade, acumulação e efeitos tóxicos dos metais são afetados por uma ampla variedade de fatores, incluindo especiação e associação com ligantes, nos quais, em geral as formas orgânicas solúveis são consideradas muito tóxicas aos organismos e mais biodisponíveis aos organismos topo na cadeia alimentar, por exemplo, o Al associado com compostos orgânicos de baixo peso molecular é mais tóxico do que quando associado a ligantes inorgânicos, tais como o fosfato. Similarmente, o Cd associado com proteínas é mais biodisponível a invertebrados marinhos, como decápodes, do que ligado a ligantes inorgânicos (Walton *et al.*, 2010).

Diante do exposto, considera-se que o Al, independente da forma complexada que pode vir a ser encontrado, tem em sua forma iônica aquela que vem a ser a mais preocupante e potencialmente tóxica sendo considerada um problema ecológico, pois pode vir a ser tóxico para uma variedade de organismos aquáticos ou terrestres, bem como para a saúde humana (Kopáček *et al.*, 2007).

A exposição humana ao Al a despeito da via é notoriamente tóxica, pois este metal acumula-se em vários órgãos e tecidos e é provável a sua participação no desenvolvimento de várias doenças, entre as quais se incluem anemia, distúrbios ósseos e desordens neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerose e encefalopatias (González *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Verstraeten e Aimo, 2008). Em peixes, as altas concentrações deste metal podem causar mortalidades, declínios populacionais, distúrbios na natação, alterações endócrinas, em vários parâmetros hematológicos, entre outros (Exley, 1996; Allin e Wilson, 2000; Vuorinen *et al.*, 2003; Royset *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2006; Correia *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012).

Considera-se de extrema importância avaliar os efeitos da exposição aquática ao Al em uma espécie neotropical, neste caso, *Astyanax bimaculatus* uma vez que esta

espécie pode ser considerada representativa de um ecossistema de água doce dentro de um contexto em que fontes de poluição difusa têm demonstrado um aumento na concentração deste metal em diversas bacias hidrográficas no Estado de São Paulo, uma vez que pouco se sabe sobre estes efeitos neste grupo de peixes, principalmente abrangendo aspectos reprodutivos.

Analisar a reprodução, em seus aspectos fisiológicos e moleculares em relação ao sistema endócrino e os possíveis eventos de desregulação hormonal, bem como a bioconcentração e distribuição do Al em diferentes tecidos e órgãos poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos de ecotoxicidade e preservação da ictiofauna, sendo este o principal objetivo deste trabalho.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Ensaio de toxicidade

Foram conduzidos ensaios para avaliação da toxicidade do Al em fêmeas adultas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus*, conhecido popularmente como lambari do rabo amarelo ou tambiú. A legislação brasileira dispõe de uma norma específica para testes de toxicidade com peixes, a qual varia de acordo com o tipo de teste empregado e finalidade. A ABNT-NBR 15088 (2004) corresponde a norma técnica nacional para testes ecotoxicológicos do tipo semi-estático com peixes de água doce; sendo assim, este estudo pautou-se nesta norma técnica para alcançar seus objetivos, cujo delineamento atendeu às condições específicas de execução.

2.1.1 – Desenho experimental

Os ensaios realizados foram do tipo semi – estático, ou seja, com renovação parcial de água (90 % do volume total) a cada 24 horas em dois períodos distintos de 96 horas, dos quais, o primeiro destes correspondeu ao período de exposição dos peixes ao pH ácido e ao Al em pH ácido, enquanto que o segundo período por sua vez correspondeu em manter os animais remanescentes em água limpa (ausência de Al) e em pH neutro, constituindo o intitulado período de recuperação. Pode – se dizer, portanto que este desenho experimental é do tipo semi-estático e agudo.

Os exemplares de *A. bimaculatus* estudados foram obtidos da piscicultura da CESP (Companhia Energética de São Paulo) localizada em Paraíbuna/SP. Para o transporte dos espécimes, os mesmos foram acondicionados em sacos plásticos com água e oxigênio e levados até o biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e mantidos em tanque de concreto de 1225 L durante 7 dias para aclimação, sendo posteriormente realocados para aquários de vidro com capacidade de 140 litros cada um. O número total foi de sessenta espécimes, distribuídos na densidade de 10 espécimes por aquário. Na figura 1 pode ser observada a área do biotério destinada aos experimentos e os aquários utilizados nos ensaios de toxicidade.

Figura 1: Área experimental (biotério) e os aquários utilizados nos ensaios de toxicidade com fêmeas maduras de *Astyanax bimaculatus*.

A água do biotério utilizada nos aquários foi proveniente da rede pública de abastecimento. Filtros portáteis de celulose e carvão ativado (5 µm) (modelos: IMPAC – CEP 10 e Aqualimp FICZ-10) foram utilizados para a retenção de partículas sólidas, redução de odores, matéria orgânica e eventuais agentes químicos tóxicos. Após este procedimento, para cada aquário foi preparado um reservatório (caixa plástica) com volume de 140 litros, o qual permaneceu sob aeração constante e temperatura controlada durante 24 horas pré-experimentais para volatilização do cloro (descloração) e assim estar em condições experimentais adequadas.

Durante todo o período experimental, para manter a concentração adequada de oxigênio dissolvido, a água dos aquários recebeu aeração constante com o uso de aeradores portáteis externos. A temperatura também foi mantida sob controle com o uso de termostatos. Além destes, outros parâmetros como o oxigênio dissolvido, o pH e os compostos nitrogenados também foram monitorados diariamente com o uso de oxímetro YSI, mod. 55, pHmetro portátil, digital, GEHAKA e kits colorimétricos (ALCON), respectivamente. O controle do pH ideal foi feito com a aplicação de hidróxido de sódio (NaOH 1,0 M) ou de ácido clorídrico (HCl 25%), ambos da marca SYNTH.

Para atender a proposta deste estudo foram necessários três grupos experimentais (duplicatas), separados entre: Grupo Controle em pH neutro (CTRL – n), Grupo pH ácido (pH – ac) e Grupo Alumínio em pH ácido (Al). A fase experimental foi composta de duas etapas, conforme já mencionado: exposição aguda ao pH ácido e ao Al em pH ácido, além do controle e recuperação. Para a primeira destas, os animais foram mantidos em um meio no qual a solução metálica foi introduzida. Ao término das

96 horas de exposição, foi feita uma amostragem em cada grupo (n=10) e os indivíduos restantes permaneceram por mais 96 horas nas mesmas condições que o grupo CTRL-n.

Na fase de exposição ao metal, a alimentação foi suspensa 24 horas antes do início do experimento, e oferecida *ad libitum* na fase de recuperação com ração balanceada específica para peixes, com teor protéico de 32%.

2.2. Preparação e manipulação do contaminante metálico

A solução estoque de Al foi preparada a partir do sal de Al_2SO_4 (MERCK). A massa deste sal foi mantida em estufa a 60° C durante 12 horas e após este período foi dissolvida em água 500 ml de água MilliQ para a obtenção da solução estoque. Esta solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar previamente lavado com HNO_3 10% SUPRAPUR (MERCK) e acidificada com o mesmo ácido a 65% e refrigerada a 4° C. Alíquotas de cada solução estoque foram pipetadas entre os aquários experimentais para a concentração nominal metálica de 0,5 mg.L⁻¹. O pH da água do grupo CTRL – n foi mantido em torno de 7,0 e para os grupos pH – ácido e Al em torno de 5,5, necessário para que o Al se dissolvesse.

A cada 24 horas, com o uso de bomba d'água, 90% do volume de água dos aquários foi descartada, e para reposição foi usada a água que permaneceu 24 horas nos respectivos reservatórios. Neste momento a solução metálica (estoque) foi reintroduzida nos meios experimentais. Amostras de água foram coletadas antes e após as trocas de água para análises de Al total, Al dissolvido, amônia total (NH_3), nitrito (NO_2) e pH. Este último, por sua vez, foi monitorado com maior rigor devido a sua relação direta com a biodisponibilidade de Al. Os parâmetros físico – químicos da água, juntamente com a concentração de Al foram analisados pela empresa Nova Ambi® - especializada em serviços analíticos seguindo protocolos do *Standard Methods* e com o sistema ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) Agilent® modelo 7500ce com sistema de reação óctuplo (ORS: *Octopole Reaction System*) em metodologia de ensaio conforme EPA 6020^a, respectivamente. O certificado de acreditação da empresa se encontra em anexo (anexo 1).

2.3 *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)

A família Characidae é amplamente heterogênea e possivelmente polifilética, neste aspecto, as relações filogenéticas ainda estão longe de ser satisfatoriamente

estabelecidas. Pertencente a esta família, está o gênero *Astyanax*, com espécies que se distribuem do Suriname até a Bacia do Prata, desde regiões costeiras até altitudes com cerca de 3.000 metros (Sato *et al.*, 2006).

Garutti e Briski (2000) realizaram uma revisão deste gênero e propuseram uma nova denominação da espécie *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) para *Astyanax altiparanae* referindo-se a espécie encontrada na bacia do rio Tietê e seus afluentes; contudo, Shibatta (comunicação pessoal) alerta para o fato de que apesar do trabalho de revisão supracitado, ainda não existe na literatura nenhum dado referente as populações de *Astyanax* na bacia do Paraíba do Sul e áreas circunvizinhas que aponte uma definição taxonômica específica.

Considera-se, portanto que *Astyanax altiparanae* talvez ainda não seja o nome adequado para estes peixes; permanecendo, portanto, *Astyanax bimaculatus*. Shibatta (comunicação pessoal) também considera que em publicações até o ano de 2007 ainda estão presentes nas citações *A. bimaculatus*, com a ressalva de que talvez mais de uma espécie esteja sendo referida com este nome. Desta forma devido a disparidade taxonômica e ao fato de que os exemplares utilizados neste estudo foram provenientes da Piscicultura da CESP em Paraibuna, região inserida na Bacia do rio Paraíba do Sul, optou-se por manter a classificação taxonômica anterior.

Esta espécie é considerada de pequeno porte, com comprimento médio variando de 10 a 15 cm e a massa corporal média pode chegar a 60 gramas. Possui um curto ciclo de vida, cuja maturidade sexual começa por volta dos 120 dias de vida e os machos durante o período reprodutivo apresentam um dimorfismo sexual muito conspícuo, visto que a nadadeira anal se torna áspera. Possuem hábito alimentar onívoro e ocupam importante status na cadeia trófica como forrageio de espécies carnívoras (Morais *et al.*, 2007).

Entre as justificativas para o uso desta espécie como modelo de estudo fisiológico e ecotoxicológico estão o interesse comercial (principalmente a pesca), a importância ecológica (podendo ser considerada entre as espécies que estão na “base da cadeia trófica”), o curto ciclo de vida e a representatividade como espécie neotropical, sendo apenas alguns exemplos. Na figura 2 está apresentada uma fêmea adulta de *A. bimaculatus*, e podem ser observados os ovários desenvolvidos, típicos de um animal que se encontra em período reprodutivo.

Figura 2: Fêmea adulta de *A. bimaculatus*. Ov: ovários

2.4 Procedimentos de amostragem de tecidos e plasma sanguíneo

Ao término de cada fase experimental, os peixes foram cuidadosamente retirados dos aquários e realocados para um volume de 10 L onde foram crioanestesiados, para em seguida serem mantidos sobre uma cuba de dissecação e contidos adequadamente com um pano úmido sobre os olhos, momento em que foi feita a coleta do sangue pela venopunção de vasos dorso – caudais com seringas heparinizadas (Liquemine – Roche®) tomando-se como referência anatômica a linha lateral do animal (Ishikawa *et al.*, 2010). O sangue obtido foi distribuído em frascos de 1,5 ml do tipo *ependorf* previamente heparinizados e centrifugados por 5 minutos na velocidade de 655,1 g para separação do plasma, que foi distribuído em alíquotas que permaneceram congeladas em freezer – 80° C até a sua utilização.

Após a coleta do sangue, os parâmetros morfométricos e ponderais foram tomados, os animais foram eutanasiados por dissecação medular na altura do opérculo e através de uma incisão ventral os seguintes tecidos foram removidos: brânquias, baço, rins, vesícula biliar, músculo branco, ovários e fígado. Foi necessário decepar a cabeça dos animais para obtenção do encéfalo e da hipófise, esta última por sua vez foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido. Todos os tecidos foram armazenados em freezer - 80° C e, com exceção do plasma e da hipófise, destinados a determinação da concentração de Al e Mn. Os ovários também foram utilizados para análise da fecundidade, cujo protocolo está descrito na seção de mesmo nome. A figura 3 ilustra algumas etapas da obtenção de plasma e tecidos corporais.

Figura 3: Obtenção de órgãos e tecidos de *Astyanax bimaculatus*. **A**: Coleta de sangue; **B**: Eutanásia por secção da medula espinal na altura do opérculo; **C**: Observação dos órgãos internos após incisão ventral; **D**: Procedimentos para remoção do encéfalo e da hipófise, **Seta**: encéfalo.

Todos estes procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 101/2009.

Apenas para confirmação microscópica do estágio de maturação ovariana, o terço médio deste órgão foi fixado em solução de Bouin acético (75 % de ácido pícrico, 20% de formol e 5% de ácido acético glacial) durante 20 - 24 horas e em seguida, este tecido foi lavado em água corrente, para retirada do excesso de fixador para posteriormente serem transferidos para etanol 70% até o momento do processamento, cuja inclusão foi feita em *paraplast* (Erv-Plast, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda). Os cortes histológicos de 5 μ m de espessura foram processados no Micrótomo Leica RM 2155, e em seguida estes foram corados pelo método rotineiro com Hematoxilina – Eosina (H.E). As imagens foram analisadas no microscópio DM1000 conectado a uma câmera Leica DFC 295 para captura de imagens.

A massa dos ovários e do fígado foi registrada em balança analítica para o cálculo do Índice Gonadossomático (IGS) e do Índice Hepatossomático (IHS), respectivamente. O IGS foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IGS = Wg \times 100 / Wt$$

Wg – massa dos ovários Wt – massa corpórea

O IGS é um índice que expressa a porcentagem que os ovários representam em relação à massa total do animal e é um indicador eficaz do estado funcional destes. Além das gônadas, o fígado também foi pesado em balança analítica para o cálculo do IHS, cuja fórmula está descrita abaixo.

$$IHS = Wh \times 100 / Wt$$

Wh – massa do fígado Wt – massa corpórea

O IHS expressa a porcentagem que o fígado representa em relação à massa total do animal e contribui para a interpretação de dados principalmente metabólicos e patológicos que envolvem este órgão.

2.5 – Dosagens hormonais

Os esteroides gonadais: Estradiol (E₂), 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP), os hormônios tireoideanos: Triiodotironina (T₃) e a Tiroxina total (T₄) foram quantificados no plasma pelo método de elisaimunoensaio (ELISA), com o uso de kits da marca Interkit[®], enquanto que o cortisol com kits também de ELISA da marca Monobind Inc[®]. As leituras ocorreram em leitora de microplacas no espectrofotômetro Spectra Max 250 (Molecular Devices). Todas as análises foram realizadas segundo instruções do fabricante.

2.6. Análise quantitativa de Al em tecidos e órgãos

2.6.1 Digestão ácida

A massa referente a cada tecido necessária para a quantificação de Al foi definida em testes preliminares, enquanto que para o encéfalo, o baço e a vesícula biliar foi necessário o órgão todo. Ambos, tecidos e órgãos tiveram sua massa registrada e foram secos em estufa a 60° C para obtenção do peso seco; em seguida foi realizada uma digestão ácida em HNO₃ suprapur (MERCK), também em 60° C durante 48 horas. O conteúdo obtido foi encaminhado para quantificação na Alemanha em ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) de acordo com a metodologia da EPA (*Environmental Protection Agency*) 6020A pela empresa terceirizada Nova Ambi

Serviços Analíticos. O certificado de acreditação da empresa alemã que realizou as análises estão em anexo (anexo 2).

2.7. Fecundidade e frequência oocitária

Após registrada a massa dos ovários e retirada a fração para a análise de Al, o tecido restante teve sua massa registrada e logo em seguida este tecido foi armazenado em solução de GILSON modificada (Simpson, 1951), cujos reagentes seguem a proporção: 880ml de água destilada; 100ml de álcool 60%; 18ml de ácido acético glacial; 15ml de ácido nítrico; 20g de cloreto de mercúrio sublimado). Após cerca de 60 dias nesta solução, os oócitos dissociados foram transferidos para etanol 70%. No momento da seleção de subamostras para análise, esta solução foi transferida para um volume maior de 1000 mL a partir do qual, com a utilização de uma pipeta Stempel, foi retirado 2,5 mL para as subamostragens.

Os oócitos foram analisados em uma microplaca de acrílico sob uma lupa acoplada a uma câmera fotográfica para captura de imagens. Em cada uma destas placas os oócitos foram contados e seu diâmetro registrado para os cálculos de frequência e fecundidade. As imagens obtidas foram tratadas no programa Leica Application Suite Professional DEC250.

Para determinação da frequência e do diâmetro oocitário, foi necessário estabelecer classes de diâmetros dos oócitos, tendo sido padronizado para estas análises dimensões que variaram a cada 100 µm, a partir das quais foi estimada a fecundidade absoluta (número de oócitos que seriam eliminados por uma fêmea, durante um período reprodutivo) e a fecundidade relativa em relação a massa corpórea.

O número total de oócitos na solução de Gilson foi calculado através da fórmula:

$$N = n \times V / v.$$

N - número de oócitos estocados no Gilson

n - número de oócitos contados na amostra de 2,5ml

v - volume da amostra (2,5ml)

V – 1000 ml (volume total da suspensão dos oócitos)

Determinados o número total de oócitos por fêmea, foi necessária a correção pela massa dos ovários que foram estocados na solução de Gilson, em relação a massa total das gônadas de cada animal com a seguinte fórmula:

$$N^* = N \times Wgt / WgG.$$

N^* - número de oócitos por fêmea

N - número de oócitos estocados no Gilson em determinado peso em gramas de ovários

$Wg G$ - peso das gônadas (em gramas) estocadas na solução de Gilson

$Wg t$ - peso total das gônadas em gramas

Com os valores referentes ao número total de oócitos por fêmea, estimou-se a fecundidade absoluta (FA) com a fórmula:

$$FA = N^* \times S / 100.$$

FA - número estimado de oócitos que serão eliminados em um período reprodutivo

N^* - número de oócitos por fêmea

S - somatória da frequência dos oócitos vitelogênicos.

A fecundidade relativa (FR) (em relação à massa corpórea) foi calculada com a seguinte fórmula:

$$FR = FA/Wt$$

FA = fecundidade relativa

Wt - massa corpórea total

2.8. Expressão gênica de gonadotropinas

Inicialmente, para a extração do RNA total hipofisário foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen[®]), que consiste em uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Este método é amplamente utilizado em biologia molecular sendo adequado para a extração de RNA total em inúmeras amostras, pois proporciona a solubilização simultânea de tecidos ou células e inativação de RNases endógenas. Entretanto, nos resultados iniciais deste estudo a quantificação do RNA total obtido por amostra não foi suficiente para a reação de transcrição reversa, o que requereria a utilização de um *pool* de amostras (3 aproximadamente) e consequentemente acabaria

por impor ajustes metodológicos indesejados. Diante disso, foi utilizado o kit de extração de RNA total - RNAqueous kit (Ambion Inc[®]) de acordo com instruções do fabricante, cujo rendimento médio foi de 0,9 µg/µl de RNA total por amostra.

A reação de transcrição reversa foi realizada com oligo dT *primer* (Promega[®]) e com a enzima RevertAID H Minus Reverse Transcriptase # EP0451 (Fermentas[®]) a partir de aproximadamente 0,5 µg de RNA total. O cDNA obtido foi submetido a uma reação de PCR a partir de *primers* degenerados para FSH e LH (subunidade β) dos estudos de Parhar *et al.*, (2003) no seguinte gradiente de temperaturas de associação dos oligonucleotídeos 40x (52.0; 52.2; 52.7; 53.6; 54.7; 56.1; 57.7; 58.8; 60.1; 61.2; 62.0; 62.4°C) para assim determinar as condições ideais para o funcionamento destes *primers*. Estas reações ocorreram no termociclador *Master Cycler* modelo *Nexus* gradiente (Eppendorf[®]). Todas as quantificações de DNA e RNA ocorreram no equipamento *Nanodrop*[™] *Spectrophotometer* (ND-1000).

Os fragmentos obtidos pela reação de PCR foram verificados em gel de agarose a 2% e, depois de constatado o tamanho de pares de bases esperado para cada gene (βFSH e βLH), procedeu-se a extração e purificação destas bandas do gel de agarose com o uso de *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN[®]), comparados com o marcador 100 pb. O produto amplificado na reação de PCR (inserto) foi clonado utilizando-se o vetor *pGEM-T Easy Vector Systems* – Promega[®], juntamente com a enzima T₄ DNA ligase (Promega[®]) de acordo com as instruções do fabricante. A proporção inserto - vetor foi de [3:1], respectivamente e a transformação bacteriana foi em colônias competentes de *Escherichia coli* linhagem DH5α, as quais permaneceram incubadas em estufa a 37°C por 24h, plaqueadas em meio SOB sólido com ampicilina, isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-gal).

Após este período de incubação para a reação de transformação bacteriana (inserção do vetor com o inserto nos plasmídeos bacterianos) foram selecionadas colônias brancas, pois teoricamente estas são recombinantes e contém o inserto de interesse, e removidas do meio sólido para o meio SOB líquido, com ampicilina por mais 24 horas a 37°C sob constante agitação. O DNA plasmidial obtido desta reação foi extraído (Miniprep) através da lise alcalina que é um dos procedimentos mais usuais e rápidos para a extração de plasmídeos bacterianos (Sambrook e Russel, 2001).

A reação de digestão plasmidial dos clones transformados ocorreu com a enzima de restrição ECORI *fast digest* #FD0274 (Thermo Scientific®) de acordo com as instruções do fabricante. Por intermédio de uma eletroforese o inserto foi analisado e comparado entre amostras digeridas e não digeridas. Subsequentemente, os clones contendo bandas cujo tamanho esperado foi constatado na eletroforese passaram por reação de sequência com os seguintes reagentes: tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂), e o kit para reação de sequenciamento *BigDye Terminator Cycle Sequencing*_v 3.1 (Applied Biosystem®), com os *primers* T7 ou SP6 (3.2 μM, Invitrogen®).

Estas reações ocorreram em termociclador nas seguintes condições: 96°C por 90 segundos, seguidos de 49 ciclos de 96°C por 20 segundos, 55° C por 20 segundos e 60° C por 4 minutos, sendo em seguida precipitadas e secas a 96°C por 2 minutos em termociclador. Estas amostras foram submetidas a um sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem), no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Os resultados da reação de sequência foram expressos em cromatogramas, que por sua vez foram analisados e editados no software *Bioedit Sequence Alignment Editor*. As respectivas sequências foram alinhadas no mesmo software e realizado o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) na base de dados pública para comparação e confirmação das sequências de nucleotídeos (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi). Confirmadas as sequências de FSH e de LH, procedeu-se a elaboração de *primers* internos específicos para a reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) utilizando-se a ferramenta online OligoPerfect™ Designer em <http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716&icid=fr-oligo-6>. Posteriormente as condições ideais do *primer* elaborado foram conferidas no software Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator em: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.

O gene utilizado como normalizador foi o ELF1 – α (*elongation factor*), descritos por McCurley e Callard, (2008) como ideal para estudos relacionados ao encéfalo de peixes. Os *primers* foram gentilmente cedidos pela pesquisadora Dra. Maria Inês Borella, pois estes foram delineados por Adolphi (2011) para a espécie *Astyanax altiparanae*. A partir destes *primers*, foi determinada sua especificidade para a espécie apresentada neste estudo *A. bimaculatus*, na qual o produto obtido foi sequenciado e os

primers internos desenhados, conforme metodologia supracitada para β FSH e β LH. O gradiente de temperatura para o PCR foi de: 94° C – 2 minutos, 94° C – 30 segundos, 58° C – 30 segundos, 72° C – 30 segundos (40 vezes); 94° C (40 vezes), 72° C – 7 minutos e *storage* 4°C.

2.8.1 PCR em tempo real (qRT-PCR)

Para a análise da expressão gênica e quantificação absoluta dos genes em questão: β FSH, β LH e ELF1- α , foi construída uma curva padrão com 10 pontos: 10⁰ a 10⁹ a partir dos plasmídeos dos quais os *primers* internos específicos foram elaborados. O DNA plasmidial, pGEM - T Easy Vector de 3015 bp contendo os insertos foi clivado com a enzima Scal #ER0431 (Thermo Scientific®) linearizando o vetor pelo lado oposto ao do inserto e os fragmentos gerados foram verificados em gel de agarose a 2%. As bandas obtidas foram extraídas do gel e purificadas pelo Protocolo Bench: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®).

O qRT-PCR proporciona a determinação da expressão quantitativa dos genes em tempo real, sendo sensível a ponto de detectar a presença de uma única cópia gênica e quantificar exatamente a expressão de um único gene (Novais *et al.*, 2004). Para tanto, os produtos amplificados em tempo real são quantificados através da emissão de sinal fluorescente. No presente trabalho foi feito o método de comparação de Ct (*cycle threshold* - ciclo limiar) ou $\Delta\Delta$ Ct. Durante os ciclos iniciais, o sinal de fluorescência, assim como previsto, foi fraco e não pôde ser distinguido da fluorescência basal (*background*). O ponto que detectou o ciclo no qual a reação atingiu o limiar da fase exponencial foi denominado de ciclo *Threshold*. A emissão dos compostos fluorescentes está diretamente relacionada à quantidade de DNA amplificado.

Foi utilizado o fluoróforo *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) ROX Solution* (#K0251) Thermo Scientific®, de acordo com as especificações do fabricante, juntamente com os *primers* específicos elaborados para este estudo referentes aos genes de interesse. Cada reação foi amplificada em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e 58,3°C por 20 segundos. A obtenção dos dados e a determinação do número de cópias das amostras foram feitas no termociclador *Exicycler*TM 96 através do software *Exicycler Diagnosis*3.

3. Análises estatísticas

Os resultados referentes as análises físico químicas da água foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão (DP), enquanto que os resultados biológicos de cada grupo estudado foram representados por médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os testes estatísticos foram realizados no programa estatístico SigmaStat (versão 3.5) e foi aplicada a Análise de Variância (One Way ANOVA) seguida do teste Tukey nas comparações paramétricas; contudo, para as análises não paramétricas foram aplicados os testes Kruskal-Wallis, ou Dunn's, sugeridos pelo software. O teste T foi utilizado na comparação entre o grupo do experimento agudo e seu respectivo grupo de recuperação.

4 – RESULTADOS

4.1- Características físico – químicas da água

A água destinada aos ensaios de toxicidade pode ser um interferente direto nos resultados obtidos em experimentos desta natureza; consequentemente, sua caracterização físico-química é essencial para a interpretação, discussão e proposição de efeitos tóxicos, neste caso, do Al. Considerou-se que dentre tais características, as apresentadas na tabela 1, (analisadas apenas uma vez, antes do início dos experimentos) que por sua vez revelaram a composição de alguns dos íons presentes na água da rede pública de abastecimento são representativas do contexto no qual estão alguns dos íons mais importantes que poderiam interagir com Al e Mn.

Tabela 1: Composição iônica da água de abastecimento da rede pública utilizada nos experimentos.

	Cálcio Total (mg.L⁻¹)	Ferro Total (mg.L⁻¹)	Cloreto (mg.L⁻¹)	Nitrogênio Total (mg.L⁻¹)	Sulfato (mg.L⁻¹)	Fosfato Total (mg.L⁻¹)
H₂O Biotério	8,88	0,09	4,9	0,4	12	0,46

Dentre outras características limnológicas importantes, estão as apresentadas na tabela 2, das quais se destaca principalmente a alcalinidade e a dureza.

Tabela 2: Características físico – químicas da água de abastecimento da rede pública utilizada nos ensaios de toxicidade. MO: matéria orgânica; CIT: carbono inorgânico total; COT: carbono orgânico total.

	Alcalinidade Total (mg.L ⁻¹) CaCO ₃	MO (%)	CIT (mg.L ⁻¹)	COT (mg.L ⁻¹)	Condutividade (uS/cm)	Dureza Total (mg.L ⁻¹)	Turbidez (NTU)
H₂O Biotério	15	19,2	1,2	1,3	65,5	26	1

4.1.1 – Temperatura, Oxigênio Dissolvido e Compostos Nitrogenados

A temperatura da água e a concentração de oxigênio dissolvido (OD) foram monitorados tanto no experimento agudo como na recuperação, cujas médias foram respectivamente de (25,19° C e 7,16 mg.L⁻¹) e (25,15 °C e 7,10 mg.L⁻¹) para o grupo CTRL – n, de (24, 59 °C e 7,18 mg.L⁻¹) e (25,15 °C e 7,25 mg.L⁻¹) para o grupo pH – ac e de (24,64 °C e 7,15 mg.L⁻¹) e (25,7 °C e 7,12 mg.L⁻¹) para o grupo Al.

A concentração de compostos nitrogenados, expressa em mg. L⁻¹ de amônia total (NH₃) e nitrito (NO₂⁻) mantiveram-se praticamente nulas, o que denota uma baixa taxa de excreção dos animais como também condições físico-químicas da água controladas e adequadas.

4.1.2 – pH

O pH recebeu especial atenção entre todas as variáveis hidroquímicas devida a sua capacidade de influenciar a especiação e biodisponibilidade metálica. Uma vez que a água utilizada neste experimento veio da rede pública de abastecimento e esta apresentou certa capacidade de tamponamento, isto implicou numa oscilação do pH com uma tendência a elevação da acidez em direção a neutralidade, a qual foi corrigida e registrada entre os intervalos de troca de água.

As tabelas 3 a 5 apresentam a média do pH entre os três grupos experimentais, antes e após as trocas de água entre cada intervalo de 24 horas, bem como sua respectiva variação. Entre os grupos experimentais, a variação média do pH após as 96 horas de exposição aguda foi de $0,11 \pm 0,02$ para o grupo CTRL – n, de $0,73 \pm 0,04$ para o grupo pH – ac e de $0,71 \pm 0,05$ para o grupo Al.

Tabela 3: Variação de pH durante as 96 horas de exposição aguda de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* do grupo CTRL – n (média $\pm$ DP).

Grupo Controle pH neutro – Média dos valores iniciais e finais de pH				
Intervalo de tempo (horas)	pH inicial	pH final	Média	Variação diária
0 – 24	7,06 $\pm$ 0,01	7,17 $\pm$ 0,04	7,12 $\pm$ 0,03	0,11
24* – 48	7,06 $\pm$ 0,05	7,22 $\pm$ 0,09	7,14 $\pm$ 0,02	0,16
48* – 72	7,07 $\pm$ 0,03	7,16 $\pm$ 0,00	7,12 $\pm$ 0,01	0,09
72* – 96	7,04 $\pm$ 0,01	7,96 $\pm$ 0,06	7,08 $\pm$ 0,02	0,08

Tabela 4: Variação do pH durante as 96 horas de exposição aguda aguda de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* do grupo pH – ac (média $\pm$ DP).

Grupo pH ácido Média dos valores iniciais e finais de pH				
Intervalo de tempo (horas)	pH inicial	pH final	Média	Variação diária
0 – 24	5,63 $\pm$ 0,07	6,52 $\pm$ 0,06	6,08 $\pm$ 0,06	0,89
24* – 48	5,52 $\pm$ 0,04	6,16 $\pm$ 0,08	5,84 $\pm$ 0,06	0,64
48* – 72	5,38 $\pm$ 0,18	5,98 $\pm$ 0,03	5,68 $\pm$ 0,10	0,61
72* – 96	5,35 $\pm$ 0,07	6,12 $\pm$ 0,06	5,73 $\pm$ 0,07	0,77

Tabela 5: Variação do pH durante as 96 horas de exposição aguda de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* do grupo Al (média $\pm$ DP).

Grupo Alumínio – Média dos valores iniciais e finais de pH				
Intervalo de tempo (horas)	pH inicial	pH final	Média	Variação diária
0 – 24	5,35 $\pm$ 0,03	6,12 $\pm$ 0,18	5,74 $\pm$ 0,03	0,77
24* – 48	5,23 $\pm$ 0,18	5,98 $\pm$ 0,02	5,61 $\pm$ 0,17	0,75
48* – 72	5,39 $\pm$ 0,02	6,04 $\pm$ 0,01	5,71 $\pm$ 0,02	0,65
72* – 96	5,27 $\pm$ 0,01	5,93 $\pm$ 0,04	5,60 $\pm$ 0,01	0,66

Os valores médios de pH da água do experimento de recuperação foram de 7,40 $\pm$ 0,01 para o grupo CTRL – n, e de 7,43 $\pm$ 0,04 para os grupos CTRL – ac e Al.

4.2 – Alumínio

A concentração nominal de Al, ou seja, a concentração introduzida nos aquários calculada a partir da solução mãe foi de $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$. As médias e os respectivos desvios padrões das concentrações de Al total (todas as formas de Al solúveis e insolúveis/precipitadas) foram de $0,0 \text{ mg. L}^{-1}$ para os grupos controle e de $0,6 \text{ mg. L}^{-1} \pm 0,07$ para o grupo Al, enquanto que a concentração de Al dissolvido, sendo esta a fração que teoricamente está biodisponível para os animais foi de $0,4 \text{ mg. L}^{-1} \pm 0,16$ também no grupo Al. A variação diária na concentração deste metal, nas frações total e dissolvida e sua relação com o pH para o grupo Al, encontra-se na figura 4. A concentração deste metal durante o período de recuperação foi nula entre todos os grupos experimentais.

Figura 4: Variação na concentração de Al total, dissolvido e de pH durante o experimento agudo com *Astyanax bimaculatus* no grupo Al. (*) Indicam os momentos das trocas de água.

4.3 – Índices corporais de *Astyanax bimaculatus*

As médias referentes ao comprimento total e a massa corpórea, além do IGS e do IHS de cada grupo experimental estão apresentadas na tabela 6, sendo que a massa corporal média dos animais de todos os grupos foi de $51,23 \pm 1,58 \text{ g}$ e o comprimento de $14,26 \pm 0,11 \text{ cm}$ para o experimento agudo e de $47,39 \pm 1,20 \text{ g}$ e $13,93 \pm 0,09 \text{ cm}$ de comprimento para o experimento agudo. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada para o IGS entre os grupos experimentais tanto no experimento agudo ($P=0,380$), como na fase de recuperação ($P=0,777$), ou na comparação

interexperimental: CTRL – n com CTRL – n ($P = 0,460$), pH – ac com pH – ac ($P = 0,447$) e entre Al com Al ($P = 0,465$). A análise estatística do IHS também não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais tanto no experimento agudo ($P = 0,061$) como na recuperação ($P = 0,452$) e nas respectivas comparações: CTRL – n com CTRL – n ($P = 0,453$), pH – ac com pH – ac ($P = 0,361$) e entre Al com Al ($P = 0,852$). Não foi registrada mortalidade em nenhum grupo experimental.

bela 6: Dados morfométricos, ponderais, IGS e IHS de *Astyanax bimaculatus* (média $\pm$ EPM).

ENSAIO	Grupos Experimentais	N	Comprimento Total (cm)	Massa Corpórea (g)	IGS (%)	IHS (%)
Agudo	CTRL – n	10	14,23 $\pm$ 0,85	54,25 $\pm$ 12,14	16,21 $\pm$ 8,82	0,80 $\pm$ 0,24
	pH – ac	10	14,68 $\pm$ 0,87	59,24 $\pm$ 11,34	18,56 $\pm$ 4,88	0,92 $\pm$ 0,22
	Alumínio	10	14,23 $\pm$ 0,90	44,98 $\pm$ 8,52	14,61 $\pm$ 5,38	1,06 $\pm$ 0,27
Recuperação	CTRL – n	10	14,00 $\pm$ 1,02	47,53 $\pm$ 13,81	17,75 $\pm$ 5,50	0,88 $\pm$ 0,24
	pH – ac	10	14,06 $\pm$ 0,73	48,48 $\pm$ 9,66	17,27 $\pm$ 2,32	1,04 $\pm$ 0,34
	Alumínio	10	13,65 $\pm$ 0,71	45,25 $\pm$ 8,05	16,31 $\pm$ 5,07	1,03 $\pm$ 0,34

A análise histológica dos ovários permitiu identificar microscopicamente o estágio de maturação, confirmando a análise macroscópica de que estas fêmeas estavam no estágio maduro do ciclo reprodutivo. A figura 5 é uma foto de microscopia que evidencia a maioria dos oócitos presentes no ovário como vitelogênicos.

Figura 5: Cortes histológicos dos ovários de *A. bimaculatus*. Aumento de 100 vezes (A) e 40 vezes (B). Oócitos perinucleolares (setas); Oócitos vitelogênicos (OV).

4.4 – Fecundidade e frequência oocitária

Neste estudo estão apresentados os dados referentes a fecundidade de *A. bimaculatus* (Tabela 7) como fecundidade relativa (FR), relacionada à massa corpórea.

A exposição aguda de *A. bimaculatus* ao pH ácido e ao Al não resultou em alterações sobre a FR ($P = 0,390$), embora o grupo CTRL – n tenha apresentado valores bem maiores do que os demais grupos. A FR dos animais do período de recuperação também revelou valores mais altos para o grupo CTRL – n, sendo neste caso, diferente estatisticamente dos grupos Al ($P = 0,002$) e pH – ac ($P = 0,003$). Apesar da análise estatística não ter revelado diferenças entre os grupos experimentais do período agudo, nota-se que em ambos os períodos experimentais a fecundidade dos grupos pH – ac e Al foram menores do que a fecundidade do grupo CTRL – n, o que demonstra um efeito negativo sobre a fecundidade dos animais dos grupos pH – ac e Al. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na comparação entre os grupos dos dois períodos experimentais, sendo todos os valores de P maiores do que $(0,05)$.

Tabela 7: Fecundidade relativa de *Astyanax bimaculatus* dos períodos de exposição aguda e de recuperação CTRL – n (grupo controle), pH – ac (grupo pH ácido), Al (grupo Al) (Média $\pm$ EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais

Fecundidade relativa a massa corpórea de <i>Astyanax bimaculatus</i>			
	CTRL - n	pH - ac	Al
AGUDO	444,17 $\pm$ 139,42	58,89 $\pm$ 23,41	53,06 $\pm$ 12,21
RECUPERAÇÃO	612,21 $\pm$ 108,54 ^a	72,70 $\pm$ 20,46 ^b	43,11 $\pm$ 5,47 ^b

A análise da frequência permitiu identificar oócitos de 100 a 1100 μ m de diâmetro, tendo sido adotado como critérios de classificação de 0 a 500 μ m oócitos perinucleolares e acima deste diâmetro oócitos vitelogênicos. Pode-se verificar que a porcentagem de maior ocorrência foi entre 701 a 900 μ m, o que corrobora a análise do estágio de maturação dos animais, como maduros (Figura 6).

Figura 6: Frequência oocitária de *Astyanax bimaculatus* de todos os grupos experimentais do período agudo e do período de recuperação. Grupo controle (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), alumínio (Al). A identificação (recup) indica os grupos do período de recuperação. Diâmetros oocitários separados em classes de 100 µm com variação de 0 a 1100 µm.

4.5 – Caracterização da Bioconcentração de Al

Neste estudo, a única rota de exposição dos peixes aos metais foi a aquática, portanto, considerou-se que a análise quantitativa de Al nos diferentes tecidos (mg.g^{-1}) foi de suma importância para auxiliar na compreensão da dinâmica de bioconcentração deste metal no organismo, portanto, foram selecionados 8 entre os principais tecidos e/ou órgãos para posteriores associações com disfunções fisiológicas.

A figura 7 apresenta a distribuição de Al entre os diferentes tecidos de *A. bimaculatus* do grupo Al, referente a fase de exposição aguda a este metal. Nesta figura se destacam principalmente as brânquias como o órgão em que ocorreu o maior acúmulo, seguidos pelo fígado, encéfalo e ovários.

Pode-se verificar na figura 8, que ocorreu uma redução em relação a bioconcentração de Al nas brânquias, pois este órgão está diretamente relacionado a interface água/organismo, e uma vez que o metal é removido do meio experimental há uma redução drástica no acúmulo deste metal, e embora tenham se mantido como os três principais órgãos alvo: brânquias, fígado e encéfalo, pode-se notar que os rins, ovários e baço também são locais de deposição do Al, embora em menores concentrações. A vesícula biliar por sua vez manteve-se praticamente inalterada, haja

vista que este órgão pode ser considerado uma possível via de excreção para o Al. Os valores encontrados nos grupos CTRL – n e pH – ac foram praticamente nulos ($0,0 \text{ mg.g}^{-1}$).

Figura 7: Bioconcentração de Al em (mg.g^{-1}) nos diferentes tecidos de *A. bimaculatus* do grupo Al após a fase de exposição aguda (média $\pm$ EPM).

Na tabela 7 está apresentada a média em mg.g^{-1} ($\pm$ EPM) da bioconcentração de Al nos diferentes órgãos e tecidos de *A. bimaculatus* da etapa de exposição aguda e da etapa de recuperação. Comparando-se as duas etapas experimentais, é importante destacar que as brânquias, fígado e encéfalo são os locais de maior deposição deste metal em ambas as etapas, e não foram encontradas diferenças estatísticas significativas, entre a fase aguda e recuperação nos grupos experimentais ($P > 0,05$).

Figura 8: Bioconcentração de Al em (mg.g^{-1}) nos diferentes tecidos de *Astyanax. bimaculatus* do grupo Al após a fase de recuperação (média $\pm$ EPM).

Tabela 7: Bioconcentração de Al nos diferentes órgãos e tecidos de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* nas duas etapas experimentais do grupo Al (média $\pm$ EPM).

Bioconcentração de Al (mg.g^{-1}) em diferentes órgãos e tecidos de <i>Astyanax bimaculatus</i>								
	Brânquias	Fígado	Encéfalo	Ovários	Vesícula	Baço	Músculo	Rins
AGUDO	83,83 $\pm$ 66,1	8,33 $\pm$ 4,2	6,19 $\pm$ 3,8	3,71 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 1,4	1,32 $\pm$ 0,3	0,14 $\pm$ 0,0	0,18 $\pm$ 0,0
RECUPERAÇÃO	9,21 $\pm$ 2,7	7,48 $\pm$ 1,8	5,07 $\pm$ 1,6	2,8 $\pm$ 2,4	1,0 $\pm$ 0,8	1,43 $\pm$ 1,2	0,1 $\pm$ 0,0 ^b	3,04 $\pm$ 1,6

4.6 – Hormônios Esteroides

A exposição de *A. bimaculatus* ao pH ácido e ao Al em pH ácido nas condições experimentais delineadas neste estudo não resultaram em alterações plasmáticas na concentração de E_2 e 17α – OHP em relação ao grupo CTRL – n. Entretanto, em ambos os casos, pode-se dizer que o pH ácido apresentou uma tendência a elevar as concentrações plasmáticas destes hormônios, enquanto que o Al apresentou uma tendência à diminuição (Figuras 9 e 10).

Foram encontrados os seguintes resultados estatísticos para o E_2 dos animais do período agudo: CTRL – n e pH – ac ($P = 0,463$), CTRL – n e Al ($P = 0,235$), sendo significativa apenas a comparação entre pH – ac e Al ($P = 0,030$). Da mesma forma, para a 17α – OHP as comparações entre CTRL – n e pH – ac ($P = 0,151$) e CTRL – n e Al ($P = 0,242$) não foram estatisticamente significativas, apenas a comparação pH – ac e Al foi estatisticamente significativa ($P = 0,005$) referentes ao período agudo.

Em relação a etapa de recuperação, não houve nenhuma alteração na concentração de E_2 ($P = 0,441$), enquanto que para 17α – OHP, os resultados observados para o pH – ac e para o Al foram opostos aos resultados observados após a exposição aguda, pois a concentração de 17α – OHP plasmática elevou-se nos animais do grupo primeiramente exposto ao Al e diminuiu nos animais do grupo pH – ac, embora estes dados não sejam estatisticamente distintos do grupo CTRL – n, ($P = 0,072$) e ($P = 0,778$) respectivamente, mas são diferentes quando comparados entre si ($P = 0,034$).

É importante também destacar que após a análise conjunta dos resultados das duas etapas experimentais comparando o grupo experimental do período agudo com seu respectivo grupo do período de recuperação, notou-se que a concentração plasmática de E_2 para grupo pH – ac diminuiu no período de recuperação ($P = 0,005$), não sendo observada nenhuma outra alteração para os grupos CTRL – n ($P = 0,464$) e Al ($P = 0,487$). Entretanto, conforme já mencionado anteriormente, para a 17α – OHP a diminuição deste hormônio no grupo pH – ac, da etapa de recuperação é estatisticamente diferente quando comparado ao seu respectivo grupo do período agudo ($P = 0,030$), da mesma forma o aumento hormonal observado para o grupo Al é estatisticamente significativo na comparação deste grupo entre as duas etapas experimentais ($P = 0,001$). Nas figuras 9 e 10 estão representados cada um destes resultados.

Figura 9. Concentração plasmática do hormônio 17β Estradiol em fêmeas *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), alumínio (Al). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas para o período agudo (ab). Os (*) indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

Figura 10. Concentração plasmática do hormônio 17α OHP em fêmeas de *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), grupo de exposição ao alumínio (Al). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais: para o período agudo (ab), para o período de recuperação (a'b'). Os (*) indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

Com relação ao CT os resultados das análises demonstraram que o Al causou diminuição na concentração plasmática após a exposição aguda ($P = 0,021$), contudo nenhum efeito foi observado após o período de recuperação ($P = 0,586$). Entretanto, a comparação interexperimental demonstrou que os animais expostos ao Al são capazes de recuperar-se quando o metal é removido do meio aquático ($P = 0,040$). A comparação entre os grupos CTRL – n e pH ácido não revelou diferenças estatísticas significativas ($P = 0,933$) e ($P = 0,307$), respectivamente (Figura 11).

Figura 11. Concentração plasmática do hormônio CT em fêmeas de *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), grupo de exposição ao alumínio (Al). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais para o período agudo (ab). Os (*) indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

4.7 – Hormônios Tireoidianos

Além dos esteroides supracitados, também foram analisadas as concentrações plasmáticas dos hormônios T_3 e T_4 para verificar se estes hormônios também apresentariam algum tipo de alteração quando os animais foram expostos ao Al e ainda se os animais seriam capazes de reajustar tais alterações no período de recuperação.

Após as 96 horas de exposição ao pH ácido e ao Al em pH ácido, houve um aumento na concentração plasmática de T_3 apenas para os animais do grupo Al ($P = 0,001$). Após o período de recuperação, não se observou nenhuma alteração plasmática estatisticamente relevante ($P = 0,855$). Contudo, houve uma considerável redução na

concentração plasmática deste hormônio para os animais do grupo Al, sendo que a comparação deste grupo entre as duas etapas experimentais foi estatisticamente diferente ($P = 0,003$). As demais comparações dos grupos CTRL – n e pH ácido entre seus respectivos grupos dentre as duas etapas experimentais não foram estatisticamente relevantes, ($P = 0,797$) e ($P = 0,769$), respectivamente (Figura 12).

Os animais dos grupos pH – ac e Al após as 96 horas de exposição aguda apresentaram uma redução na concentração plasmática T_4 em relação ao CTRL – n ($P = 0,007$). Nenhuma alteração hormonal entre os grupos foi registrada após o período de recuperação ($P = 0,735$), bem como entre as comparações interexperimentais CTRL – n ($P = 0,109$), pH – ac ($P = 0,914$) e Al ($P = 0,204$) (Figura 13).

Figura 12. Concentração plasmática do hormônio T_3 em fêmeas *Astyanax. bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), grupo de exposição ao alumínio (Al). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais para o período agudo (ab). Os (*) indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

Figura 13. Concentração plasmática do hormônio T_4 em fêmeas *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), grupo de exposição ao alumínio (Al). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais para o período agudo (ab).

4.8 – Expressão gênica de FSH e LH

Do cDNA obtido a partir da extração de RNA total das hipófises de *A. bimaculatus*, foram utilizados *primers* degenerados para o β FSH e β LH corresponderam de forma eficiente ao amplificarem na reação de PCR produtos cujo tamanho em pares de bases foi o esperado, neste caso, 260 pb para o β FSH (Figura 14) e 270 pb para o β LH (Figura 15).

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 2 % do produto de PCR gerado a partir dos *primers* degenerados para β FSH. O marcador utilizado foi o de 100 pb. Nota-se que o material amplificado tem cerca de 300 pb.

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 2 % do produto de PCR gerado a partir dos *primers* degenerados para β LH. O marcador utilizado foi o de 100 pb. Nota-se que o material amplificado é pouco menor do que 300 pb.

O produto encontrado para o β FSH e para o β LH foi sequenciado e em seguida comparado junto ao banco de dados do GenBank. A sequência de pares de bases (produto) encontrada para o β FSH pode ser conferida na figura 16 e o resultado do BLAST desta sequência pode ser visto na figura 17.

FSH

ACCAACATCAGCATCACCGTGGACACCTGCGGCTTCGTCGACACCACCATTTGTG
AAGGACAGTGTTCAGAAAGGATCCCAACTTCATTCATACTGACGACTGGCCCAA
ACAGAAAACCTGCAACGGAGAGTGGTCTACGAGGTGAAATACACAGAGCAATG
TCCACGGGGTTTCATCTACCCTGTGGCCAGGAAGTGCGAGTGCACTGCATGCAAT
GCAAACACAGACTGCGGGACCTTGTCTGGATACATACCCAGCTGTCTGTA

Figura 16: Sequência obtida, editada e comparada no BLAST para o β FSH de *Astyanax bimaculatus*. Total de 269 bases.

Sequences producing significant alignments:					
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	
XM_003450793.1	PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> FSH beta subunit (LOC100534500)	466	466	97%	
AY294015.1	<i>Oreochromis niloticus</i> FSH beta subunit mRNA, complete cds	466	466	97%	
AF289174.1	<i>Oreochromis mossambicus</i> follicle stimulating hormone beta subunit r	460	460	97%	
HQ147566.1	<i>Haplochromis burtoni</i> follicle stimulating hormone beta subunit mRNA	433	433	97%	
AF289173.1	<i>Oreochromis mossambicus</i> follicle stimulating hormone beta subunit c	348	467	97%	
EU315918.1	<i>Cichlasoma dimerus</i> follicle stimulating hormone beta subunit mRNA,	298	298	86%	

Figura 17: Resultado do BLAST da sequência obtida e editada para o β FSH de *A. bimaculatus*

A sequência de pares de bases (produto) encontrada para o β LH pode ser conferida na figura 18 e o resultado do BLAST desta sequência pode ser visto na figura 19.

LH

TTTCAGACCACTATTTGCAGTGGACATTGCCTACCAAGGATCCGGTGTACAAGAG
CCCATTCTCCACCATCTATCAGCATGTGTGCACCTATAGGGATGTTTCGCTATGAAA
TTGTTTCGCTGCCTGACTGTCCCCCTGGTGTGGACCCTTATGTCACATATCCTGTAG
CTCTCAGTTGTGACTGTAGCCTGTGCACCATGG

Figura 18: Sequência obtida, editada e comparada no BLAST para o β LH de *Astyanax bimaculatus*. Total de 202 bases.

Sequences producing significant alignments:				
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
X97761.1	C.gariepinus mRNA for gonadotropin hormone beta-subunit	221	221	100%
S69276.1	gonadotrophin II beta subunit [Oncorhynchus masou=masu salmon,	210	210	99%
HM057171.1	Salvelinus namaycush luteinizing hormone beta subunit (LH) mRNA, p	205	205	99%
NM_001173671.1	Salmo salar Gonadotropin subunit beta-2 (gthb2), mRNA >gb BT059	205	205	99%
NM_001124205.1	Oncorhynchus mykiss luteinizing hormone beta subunit (LOC100135E	205	205	99%
M27154.1	Chum salmon gonadotropin-II beta subunit (sGTHII-beta) mRNA, cor	205	205	99%
NM_001200080.1	Ictalurus punctatus gonadotropin beta 2 subunit (LOC100304481), r	203	203	100%
AY250760.1	Oncorhynchus kisutch luteinizing hormone beta mRNA, partial cds	201	201	99%
AY515501.1	Brachymystax lenok luteinizing hormone beta subunit mRNA, complet	201	201	99%
AF146151.1	Salmo salar gonadotropin II beta subunit mRNA, partial cds	201	201	99%
AY973946.2	Silurus meridionalis gonadotropic hormone LH subunit beta mRNA, co	197	197	100%
X04404.1	Salmon mRNA for gonadotropin beta subunit (beta-GTH)	190	190	99%
HM217218.1	Schizothorax prenanti gonadotropin II beta subunit mRNA, complete	188	188	100%
F7619108.1	Triploid Carassius cuvieri x allotetraploid hybrid luteinizing hormone b	185	185	100%
EF565171.1	Ctenopharyngodon idella luteinizing hormone beta subunit mRNA, cor	185	185	100%
X61051.1	C.idella mRNA for gonadotropin beta subunit	185	185	100%
L23431.1	Coregonus autumnalis migratorius Georgi gonadotropin II beta subun	183	183	99%
AF319960.1	Mylopharyngodon piceus luteinizing hormone beta subunit mRNA, cor	179	179	100%
F7619107.1	Allotetraploid red crucian carp x Cyprinus carpio luteinizing hormone	176	176	100%
EF565164.1	Hypophthalmichthys nobilis LH-beta subunit mRNA, complete cds	176	176	100%
D88024.1	Carassius auratus GTHII mRNA for gonadotropin II beta subunit, com	176	176	100%
EF494676.1	Labeo rohita gonadotropin subunit beta-2 precursor (GTHII) mRNA, p	167	167	94%
L17140.1	Oncorhynchus tshawytscha gonadotropin II beta subunit gene frag	167	167	81%
AB603807.1	Misgurnus anguillicaudatus LH-beta mRNA for luteinizing hormone-be	161	161	100%
DQ025694.1	Oncorhynchus nerka clone One.LHB.30.27 genomic sequence	158	158	75%
AY770579.1	Rutilus rutilus gonadotrophic hormone II mRNA, partial cds	152	152	100%
DQ242617.1	Pimephales promelas luteinizing hormone beta subunit mRNA, partial	152	152	100%
EF194763.1	Ctenopharyngodon idella luteinizing hormone beta subunit (LH) gene	145	191	100%
AY714132.1	Danio rerio luteinizing hormone beta-subunit (lhb) mRNA, complete c	145	145	99%
AY533545.1	Danio rerio luteinizing hormone beta mRNA, partial cds	145	145	99%
NM_205622.2	Danio rerio luteinizing hormone, beta polypeptide (lhb), mRNA >gb B	145	145	99%
AY424305.1	Danio rerio luteinizing hormone beta 2 mRNA, complete cds	145	145	99%
X59889.1	C.carpio gene for gonadotropin beta subunit 2	145	145	81%

Figura 19: Representação parcial do resultado do BLAST da sequência encontrada e editada para o β LH de *Astyanax bimaculatus*.

A partir destes resultados, foram desenhados os *primers* específicos para β FSH e para o β LH de *A. bimaculatus* para a reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para gerar um produto de PCR com tamanho próximo de 100 pb, tamanho esse ideal para este tipo de reação. As sequências de pares de bases destes *primers* são as seguintes:

β FSH primer qRT-PCR

FW (forward): CGACACCACCATTTGTGAAG

R (reverse): GTAGGACCACTCTCCGTTGC

β LH primer qRT-PCR

FW (forward): CCAAGGATCCGGTGTACAAG

R (reverse): ACAGTCAGGCAGGCGAAC

Em relação ao ELF - 1 α , a reação de PCR gerou um fragmento (Figura 20), demonstrando a especificidade do *primer* testado. A sequência editada deste fragmento gerado pode ser verificada na figura 21 e o resultado do BLAST para este mesmo gene pode ser verificado na figura 22.

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 2 % do produto de PCR gerado a partir dos *primers* de Adolphi (2011). Seta: fragmento com cerca de 300 pb.

```
TGGCTTTCACCCTGGGAGTGAAGCAGCTTATCGTTGGAGTCAACAAGATGGATTCCACCG  
AGCCCCATACAGCCAGGCTCGTTTTGAGGAAATCACCAAGGAAGTCAGCGCCTACATCA  
AGAAGATTGGCTACAACCCTGCCACCGTTGCTTTGTCCAATTTCTGGCTGGCACGGA
```

Figura 21: Sequência obtida, editada e comparada no BLAST para o EIF 1 – α de *Astyanax bimaculatus*. Total de 179 bases.

Sequences producing significant alignments:				
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
JQ219107.1	Onychostoma macrolepis elongation factor 1-alpha-like mRNA, com	268	268	97%
AF485331.1	Cyprinus carpio elongation factor 1-alpha mRNA, complete cds	268	268	97%
DQ086171.1	Ictalurus punctatus eukaryotic translation elongation factor 1 alpha	265	265	100%
FJ587496.1	Squalius carolitertii elongation factor 1-alpha mRNA, partial cds	259	259	100%
FJ587495.1	Squalius alburnoides elongation factor 1-alpha mRNA, partial cds	259	259	100%
FJ587494.1	Squalius pyrenaicus elongation factor 1-alpha mRNA, partial cds	259	259	100%
FJ769370.1	Rutilus rutilus elongation factor 1-alpha mRNA, partial cds	259	259	100%
AY643400.1	Pimephales promelas elongation factor 1-alpha mRNA, complete cds	259	259	100%
FJ915061.1	Danio rerio elongation factor 1-alpha (ef1a) mRNA , partial cds	257	257	99%
AY422992.1	Danio rerio eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1	257	257	99%
NM_131263.1	Danio rerio eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, like 1	257	257	99%
BC064291.1	Danio rerio elongation factor 1-alpha, mRNA (cDNA clone MGC:7764	257	257	99%
DQ083545.1	Danio rerio eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 mRNA	257	257	99%
X77689.1	B.rerio ef-1 alpha mRNA	257	257	99%
L47669.1	Brachydanio rerio translation elongation factor 1 alpha (EF1a) gene	257	257	99%
L23807.1	Danio rerio elongation factor 1 alpha (EFL1-alpha) mRNA, complete	257	257	99%
GQ266394.1	Ctenopharyngodon idella elongation factor 1-alpha (EF-1a) mRNA, l	254	254	100%
HM120251.1	Scarus iseri elongation factor EF1 alpha (EF-1alpha) mRNA, partial	250	250	97%
AB491059.1	Sebastes schlegelii mRNA, clone: BRF 41-H9, induced by treatment	248	248	100%
NM_001039985.1	Danio rerio eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, like 2	241	241	92%
AB056104.1	Carassius auratus mRNA for elongation factor-1 alpha, complete cd	241	241	97%
JN413300.1	Squalius pyrenaicus voucher I126 translation elongation factor alph	233	233	90%
JN413299.1	Squalius pyrenaicus voucher 135 translation elongation factor alph	233	233	90%
JN413298.1	Squalius pyrenaicus voucher 134 translation elongation factor alph	233	233	90%
JN413297.1	Squalius carolitertii voucher M7 translation elongation factor alpha	233	233	90%

Figura 22: Representação parcial do resultado do BLAST da sequência encontrada para o EIF 1 – α de *Astyanax bimaculatus*.

A sequência dos *primers* gerados para as reações de qRT – PCR de EIF 1 – α são as seguintes:

EIF 1 α primer qRT-PCR

FW (forward): GGGAGTGAAGCAGCTTATCG

R (reverse): CGCTGACTTCCTTGGTGATT

4.9 – Resultados do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A figura 23 mostra o resultado da expressão gênica referente a quantificação normalizada pelo gene normalizador EIF 1 – α em número de cópias absolutas do gene responsável pela subunidade β do hormônio LH. A exposição ao pH ácido e ao AI nas condições experimentais testadas não implicaram em modificações na expressão deste gene. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas tanto para o experimento de exposição aguda ($P = 0,798$) quanto para a fase de recuperação ($P = 0,821$).

Os resultados e testes iniciais foram positivos para ambos os *primers* testados, para as duas gonadotropinas (FSH e LH), demonstrando especificidade na reação de PCR ao gerar fragmentos de tamanho esperado e as sequências destes fragmentos foram confirmadas no BLAST para os genes em questão. No entanto, as reações de qRT – PCR referentes aos *primers* da subunidade β do FSH, mostraram que este *primer* foi

totalmente inespecífico para as amostras testadas de *A. bimaculatus*, não obstante tenham se mostrado eficientes nas reações de construção da curva padrão. Esta inespecificidade dos *primers* inviabilizaram as reações de qRT – PCR para o β FSH. Necessariamente outros *primers* deverão ser desenhados e testados exaustivamente para a obtenção de resultados de expressão gênica deste gene para *A. bimaculatus*.

Figura 23: Número de cópias absolutas do mRNA de β LH normalizadas pelo número de cópias do mRNA de ELF 1 – α de *Astyanax bimaculatus*. Grupo controle (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), AI em pH ácido (AI).

5. Discussão

A caracterização dos parâmetros físico-químicos da água descritos nas tabelas 1 e 2 apresentam relevância em ensaios de toxicidade com metais e são imprescindíveis para este estudo pelo fato de que a água utilizada foi obtida da rede pública de abastecimento, e estes parâmetros apresentam uma relação direta com a biodisponibilidade do Al e com o bem estar de *Astyanax bimaculatus*, pois estes animais antes do início dos experimentos estavam em águas naturais não tratadas. Portanto, as características físico-químicas da água não poderiam ser contrastantes a ponto de causar implicações na aclimação dos animais.

Resultados empíricos prévios em experimentos com Al e com espécies do gênero *Astyanax*, além do embasamento literário (Teien *et al.*, 2007 e Correia, 2008) subsidiaram a seleção dos parâmetros físico-químicos descritos nas tabelas 1 e 2 como adequados e suficientes para a condução dos experimentos aqui propostos e para responder aos objetivos deste estudo. Os resultados permitem dizer que estes parâmetros não interferiram na toxicidade do Al testada neste estudo.

A temperatura, o OD, os compostos nitrogenados e o pH, diferentemente das variáveis apresentadas nas tabelas 1 e 2 foram monitorados devido a essencialidade destas variáveis para a aclimação e sobrevivência dos animais além da relação direta com a toxicidade e biodisponibilidade de Al. A temperatura é um fator limitante nos ecossistemas aquáticos, sendo provavelmente a mais importante variável ambiental, pois pode afetar atividades metabólicas, crescimento, alimentação, reprodução, distribuição e comportamento de migração nos organismos aquáticos (Lawson, 2011). Além disso, sua importância como fator abiótico se destaca por afetar a solubilidade de gases dissolvidos e por ser importante na determinação da toxicidade e sensibilidade de um organismo a um composto químico (Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

De acordo com Honji, (2011) em experimentos conduzidos com *Steindachneridion parahybae* (Surubim do Paraíba) com água do reservatório de Paraíbauna, local de onde os exemplares de *A. bimaculatus* foram trazidos, foram registradas variações de temperatura de 23,0° C a 25,0° C, sendo a média anual de 21,33 ± 0,38 ° C, portanto, a temperatura média mantida e monitorada durante todo o experimento de 25,05 ± 0,1° C foi adequada para este estudo.

O monitoramento do OD, assim como a temperatura foi essencial, pois o OD afeta a toxicidade de várias substâncias dissolvidas na água (Aragão & Araújo, 2006). Sabe-se que espécies congêneres como o *Astyanax altiparanae* são muito sensíveis a baixa oxigenação da água (Porto – Foresti *et al.*, 2005), sendo assim, a concentração de OD monitorada neste estudo com valores em torno de $7,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de OD enquadram-se nos padrões ideais de qualidade de água para peixes (Boyd, 1990).

Os compostos nitrogenados como NH_3 , NO_2 e NO_3 são tóxicos para os peixes e a concentração tóxica varia de acordo com a espécie e o ambiente (Martinez e Souza, 2002; Lemarié *et al.*, 2004; Reis e Mendonça, 2009). Os resultados deste estudo demonstraram que estes compostos ficaram abaixo das concentrações mínimas capazes de causar toxicidade em todos os grupos experimentais.

O pH da água é extremamente importante, não apenas para estudos relacionados a toxicidade do Al, mas a toxicidade dos metais de uma forma geral, e especificamente neste estudo o delineamento dos grupos pH – ac e Al com o pH nominal da água em torno de 5,5 foi devido a natureza química do Al de se dissolver apenas em meio ácido ou básico. Estudos prévios demonstraram que este valor de pH é bem tolerado por *A. bimaculatus* (Vilela e Hayashi, 2001).

A alcalinidade representa a capacidade que um sistema aquoso tem para neutralizar ácidos sem perturbar de forma extrema as atividades biológicas que nele se processam (efeito tampão natural da água). A concentração em mg. L^{-1} de alcalinidade total abaixo de 10 indica uma baixa capacidade de tamponamento, enquanto que acima de 20 mg. L^{-1} uma boa capacidade de tamponamento. Os resultados deste estudo, de 15 mg.L^{-1} de alcalinidade total expressos em CaCO_3 podem indicar uma capacidade intermediária de tamponamento (Neal, 2001; Addy *et al.*, 2004).

A dureza da água é representada principalmente por cátions como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} , mas também por Sr^{2+} , Al^{3+} e Fe^n , sendo associada a origens naturais ou antropogênicas. Pode ser classificada em dois tipos: carbonada e não carbonada, a primeira destas corresponde a capacidade de tamponamento da água. Usualmente a água pode ser classificada quanto a dureza em: mole: $< 50 \text{ mg L}^{-1}$ de CaCO_3 ; moderada: entre 50 e 150 mg L^{-1} de CaCO_3 ; dura entre 150 e 300 mg L^{-1} de CaCO_3 e muito dura: $> 50 \text{ mg.L}^{-1}$ de CaCO_3 (Gasporotto, 2011). Os resultados de 26 mg.L^{-1} de CaCO_3 caracterizam uma água mole, podendo este resultado interferir diretamente na

toxicidade do Al. Devido principalmente ao intenso monitoramento do pH, alcalinidade e a dureza foram determinados principalmente por influenciarem a biodisponibilidade do Al.

A condutividade se refere a capacidade da água de conduzir corrente elétrica e indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água, e portanto representa uma maneira indireta da concentração de substâncias químicas dissolvidas na água. Altos valores podem indicar características corrosivas. A condutividade de 65,5 uS/cm aqui reportada é a esperada para água doce (APHA, 1992) e indica uma água não poluída (CETESB, 2009).

A turbidez é a medida da dificuldade de um feixe de luz atravessar certa quantidade de água, conferindo uma aparência turva à mesma. A medida de turbidez é expressa em NTU (*Nephelometric Turbidity Units*). As principais causas da turbidez da água são: presença de matérias sólidas em suspensão (silte, argila, sílica, colóides), fitoplânctons, matéria orgânica e inorgânica, organismos microscópicos e algas (Lima, 2010). O resultado encontrado para turbidez de 1 NTU, se enquadra nos padrões de potabilidade e não implica em interferências nesta proposta experimental.

Determinar a composição da matéria orgânica (MO) da água pode expressar a presença de moléculas orgânicas, tais como proteínas, ureia, lipídeos, celulose e também poluentes orgânicos, como fenóis e pesticidas, podendo afetar a concentração de oxigênio dissolvido ou ainda permitir a solubilidade de compostos tóxicos, liberar odores indesejáveis, favorecer o crescimento de algas, entre outros fatores (Baker e Spencer, 2004). Os valores para esta variável de 19,2% encontrados neste experimento indicam o funcionamento adequado do sistema de filtragem para remoção da matéria orgânica, podendo-se afirmar que não são interferentes relevantes nestas condições experimentais.

A medida de carbono inorgânico total (CIT) reflete o carbono inorgânico livre ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{CO}_3$), os íons bicarbonato (HCO_3^-) e os íons carbonato (CO_3^{2-}). A atividade de micro-organismos, a variação de temperatura e de pH interferem qual molécula estará mais presente. O carbono orgânico total (COT) se refere ao carbono orgânico dissolvido (COD) e ao carbono orgânico particulado (COP).

A fração dissolvida da MO compreende substâncias não húmicas, tais como carboidratos, lipídeos e proteínas (baixa massa molar) e substâncias húmicas (ácidos e complexas moléculas orgânicas com alta massa molar). Ambos CIT e COT podem interferir nos processos de especiação e complexação metálica (Ma *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2004). Os valores de CIT e COT de 1,2 % e 1,3% respectivamente não podem ser relacionados como interferentes neste experimento. Todos os dados apresentados na tabela 2 expressam valores das variáveis que não interferiram diretamente nos resultados de exposição aos metais neste estudo.

Índices internacionais de qualidade de água para proteção da vida aquática limitam a concentração de Al dissolvido em água doce em torno de 0,005 a 0,1 mg.L⁻¹ (Alberti *et al.*, 2005), enquanto que a legislação brasileira regulamentada pelo CONAMA, limita a concentração de Al dissolvido entre 0,1 a 0,2 mg.L⁻¹ de acordo com as classes de água doce (CONAMA 357, 2005). Além disso, cerca de 35 % das bacias hidrográficas do Estado de São Paulo encontram-se com a concentração de Al dissolvido acima do padrão CONAMA (CETESB, 2008, 2010, 2011). Diante deste contexto, a concentração nominal escolhida neste estudo de 0,5 mg.L⁻¹ representa uma média da concentração de Al dissolvido encontrada nos rios da bacia hidrográfica do Alto Tietê, estado de São Paulo.

A oscilação registrada para o pH no grupo Al resultou em variações na concentração de Al dissolvido ao longo das 96 horas de exposição, entretanto a média de 0,4 mg.L⁻¹ registrada para o experimento indica um alto valor para a biodisponibilidade deste metal, logo a biodisponibilidade pode ser definida como a fração de uma substância que vai exercer um efeito sobre um organismo (Berthelot *et al.*, 2008), portanto, os efeitos tóxicos encontrados neste estudo podem ser seguramente associados aos efeitos da exposição ao pH ácido e ao Al em pH ácido.

Astyanax bimaculatus, dependendo das condições ambientais pode apresentar desova total ou parcelada, portanto apresenta uma estratégia reprodutiva oportunista (Sato *et al.*, 2006). De acordo com este mesmo autor, o valor mais comumente encontrado na literatura para o IGS em fêmeas maduras desta espécie é de cerca de 16 a 20%. Estes dados estão próximos aos obtidos neste estudo, em torno de 17%.

Os resultados deste estudo demonstram que os valores encontrados para a FR do grupo CTRL – n corrobora os dados da literatura (Sato *et al.*, 2006), e evidenciam um

efeito negativo da acidez da água e do Al sobre a fecundidade de *A. bimaculatus*, embora os animais amostrados nas primeiras 96 horas experimentais não tenham exibido estes resultados, pode-se perceber estes efeitos nos animais que permaneceram confinados nos aquários após as 192 horas experimentais. Desta forma, apesar de *A. bimaculatus* ser uma espécie que pode apresentar plasticidade reprodutiva, este estudo demonstra que a exposição aguda ao pH ácido e ao Al em pH ácido com uma concentração subletal de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de Al dissolvido foi capaz de influenciar negativamente a fecundidade, e provavelmente a reprodução desta espécie neotropical. Estão amplamente descritos na literatura os efeitos negativos do Al e do pH ácido em espécies de peixes de regiões setentrionais, principalmente salmonídeos, os quais estão associados a prejuízos na reprodução, com atrasos e inibição na ovulação e desova (Vuorinen *et al.*, 2003; 2004), falhas no recrutamento oocitário (Buckler *et al.*, 1995), e declínios populacionais (Poléo, 1995; Exley, 1997).

As informações sobre as consequências da exposição ao pH ácido e ao Al em um contexto neotropical ainda são escassos. Os relatórios da CETESB dos últimos 10 anos, conforme já citado anteriormente têm apontado um aumento na concentração do Al em rios e tributários, cuja fonte responsável não está associada a efluentes antrópicos, sendo considerado um fenômeno associado a processos de erosão ou outros processos naturais.

A represa de Ponte Nova, localizada no município de Salesópolis/SP, pertencente a Bacia do Alto Tietê está no contexto mencionado acima. Neste aspecto, um estudo conduzido por Giamas *et al.*, (2004), apontou uma drástica diminuição na riqueza ecológica de 17806 peixes capturados no ano de 1975 para apenas 1507 peixes capturados em 2001. Dentre estas espécies, três são do gênero *Astyanax* e foram capturadas em 1975, mas apenas duas espécies deste gênero foram encontradas em 2001. Estes dados já têm mais de uma década, e apesar de que vários tipos de impactos ambientais possam estar associados, não se pode descartar o aumento da concentração de Al nos rios e tributários nas hidrográficas no Estado de São Paulo o que denota a importância de estudos relacionados, portanto, os resultados de FR encontrados neste estudo podem ser um exemplo associado a um fenômeno que pode estar ocorrendo no ambiente natural e colaborar com o declínio da ictiofauna.

No estudo da ecotoxicologia, existem definições específicas que frequentemente sobrepõem-se e causam transtornos para a interpretação e correta associação ao conteúdo que cada definição refere-se, por exemplo, os conceitos de bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação. De acordo com Zagatto e Bertoletti (2006), entende-se por bioconcentração a razão entre a concentração de um resíduo químico no tecido animal e na água (exclusivamente) e por bioacumulação como sendo a via de exposição através da água, sedimento e também pela dieta.

A distribuição do Al em diferentes órgãos e tecidos varia com a rota e com o tempo de duração da exposição e com a dose ou concentração (Ding e Zhu, 1997). Em seres humanos, com o avanço da idade, a concentração de Al em órgãos como os pulmões, fígado, rins e encéfalo tende a aumentar (U. S. Public Health Service, 1992), sendo a distribuição deste metal no organismo influenciada pelo paratormônio e pela vitamina D (Nayak, 2002).

Tratando-se da exposição aquática ao Al, sabe-se que suas formas iônica e inorgânica são as mais tóxicas e podem tornar-se uma séria ameaça a fauna aquática principalmente quando ocorrem eventos de acidificação da água, situação esta em que os peixes ficam totalmente expostos e suas brânquias, órgão que perfazem a interface entre o organismo e o ambiente externo são o principal órgão alvo das formas inorgânicas deste metal, pois se acumulam em sua superfície (Gensemer e Playle, 1999).

O acúmulo de Al na superfície externa das brânquias é a causa primária dos efeitos tóxicos causados por este metal, provocando, por exemplo, alterações na regulação iônica (Camargo *et al.*, 2009), osmótica, respiratórias e morfológicas. Os dados encontrados em *A. bimaculatus* referentes à bioconcentração de Al nas brânquias dos animais do grupo Al corrobora os dados da literatura de que este órgão é o principal local de deposição deste metal, pois nota-se altas concentrações nos animais do período agudo e uma drástica diminuição deste metal nos animais da recuperação. Da mesma forma que as brânquias, o fígado e o encéfalo também se destacaram por ter bioconcentrado mais Al nas duas etapas experimentais.

Uma possível explicação para o alto acúmulo de Al no tecido hepático está no fato de que este órgão recebe seu suprimento sanguíneo a partir das brânquias (Coetzee *et al.*, 2002). Além disso, o sangue da região intestinal circula através do fígado antes de

ser transportado para outras partes do organismo, ao mesmo tempo em que este órgão é o principal local de detoxificação dos peixes, ocorrendo retenção de elementos tóxicos introduzidos a partir do ambiente ou da dieta. Portanto, o fígado age como um “depósito” para metais por meio de ligantes, tais como as metalotioneínas (Muisa *et al.*, 2011).

Metais de transição como o Cu e o Cd são detoxificados ligando-os a metalotioneínas hepáticas, contudo o Al não se associa a proteínas deste grupo, embora tenha sido demonstrado afinidade por transferrinas (Woodburn *et al.*, 2011), e sua associação a glicoproteínas (Vásquez *et al.*, 2010). Em um estudo com ratos *Sprague – Dawley* foi demonstrado que o Al induz a síntese e se liga a proteínas similares as metalotioneínas (Jeffery *et al.*, 1987). Entretanto, Sivakumar e Khatiwada (2012) relatam que as altas concentrações de Al encontradas no fígado do teleósteo *Cirrhinus mrigala* é devida a associação deste metal a proteínas quelantes.

No plasma sanguíneo, o Al pode ser transportado por proteínas carreadoras, como por exemplo, a albumina e a transferrina (Bondy, 2010; Woodburn *et al.*, 2011), sendo assim, por ter uma alta afinidade por estas proteínas, este metal será transportado e passará facilmente pela barreira hemato-encefálica, a qual demonstra uma forte afinidade de associação com este metal (Exley e House, 2010). O principal ligante para este metal no fluido intersticial cerebral é provavelmente o citrato, além da própria transferrina, glutamato e piroglutamato, pois todos estes ligantes envolvem conjuntamente moléculas (fases) insolúveis como hidróxidos e fosfatos, as quais vão determinar o destino deste metal no fluido encefálico (Exley e House, 2010). Entretanto, contrapondo a estes dados, de acordo com Sivakumar e Khatiwada (2012), a acumulação de Al nos tecidos cerebrais dos peixes é devido a disfunções hepáticas.

Além destes três órgãos, o Al se depositou nos ovários, fato que possivelmente pode estar associado a disfunções neste órgão, por exemplo, a função esteroideogênica. Não foram encontrados na literatura exemplos da associação deste metal com o baço e com a vesícula biliar, embora esta última tratando-se de rota de exposição oral, destaca-se como uma possível via de desintoxicação de Al (Nayak, 2002).

Um estudo retratando a exposição de *Oreochromis niloticus* ao Al, via exposição oral, demonstrou que a bioacumulação ocorreu principalmente nos rins, no fígado e nas brânquias e que o músculo foi o órgão que acumulou as menores concentrações deste

metal (Muisa *et al.*, 2011). Estes autores apontam que as brânquias apresentaram menor concentração do que os rins devido a bioindisponibilidade do Al, que se encontrava em forma particulada, e associam os rins como principal órgão de desintoxicação, o que permite a comparação aos resultados deste estudo pois este órgão demonstrou ser alvo do Al no período de recuperação, momento em que possivelmente o Al residual que permaneceu no organismo do período agudo, estaria sendo excretado. Oberholster *et al.*, (2012) demonstraram que a exposição ao Al via dieta em *Oreochromis mossambicus* resultou em maiores acúmulos nos intestinos, tecido adiposo e encéfalo, sugerindo que a via de exposição aquática resulta numa distribuição de Al nos órgãos e tecidos diferente da exposição via ingestão oral.

Fêmeas fecundadas da espécie de peixe ovovivíparo *Xiphophorus helleri* expostas durante 96 horas à concentração nominal de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de Al em pH 5,5 demonstraram que a bioconcentração de Al varia conforme as fases ontogenéticas do desenvolvimento embrionário e, neste caso, fêmeas com embriões em desenvolvimento bioconcentraram mais Al nas brânquias, no fígado e no encéfalo, sendo o músculo branco o local de menor deposição deste metal (Kida, 2012). Estes dados corroboram exatamente os resultados encontrados neste estudo, sendo importante destacar que apesar de tratar-se de espécies com estratégias reprodutivas totalmente distintas, as condições de experimentais de exposição ao Al e ao pH foram as mesmas.

As baixas concentrações encontradas no músculo e no baço de *A. bimaculatus* em relação aos demais tecidos analisados pode refletir uma baixa afinidade de deposição do Al nestes órgãos. Já os rins e a vesícula biliar podem ser locais de eliminação e desintoxicação deste metal.

Até o presente momento não se conhece uma função biológica para o Al (Dávila *et al.*, 2012) e apesar da sua onipresença no planeta, a evolução não conferiu essencialidade ou utilidade a este elemento nos sistemas biológicos (Nayak, 2002). Pelo contrário, diversos estudos tem demonstrado a toxicidade do Al, em particular sobre a reprodução (Agarwal *et al.*, 1996).

Distúrbios reprodutivos têm sido propostos como a principal razão para o declínio de populações ícticas (Vuorinen e Vuorinen, 1991). Em países escandinavos, o Al presente na água (rios e lagos) juntamente com os efeitos de acidez, despontam como

os principais agentes responsáveis por esta situação (Poléo *et al.*, 1997), que se estende também aos países da América do Norte (Heming & Blumhagen, 1988).

Atualmente, apenas alguns poucos estudos apontam as consequências endócrinas e neuroendócrinas da exposição ao AI em teleósteos, pois a maior parte dos estudos refere-se a neurodegeneração em humanos (Exley e House, 2010). A reprodução dos peixes teleósteos exibe uma enorme variedade de padrões e estratégias que são influenciadas por fatores biogeográficos e ecológicos, portanto, cada espécie deve apresentar adaptações anatômicas, fisiológicas, comportamentais, energéticas e estratégias reprodutivas específicas (Vazzoler, 1996).

Os peixes teleósteos possuem uma ampla multiplicidade de estratégias de sobrevivência, as quais podem refletir a plasticidade da espécie em relação ao seu ajuste as condições ambientais e caracterizam os padrões adaptativos que se estabelecem em resposta as pressões ambientais de cada local (Orsi *et al.*, 2004). De acordo com estes mesmos autores, os peixes Characiformes exibem uma enorme divergência fenotípica adaptativa sem comparação com nenhuma outra ordem entre os vertebrados, sendo que o gênero *Astyanax* na região neotropical é o mais diverso na família Characidae, com mais de uma centena de espécies distribuídas nas bacias hidrográficas brasileiras (Garutti e Britski, 2000).

A reprodução nos peixes teleósteos é modulada por fatores exógenos (abióticos), como por exemplo, temperatura, fotoperíodo, chuvas e as características físico-químicas da água (Huber e Bengston, 1999), como também por fatores endógenos, tais como: melatonina (Ribeiro e Moreira, 2012), neuropeptídeo Y, GABA (ácido amino butírico gama), *kisspeptina*, dopamina (Zohar *et al.*, 2010), além do recentemente descoberto GnIH (hormônio inibidor de gonadotropinas) (Tsuitsui *et al.*, 2012).

Todos os fatores citados acima agem de forma modulatória sobre o hipotálamo, que passa a sintetizar o GnRH, que estimula a hipófise a secretar as gonadotropinas FSH e LH (Somoza *et al.*, 2002). O FSH age nas gônadas e estimula a produção de E₂ (em fêmeas) enquanto que o LH estimula a produção da 17 α 20 β dihidroxy-4-prenen-3-one, que é, o hormônio da maturação final e ovulação para a maioria das fêmeas de teleósteos (Nagahama, 1997; Lubzens *et al.*, 2010).

A estimulação da esteroidogênese pelas gonadotropinas nas células foliculares dos ovários ocorre por uma série de etapas enzimáticas que envolvem vias de primeiro e segundo mensageiro, dos quais participam a proteína G, o AMP cíclico (cAMP) e proteínas quinases, tais como as proteínas quinase A e C (PKA e PKC), além de várias etapas de fosforilação de diversos substratos proteicos (Saraiva *et al.*, 2010), seguidos do transporte do colesterol para a mitocôndria pela proteína, StAR (do inglês *steroidogenic acute regulatory protein*) (Domenice *et al.*, 2002) até sua metabolização em Pregnenolona pelo complexo enzimático citocromo P450_{scc} (do inglês, *side chain cleavage*) (Martyniuk *et al.*, 2006). A 17 α OHP é convertida em 17 α 20 β dihidroxy-4-prenen-3-one pela enzima 20 β - hidroxisteróide – desidrogenase (20 β HSD).

Neste estudo, a exposição ao Al não causou modificações sobre a concentração plasmática dos esteroides sexuais E₂ e 17 α OHP nas fêmeas vitelogênicas, como também não afetou a expressão gênica do mRNA do β LH. Portanto a análise conjunta destes dados permite sugerir que o hipotálamo e a hipófise não sofreram desajustes, o que inclui mecanismos de *feedback* negativo. Contudo em *Oreochromis niloticus* a exposição aguda ao Al em pH ácido resultou em diminuição na expressão gênica do FSH e do LH (Narcizo, 2009).

Apesar destes resultados supracitados, as fêmeas de *A. bimaculatus* do grupo Al do período de recuperação demonstraram um aumento na concentração da 17 α OHP em relação a seu respectivo grupo do período agudo, o que denota um possível efeito gonadal. Correia *et al.*, (2010) demonstraram uma diminuição na 17 α OHP plasmática em *Oreochromis niloticus* após a exposição aguda ao Al em pH ácido e sugeriram um possível desajuste enzimático nas etapas finais da esteroidogênese para estes resultados, mais precisamente na enzima 20 β HSD.

O Al no ambiente natural possui uma ampla capacidade de se ligar a moléculas contendo fósforo (P) (Kopáček *et al.*, 2007) como também em sistemas biológicos (Vásques *et al.*, 2010) sendo que a toxicidade deste metal, em parte é devida a sua habilidade de se ligar fortemente a moléculas contendo P (Exley *et al.*, 1993; Vrba *et al.*, 2006).

A fosforilação de proteínas representa um importante papel na regulação de várias atividades biológicas, e o Al é capaz de modular a atividade de enzimas envolvidas em muitos destes processos, como no caso da proteína quinase C (PKC)

(Provan e Yokel, 1992), e outras proteínas quinases (Osawa e Matsumoto, 2001). Além disso, celularmente este metal demonstra uma alta afinidade por moléculas fosfatadas e é capaz de induzir fosforilações irregulares pela ativação de proteínas quinases dependentes de cAMP (Johnson e Jope, 1987), como também inibir a atividade da PKC (Katsuyama *et al.*, 1989; Cochran *et al.*, 1990, Nakao *et al.*, 2002). Em virtude do exposto, é oportuno relatar que a literatura aponta algumas disfunções endócrinas causadas pelo Al, que ocorrem devido a interação deste metal com mecanismos celulares, por exemplo, com o cAMP resultando em modificações sobre a secreção de hormônios da paratireoide (Morrissey *et al.*, 1983).

Em um estudo *in vitro* com a truta arco – íris *Oncorhynchus mykiss* foi demonstrado que o Al é capaz de interferir em mecanismos moleculares, tais como sobre a síntese de VTG, haja vista que esta molécula em sua constituição normal contém um grupo altamente fosforilado, a fosvitina. Logo este metal pode ter interagido com as enzimas quinases prejudicando a síntese desta molécula (Mugyia & Tanahashi, 1998). Este metal também é capaz de inibir a transcrição do mRNA da VTG (Hwang *et al.*, 2000; 2011). Considera-se, portanto que não deve ser descartada a interferência do Al em algum mecanismo molecular envolvido com a síntese de 17 α OHP entre os grupos Al das duas etapas experimentais. No entanto, os exatos mecanismos pelos quais o Al provoca tais distúrbios ainda não foram elucidados, dessa forma, sugere-se que estudos focados nos mecanismos de primeiro e segundo mensageiro, envolvendo a PKA e a PKC devam ser conduzidos para que se possa avançar na compreensão dos efeitos do Al na esteroidogênese de teleósteos.

O CT é um hormônio esteroide secretado pelas células cromafins do tecido interrenal no rim dos peixes, as quais são homólogas a medula adrenal dos mamíferos e são a principal fonte de produção das catecolaminas circulantes nos teleósteos (Lima *et al.*, 2006). Fisiologicamente este hormônio é um potente glico-mineralocorticoide e desempenha um papel central na resposta ao estresse (Arjona *et al.*, 2008). A concentração plasmática deste hormônio tem sido amplamente utilizada como indicador do estresse fisiológico (Weendelar Bonga, 1997).

O CT, a cortisona, o 11-deoxicortisol e a corticosterona são os principais corticosteroides encontrados no plasma de peixes, sendo que a concentração destes hormônios varia entre as diferentes espécies e depende de fatores como gênero e status

reprodutivo e, com exceção do CT é praticamente indetectável a concentração dos demais corticosteroides em peixes durante o período reprodutivo (Milla *et al.*, 2009).

Entre os processos fisiológicos mais importantes para os peixes nos quais o CT participa pode ser observado, por exemplo, na migração de salmonídeos do mar para a água doce, na osmorregulação e no metabolismo de lipídeos e de proteínas (Judith *et al.*, 1998), além de estar relacionado a resposta aos efeitos de poluentes (Barton, 2002). Geralmente em uma situação de estresse há um aumento na concentração plasmática do CT (Vijayan *et al.*, 1996). Neste sentido metais como Cd, Hg e Zn tem provocado distúrbios na síntese deste hormônio em peixes (Bila e Dezotti, 2007). Correia (2008) demonstrou que a exposição crônica ao Al em *Astyanax fasciatus* causou um aumento no CT plasmático evidenciando uma possível resposta adaptativa ao estresse.

Os resultados deste trabalho referentes a diminuição CT de *A. bimaculatus*, são semelhantes aos resultados observados em um estudo com a perca amarela *Perca flavescens* exposta ao Cd, Zn e Cu no ambiente natural, em que não ocorreu aumento do CT plasmático (Levesque *et al.*, 2002). Efeitos semelhantes foram encontrados por Correia *et al.*, (2010) para *Oreochromis niloticus* após exposição aguda ao Al ácido, em que ocorreu uma diminuição do CT plasmático, sendo sugerido que o Al é um desregulador endócrino e causou um efeito anti-esteroidogênico, o que corrobora os resultados apresentados para neste estudo para *A. bimaculatus*.

Contudo, é cabível alentar para o fato de que neste estudo não foram apresentados biomarcadores cuja finalidade fosse avaliar os mecanismos de ação do Al, sendo aqui proposta a detecção de possíveis efeitos tóxicos causados pela exposição a este metal. Neste sentido, é oportuna a discussão embora não se tenha grande apreciação na comunidade científica o conceito de hormese, principalmente por este estudo tratar-se de um ensaio de toxicidade, o qual o conceito de hormese está mais intrinsecamente associado (Calabrese, 2002).

Hormese é um fenômeno dependente da relação dose-resposta em busca de respostas mecanicistas, fisiológicas e evolutivas o qual é caracterizado por resultados contraproducentes com efeitos opostos da exposição a poluentes em doses altas e em doses baixas, que não poucas vezes é encontrado em um ensaio de toxicidade (Calabrese, 2002; 2005). Partindo-se do princípio de que sistemas biológicos possuem a capacidade de reconhecer e iniciar processos de reparação e ajustes, baseada na proposta de dose resposta hormética, se reconhece que a baixos níveis de danos biológicos é possível ao organismo realocar recursos para estritamente manter a

homeostase, contudo estas respostas muitas vezes são inadequadas e ineficientes na alocação de recursos e manutenção da homeostase (Calabrese, 2005).

Entretanto, a resposta hormética pode ser interpretada como um estado maior de eficiência para conter uma situação momentânea de danos, talvez os efeitos observados para o CT dentro de um contexto de hormese seja condição adaptativa em que os animais não tenham sido afetados pelo AI em pH ácido a ponto de aumentarem a concentração deste hormônio, e possivelmente ajustando o organismo para uma resposta de aclimação posterior, haja vista que os resultados aqui apresentados foram de exposição aguda.

O efeito hormese também é caracterizado por ser uma resposta adaptativa bifásica, além disso, respostas endócrinas muitas vezes podem ser bifásicas (Kitchin 2002), ou seja, um mesmo hormônio apresenta mais de um efeito e, portanto parte dos resultados observados neste estudo para o CT pode ser pensado como resposta devido a hormese. Os esteroides sexuais assim como os corticosteroides têm vários aspectos bifásicos ao longo da reprodução (Schreck, 2010), assim, seria razoável inferir que as respostas horméticas ao estresse, envolvem respostas positivas ou negativas. Esta é a conclusão geral a partir de uma revisão recente sobre os efeitos dos corticosteroides na reprodução de peixes (Milla *et al.*, 2009). No entanto, os mecanismos pelos quais a relação hormese e estresse são mediados, particularmente com a reprodução ainda não são bem entendidos (Schreck, 2010).

O TSH, hormônio tireotrófico ou tireotrofina é sintetizado na hipófise quando o hipotálamo libera o hormônio liberador da tireotrofina (TRH) estimulando a glândula tireoide a produzir os hormônios triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4) Cooke *et al.*, 2004). O T_3 e T_4 são essenciais em vários processos fisiológicos, como no crescimento, metabolismo, desenvolvimento do encéfalo e também na regulação gonadal, cujos efeitos são mais conhecidos nos testículos do que nos ovários (Cooke *et al.*, 2004). O principal produto de secreção da glândula tireoide é o T_4 , mas os receptores nas células alvo são estimulados pelo T_3 . A ativação do T_3 é efetuada quase que exclusivamente nos tecidos periféricos por deiodinação do anel externo da molécula de T_4 . A deiodinação controla a concentração dos níveis dos hormônios da tireoide no plasma e nos tecidos, e as enzimas que controlam estas atividades são chamadas de deiodinases (Coimbra *et al.*, 2005).

Assim como o CT, estes hormônios estão envolvidos na regulação do metabolismo energético dos vertebrados e são suscetíveis a ação de poluentes (Arjona *et al.*, 2008). Pesticidas organoclorados como o Endosulfan afetam os hormônios da tireoide de peixes, por exemplo, *Oreochromis niloticus* após exposição a este poluente apresentou diminuição na concentração plasmática de T_4 (Coimbra *et al.*, 2007), bem como os metais são capazes de diminuir a concentração plasmática de T_3 e de T_4 (Hedayati e Abdullah, 2012).

Os resultados deste estudo demonstraram um aumento na concentração de T_3 no grupo Al com uma posterior diminuição na recuperação, juntamente com uma diminuição plasmática observada para o T_4 após o período agudo. Estes resultados podem estar expressando uma modulação hormonal e não um estado de desregulação endócrina. Possivelmente esta foi uma resposta adaptativa para evitar uma redução na concentração de T_3 circulante e consequentemente impedir desajustes principalmente no metabolismo energético, o que poderia sugerir uma possível explicação para a diminuição do T_4 .

Os animais do grupo mantidos em pH ácido apesar de também ter demonstrado uma redução plasmática deste hormônio não demonstram aumento plasmático de T_3 . Talvez o requerimento energético para este grupo, bem como ajustes fisiológicos para outros processos fisiológicos relacionados não tenham sido tão intensos quanto pode ter sido no grupo Al, o que poderia sugerir uma possível explicação para o aumento do T_3 plasmático neste grupo. Como não foi feita nenhuma análise em relação ao TSH, devido as implicações metodológicas envolvidas, os dados são escassos para propor outra explicação para os efeitos observados neste grupo.

Diante destes resultados, fica evidente que a exposição aquática aguda de fêmeas vitelogênicas de *A. bimaculatus* a $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de Al dissolvido em pH ácido impôs sobre esta espécie ajustes endócrinos sobre o CT, a 17α OHP e sobre os hormônios tireoidianos, os quais possivelmente foram envolvidos em mecanismos de aclimação ou de pós aclimação às condições experimentais.

Sugerir que o Al e o pH ácido provocaram efeitos de desregulação endócrina nos moldes dos ensaios aqui apresentados seria supervalorizar o efeito tóxico deste metal como também menosprezar a capacidade fisiológica desta espécie em enfrentar prováveis situações de estresse provocadas pelo Al, portanto o mais coerente é inferir um efeito de modulação endócrina. Apesar das modestas alterações endócrinas causadas pelo Al, os dados de fecundidade demonstram que a exposição aguda a este metal em

pH ácido e ao pH ácido *per se* infligem em prejuízos sobre a reprodução, fato que pode ser atribuído a capacidade de adsorção deste metal nas brânquias como também a de bioconcentrar em diferentes órgãos corroborando com a literatura disponível.

6. Referências bibliográficas

- Addy, K., Green, L., Herron, E. 2004. pH and Alkalinity. URI Watershed Watch. 3, 1-4.
- Adolfi, A. C. 2011. Desenvolvimento gonadal e clonagem molecular de Dmrt1 (doublesex and mab-3-related transcription factor-1) e Sox9 em teleósteos sul-americanos. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado. 56p.
- Agarwal, S. K., Ayyash, L., Gourley, C. S., Levy, J., Faber, K., Hughes Jr, C. L. 1996. Evaluation of the Developmental Neuroendocrine and Reproductive Toxicology of Aluminium. Food and Chemichal. Toxicology. 34 (1), 49-53.
- Alberti, G., Palazzo, G., Biesuz, R., Pesavento, M. 2005. Aluminium speciation in natural water by sorption on a complexing resin. Journal of Inorganic Biochemistry, 99, 1779-1787.
- Allin, C. J., Wilson, R. W. 2000. Effects of pre-acclimation to aluminium on the physiology and swimming behaviour of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during a pulsed exposure. Aquatic Toxicology. 51, 213 – 224.
- Anderson, M. A., Berkowitz, J. 2010. Aluminum polymers formed following alum treatment of lake water. Chemosphere. 81, 832 – 836.
- APHA. 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Aragão, M. A. & Araújo, P. A. 2006. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: P. A. ZAGATTO & E. BERTOLETTI (Eds.). Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. São Carlos: Rima. 117-152p.
- Arjona, F. J., Chacoff, L. V., Martín del Río, M. P., Flik, G., Mancera, J. M., Klaren, P. H. M. 2008. The involvement of thyroid hormones and cortisol in the osmotic

- acclimation of *Solea senegalensis*. General and Comparative Endocrinology. 155, 796–803.
- Barton, B. A. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. Integrative and Comparative Biology. 42, 517-525.
- Berthelot, Y., Trottier, B., Robidoux, P. Y. 2008. Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils. Chemosphere, 74, 166-177.
- Bila, D. M., Dezotti, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Química. Nova. 30 (3), 651-666.
- Bondy, S. C. 2010. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. NeuroToxicology 31, 575 – 581.
- Boyd, C. E., 1990. Water quality in ponds for aquaculture. Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Alabama, USA.
- Buckler, D. R., Cleveland, L., Little, E. E., Brumbaugh, W. G. 1995. Survival, sublethal responses, and tissue residues of Atlantic salmon exposed to acidic pH and aluminum. Aquatic Toxicology. 31, 203-216.
- Calabrese, E. J. 2005. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. Environmental Pollution 138, 378 – 411.
- Calabrese, E. J. 2002. Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. Mutation Research. 511,181–189.
- Camargo, M. M., Fernandes, M. N., Martinez, C, B. R. 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Aquatic Toxicology. 94, 40-46.
- Carey, J. B., McCormick, S. D. 1998. Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. Aquaculture. 168, 237–253.
- CETESB. 2011. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.

- CETESB. 2010. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.
- CETESB. 2009. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.
- CETESB. 2008. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.
- Cochran, M., Elliott, D. C., Brennan, P., and Chawtur, V. 1990. Inhibition of protein kinase C activation by low concentrations of aluminium. *Clinica. Chimica. Acta.* 194, 167–172.
- Coetzee, L., du Preez, H. H., van Vuren, J. H. J. 2002. Metal concentrations in *Clarias gariepinus* and *Labeo umbratus* from the Olifants River and Klein Olifants River, Mpumalanga, South Africa: Zinc, copper, manganese, lead, chromium, nickel, aluminium and iron. *Water S.A.* 28 (4), 432–438.
- Coimbra, A. M., Fernandes, A. F., Henriques, M. A. R. 2007. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), liver morphology, CYP1A activity and thyroid hormones after Endosulfan dietary exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 89, 230–236.
- Coimbra, A. M., Henriques, M. A. R., Darras, V. M. 2005. Circulating thyroid hormone levels and iodothyronine deiodinase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following dietary exposure to Endosulfan and Aroclor 1254. *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology & Pharmacology* 141, 8–14.
- CONAMA, 2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. 1-23p.
- Cooke, P. S., Holsberger, D. R., Witorsch, R. J., Sylvester, P. W., Meredith, J. M., Treinen, K. A., Chapin, R. E. 2004. Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 194, 309 – 335.
- Constantino, V. R. L., Araki, K., Silva, D. O., Oliveira, W. 2002. Preparação de compostos de alumínio a partir da bauxita: Considerações sobre alguns aspectos envolvidos em um experimento didático. *Química Nova* 25, 490 - 498.

- Correia, T. G., Narcizo, A. M., Bianchini, A., Moreira, R. G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 151, 461 – 466.
- Correia, T. G. 2008. Influência do alumínio e do pH ácido sobre a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos continentais. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 204p.
- Dávila, M. L. F., Estrada, M. C. R. Medina, S. G., Oliván, L. M. G., López, M. J. P., I. R. G., Martínez, M. G. 2012. Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae — *Ctenopharingodon idella*). Ecotoxicology and Environmental Safety 76, 87 – 92.
- Dill, H. G. 2007. A review of mineral resources in Malawi: With special reference to aluminium variation in mineral deposits. Journal of African Earth Sciences 47 (3), 153 – 173.
- Ding, W., and Zhu, Q. 1997. Metabolism of aluminum in rats. Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih. 31, 338 - 341.
- Domenice, S., Costa, E. M. F., Corrêa, R. V., Mendonça, B. B. 2002. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo 46, 433 – 443.
- Exley, C., House, E. R. 2010. Aluminium in the human brain. Monatsh Chem. 142, 357–363
- Exley, C., Pinnegar, J. K., Taylor, H. 1997. Hydroxy aluminosilicates and acute aluminium toxicity in fish. Journal Theoretical Biololgy 189, 133-139.
- Exley, C. 1996. Aluminium in the brain and heart of the rainbow trout. Journal Fish Biology 48, 706 – 713.
- Exley, C., Tollervey, A., Gray, G., Roberts, S., Birchall, J.D. 1993. Silicon, aluminium and the biological availability of phosphorus in algae. Proc. Royal Soc. London B 253, 93 – 99.

- Garutti, V., Britski, H. A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia*. 13, 65 – 88.
- Gasporotto, F. A. 2011. Avaliação ecotoxicológica e microbiológica da água de nascentes urbanas no município de Piracicaba-SP. Dissertação de Mestrado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. 89p.
- Gensemer, R. W., Playle, R. C. 1999. The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 29 (4), 315 – 450.
- Giamas, M. T. D., Campos, E. C., Camara, J. J. C., Vermulm Junior, H., Barbieri, G. 2004. A ictiofauna da represa de Ponte Nova, Salesópolis (São Paulo) – Bacia do Alto Tietê. *Boletim Instituto de Pesca, São Paulo*. 30 (1), 25 – 34.
- Gonzalez, M. A., Roma, M. G., Bernal, C. A., Alvarez, M. L., Carrillo, M. C. 2004. Biliary Secretory Function in Rats Chronically Intoxicated with Aluminum. *Toxicological Sciences*. 79, 189 – 195.
- Hedayati, A. S., Abdullah, A. 2012. Endocrine Disruption Induced by Sub-Lethal Mercury Chloride on Hormone Indices of Seabream. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 4 (2), 125-130.
- Heming, T. A., Blumhagen, K. A. 1988. Plasma acid-base and electrolytes states of rainbow trout exposed to alum (aluminum sulphate) in acidic and alkaline environments. *Aquatic Toxicology* 12, 125 - 140.
- Honji, R. M. 2011. Controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) em relação ao ciclo reprodutivo e à reprodução induzida em cativeiro. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia. 300p.
- Huber, M., Bengtson, D. A. 1999. Effects of photoperiod and temperature on the regulation of the onset of maturation in the estuarine fish *Menidia beryllina* (Cope)

- (Atherinidae). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 240, 285 – 302.
- Hwang, U. K., Kang, H. S., Lee, Y., Shon, J. K. 2011. Aluminum Inhibits Vitellogenin Production via Toxic Effects on Hepatocytes in the Rockfish *Sebastes schlegelii*. Fish Aquatic Sciences 14(4), 355-361.
- Hwang, U. K., Kagawa, N., Mugyia, Y. 2000. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol - 17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and Comparative Endocrinology 119, 69 - 76.
- Ishikawa, M. M., Pádua, S. B., Satake, F., Pietro, P. S., Hisano, H. 2010. Procedimentos Básicos para Colheita de Sangue em Peixes; Manual Embrapa 17, 1 - 6.
- Jeffery, E. H., Jansen, H. T., Dellinger, J. A. 1987. In vivo interactions of aluminum with hepatic cytochrome P-450 and metallothionein. Fundamental Application Toxicology. 8 (4), 541-548.
- Johnson, G. V. W., Joje, R. S. (1987). Aluminium alters cyclic AMP and cyclic GMP levels but not presynaptic cholinergic markers in rat brain in vivo. Brain Research. 403, 1 – 6.
- Johnson, V. J., Kim, S. H., Sharman, R. P., 2005. Al - maltolate induces apoptosis and necrosis in neuro-2 α cells: potential role for p53 signaling. Toxicol. Sci. 83, 329 – 339.
- Katsuyama, H., Saijoh, K., Inoue, Y., Sumino, K. 1989. The interaction of aluminium with soluble protein kinase C from mouse brain. Archives Toxicology. 63: 474 - 478.
- Kida, B. M. S. 2012. Concentração de alumínio nos tecidos como potencial biomarcador em *Xiphophorus helleri* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) expostos ao alumínio em pH ácido. Relatório PIBIC. 34p.

- Kitchin, K.T. 2002. Defining, explaining and understanding hormesis. *Human Experimental Toxicology* 21, 105–106.
- Kopáček, J., Hejzlar, J., Kana, J., Norton, S. A., Porcal, P., Turek, J. 2009. Trends in aluminium export from a mountainous area to surface waters, from deglaciation to the recent: Effects of vegetation and soil development, atmospheric acidification, and nitrogen-saturation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 1439 – 1448.
- Kopáček, J., Maresová, M., Hejzlar, J. 2007. Natural inactivation of phosphorus by aluminum in preindustrial lake sediments. *Limnology Oceanography*. 52 (3), 1147 – 1155.
- Kráš, P., Hruska, J., Driscoll, C. T., Johnson, C. E., Oulehle, F. 2009. Long-term changes in aluminum fractions of drainage waters in two forest catchments with contrasting lithology. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 103, 1465 – 1472.
- Kramer, K. J. M., Jak, R. G., Hattum, B. V., Hooftman, R. N., Zwolsman, J. J. G. 2004. Copper toxicity in relation to surface water dissolved organic matter: biological effects to *Daphnia Magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23 (12), 2971 – 2980.
- Kroglund, F., Finstad, B., Pettersen, K., Teien, H. C., Salbu, B., Rosseland, B. O., Nilsen, T. O., Stefasson, S., Ebbesson, L. O. E., Nilsen, R., Bjorn, P. A., Kristensen, T. 2011. Recovery of Atlantic salmon smolts following aluminum exposure defined by changes in blood physiology and seawater tolerance. *Aquaculture. In Press*.
- Lawson, E. O. 2011. Physico-Chemical Parameters and Heavy Metal Contents of Water from the Mangrove Swamps of Lagos Lagoon, Lagos, Nigeria. *Advances in Biological Research* 5 (1): 08 – 21.

- Lemarié, G., Dosdat, A., Covés, D., Dutto, G., Gasset, E., Ruyet, P. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 229, 479 - 49 .
- Levesque, H . M.; Moon, T. W.; Campbell, P. C. G.; Honttela, A. 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology* 60, 257-267.
- Lima, J. V. 2010. Variáveis hidroquímicas e frações de fósforo na água de microbacias urbanas de Bom Jesus/Pi. Universidade Federal do Piauí. Monografia. 57p.
- Lima, L. C., Ribeiro, L. P., Leite, R. C., Melo, D. C. 2006. Estresse em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 30 (3/4), 113 – 117.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 367– 389.
- Ma, H., Allen, H. E., Yin, Y. 2001. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Wat. Res.* 35 (4), 985 – 996.
- Magalhães, D. P., Ferrão – Filho, A. S. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasil* 12 (3), 355 – 381.
- Martinez, C. B. R. & Souza, M. M. 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133, 151 – 160.
- Martyniuk, C. J., Gallant, N. S., Marlatt, V. L., Wiens, C.S.; Woodhouse, A. J., Trudeau, V. L. 2006. Current perspectives on 17 β - estradiol (E₂). Action and nuclear estrogen receptors (ER) in teleost fish. In: Reinecke, M.; Zaccone, G.; Kapoor, B. G. (Eds) *Fish Endocrinology*. Vol₂. USA. Science Publishers. p. 625 – 663

- McCormick, S. D., Lerner, D. T., Regish, A. M., O'dea, M. F., Monette, M. Y. 2011. Thresholds for short-term acid and aluminum impacts on Atlantic salmon smolts. *Aquaculture. In Press*.
- Medina, G. S., Estrada, C. R., Martinez, M. G., Barberena, E. C., Oliván, L. M. G., González, I. A., Bujaidar, E. M. 2011. Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 153, 113 – 118.
- Milla, S., Wang, N., Mandiki, S. N. M., Kestemont, P. 2009. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 153, 242–251.
- Morais, Al L. N. S., Mendonça, M .C. F. B., Gavilan-Leandro, S. A. C., Souza, I. M. M. 2007. Biologia reprodutiva de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characidae, Characiformes), presente na lagoa do Piató, em Assú, RN – Brasil. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.
- Morrissey, J., Rothstein, M., Mayor, G., Slatopolky, E. 1983. Suppression of parathyroid hormone secretion by aluminum. *Kidney International* 23: 699 - 704.
- Mugyia, Y., Tanahashi, A. 1998. Inhibitory Effects of Aluminium on Vitellogenin Induction by EStradiol-17 β in the Primary Culture of Hepatocytes in the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 109: 37 - 43.
- Muisa, N., Hoko, Z., Chifamba, P. 2011. Impacts of alum residues from Morton Jaffray Water Works on water quality and fish, Harare, Zimbabwe. *Physics and Chemistry of the Earth* 36, 853–864.
- Nagahama, Y. 1997. 17 α , 20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62, 190 – 196.
- Nakao, W., Hwang, U.G., Tohse, H., Mugyia, Y. 2002. Aluminium Inhibits Protein Kinase C Activity in the Liver without Any Effect on Vitellogenin Production

in Salmon *Oncorhynchus masou*. Bulletin Fish Scientific Hokkaido Univ. 54 (1), 31 – 36.

Narcizo, A. M. 2009. Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia. Dissertação de Mestrado. 92p.

Nayak, P. 2002. Aluminum: Impacts and disease. Environmental Research. A 89, 101-115.

Neal, C. Alkalinity measurements within natural waters: towards a standardised approach. 2001. The Science of the Total Environment 265, 99 – 113.

Novais, C. M., Pires-Alves, M., Silva, F. F. 2004. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 33: 102 – 113.

Oberholster, P. J., Myburgh, J. G., Ashton, P. J., Coetzee, J. J., Botha, A. M. 2012. Bioaccumulation of aluminium and iron in the food chain of Lake Loskop, South Africa. Ecotoxicology and Environmental Safety 75, 34–141.

Orsi, M. L., Carvalho, E. D., Foresti, F. 2004. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 21 (2), 207 – 218.

Osawa, H., Matsumoto, H. 2001. Possible Involvement of Protein Phosphorylation in Aluminum-Responsive Malate Efflux from Wheat Root Apex1. Plant Physiology. 126, 411 – 420.

Parhar, I. S., Soga, T., Ogawa, S., Sakuma, Y. 2003. β FSH and β LH subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. General and Comparative Endocrinology, 132: 369 – 378.

- Poléo, A. B. S., Ostybe, K., Oxnevad, S. A., Andersen, R. A., Heibo, E., Vollestad, L. A. 1997. Toxicity of acid aluminium – rich water to seven freshwater fish species: A comparative laboratory study. *Environmental Pollution* 96, 129 - 139.
- Poléo, A. B. S. 1995. Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic Toxicology* 31, 347-356.
- Porto – Foresti, F., Castilho, A. R. B., Foresti, F. 2005. Biologia e criação do lambari do rabo amarelo *Astyanax altiparanae*. In: Espécies nativas para piscicultura. Santa Maria: Ed UFMS. 468p.
- Provan, S. D., Yokel, R. A. 1992. Aluminum inhibits glutamate release from transverse rat hippocampal slices: role of G proteins, Ca channels and protein kinase C. *Neurotoxicology* 13 (2), 413 – 420.
- Ren, J. L., Zhang, J., Li, J. B., Yu, X. Y., Liu, S. M., Zhang, E. R. 2006. Dissolved aluminum in the Yellow Sea and East China Sea e Al as a tracer of Changjiang (Yangtze River) discharge and Kuroshio incursion. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 68,165 – 174.
- Reis, J. A. T., Mendonça, A. S. F. 2009. Análise técnica dos novos padrões brasileiros para amônia em efluentes e corpos d'água. *Eng Sanit Ambient* 14 (3): 353 – 362.
- Ribeiro, C. S., Moreira, R. G. 2012. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. *Revista da Biologia*. 8, 58 – 61.
- Royset, O., Rosseland, B. O., Kristensen, T., Kroglund, F., Garmo, O. A., Steinnes, E., 2005. Diffusive gradients in thin films sampler predicts stress in brown trout (*Salmo trutta* L.) exposed to Al in acid fresh waters. *Environmental Scientific Technology* 39, 1167–1174.
- Sambrook, J.; Russel, D. 2001. A laboratory manual. Third Edition by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Vols: 1, 2 e 3.

- Saraiva, M. V. A., Matos, M. H. T., Faustino, L. R., Celestino, J. J. H., Silva, J. R. V., Figueiredo, J. R. 2010. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 34 (4), 206 – 221.
- Sato, Y., Sampaio, E. V., Fenerich-Verani, N., Verani, J. R. 2006. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais – Brasil. *Revista brasileira de Zoologia*. 23 (1), 267 – 273.
- Schreck, C. B. 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* 165, 549 – 556.
- Simpson, A. C. 1951. The fecundity of the plaice. *Fish. Invest. London*. 2, 17 (5):1-27.
- Sivakumar, S., Khatiwada, C. S. 2012. Aluminium and the effects of chelating agents on liver and brain of *cirrhinus mrigala*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4 (5), 2433 – 2441.
- Somoza, G. M., Miranda, L. A., Strobl-Mazzulla, P., Guilgur, L. M. 2002. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH): From Fish to Mammalian Brains. *Cellular and Molecular Neurobiology* 22, 589 – 609.
- Teien, H. C; Salbu, B., Kroglund, F., Heier, L. S., Rosseland, B. O. 2007. The influence of colloidal material on aluminium speciation and estimated acid neutralising capacity (ANC). *Applied Geochemistry* 22, 1202 - 1208.
- Tsutsui, K., Ubuka, T., Bentley, G. E., Kriegsfeld, L. J. 2012. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Discovery, progress and prospect. *General and Comparative Endocrinology* 177, 305 – 314.
- Vazzoler, A .E. A. M. 1996. *Biologia da Reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá. EDUEM, 169p.
- Vázquez, P. Q., Sigee, D. C., White, K. N. 2010. Bioavailability and toxicity of aluminium in a model planktonic food chain (*Chlamydomonas* – *Daphnia*) at neutral pH. *Limnologia Ecology and Management of Inland Water* 40, 269 – 277.

- Verstraeten, S. V., Aimo, L. 2008. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of Toxicology* 82, 789 – 802.
- Vieira, V. A. R. O., Correia, T. G., Moreira, R. G. 2012. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, In Press*.
- Vijayan, M. M., Mommsen, T. P., Glémet, H. C., Moon, T. W. 1996. Metabolic effects of cortisol treatment in a marine teleost, the sea raven. *The Journal of Experimental Biology* 199, 1509–1514.
- Vilela, C., Hayashi, C. 2001. Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. *Acta Scientiarum* 23 (2), 491 – 496.
- Vrba, J., Kopáček, J., Bittl, T., Nedoma, J., Strojsova, A., Nedbalova, L., Kohout, L., Fott, J., 2006. A key role of aluminium phosphorus availability, food web structure, and plankton dynamics in strongly acidified lakes. *Biologia* 61, 441 – 451.
- Vuorinen, P. J., Keinanen, M., Lappalainen, A., Peuranen, S., Rask, M. 2004. Physiological status of whitefish (*Coregonus lavaretus pallasii*) prior to spawning in lakes of differing acidity *Aquat. Sci.* 66, 305–314.
- Vuorinen, P. J., Keinanen, M., Seppo, P And Tigerstedt, C. 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long – term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 255 – 276.
- Vuorinen, P. J., Vuorinen, M. 1991. Effects of long-term prespawning acid/aluminium exposure on whitefish (*Coregonus wartmanni*) reproduction and blood and plasma parameters *Finnish Fisheries Research* 12, 125 - 133.
- Walton, R. C., McCrohan, C. R., Livens, F., White, K. N. 2010. Trophic transfer of aluminium through an aquatic grazer–omnivore food chain. *Aquatic Toxicology* 99, 93 – 99.

- Ward, J. S. R., McCrohan, R. C., White, N. K. 2006. Influence of aqueous aluminium on the immune system of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Aquatic Toxicology* 77, 222 – 228.
- Weendelar, B, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiology Review* 77, 591- 625.
- Woodburn, K., Walton, R., McCrohan, C., White, K. 2011. Accumulation and toxicity of aluminium-contaminated food in the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Aquatic Toxicology* 105, 535 – 542.
- Zagatto, A. P.; Bertoletti, E. (Eds) 2006. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima. 478p
- Zohar, Y., Cueto, J. A. M., Elizur, A., Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 438 – 455.

CAPÍTULO 3

Exposição aquática de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae) ao manganês: efeitos endócrinos, reprodutivos e de bioconcentração

1 – Introdução

Na natureza, o manganês (Mn) está presente ubiquamente e é um elemento relativamente comum, compreendendo cerca de 0,1% da crosta terrestre, mas mesmo assim, até o presente momento foi muito pouco estudado nos ecossistemas aquáticos (Vieira *et al.*, 2012). É o décimo segundo elemento mais abundante na crosta terrestre e está naturalmente presente nas rochas, no solo, na água e nos seres vivos, sendo essencial para os seres humanos, os animais, as plantas e requerido para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da homeostase (Santamaria, 2008).

Os compostos de Mn podem ser orgânicos e inorgânicos (Chiswell e Mokhtar, 1986), sendo estes últimos os mais comumente encontrados na natureza (Santamaria, 2008). Muitos dos aspectos químicos do Mn em sua relação com a água doce são bem entendidos, pois sabe-se que este elemento possui três estados de oxidação, II, III e IV, dos quais Mn II e Mn IV são os mais comuns. Em condições óxicas o Mn II que é solúvel, é oxidado a forma $\text{Mn}^{\text{IV}}\text{O}_2$ que é insolúvel (Graham *et al.*, 2012). Além de sua relação com a oxigenação da água, a distribuição das espécies de Mn é influenciada por variações do pH e do potencial redox (Hernández, 2009).

As aplicações do Mn incluem a produção de aço e de ferro, baterias automotivas, vidros, indústria têxtil, entre outros. Os compostos orgânicos de Mn estão presentes em combustíveis, fungicidas, em agentes de contraste usados em leitura de imagens de ressonância magnética, etc (Iavicoli *et al.*, 2009). Devido a sua intensa aplicação para a humanidade, é inevitável o aumento de espécies de Mn para os ecossistemas aquáticos de forma antropogênica, por isso, há uma demanda crescente por informações sobre a especiação, pois a atividade biológica e toxicidade de muitos elementos dependem de sua forma química (Citak *et al.*, 2010).

O Mn é encontrado em todos os tecidos biológicos e é fundamental para muitos processos fisiológicos, como por exemplo, na regulação dos processos reprodutivos, no metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e como co-fator de várias enzimas (Prestifilippo *et al.*, 2007), por exemplo, a SOD manganês (superóxido dismutase), e glutamina sintase (enzima que sintetiza glutamina do neurotransmissor glutamato). (Quintanar, 2008), como também para as metaloenzimas (manganoproteínas) envolvidas no metabolismo do oxigênio e do nitrogênio (Morello *et al.*, 2007) e enzimas relacionadas ao DNA e neurotransmissores (Lima *et al.*, 2008).

Em relação à toxicidade do Mn e seus efeitos em humanos, independente da rota de absorção quando em altas concentrações torna-se tóxico para o cérebro e pode acarretar em desordens neurológicas caracterizadas inicialmente por sintomas psicóticos semelhantes à doença de Parkinson que resultam em uma síndrome conhecida por manganismo (Morello *et al.*, 2007), cujos sintomas são bradicinésia, rigidez e distonia, dentre outros (Gerber *et al.*, 2002). O manganismo está associado ao acúmulo de manganês no cérebro, mais especificamente em estruturas do gânglio basal, putamen caudato, globus pallidus, substância negra, hipotálamo e núcleo subtalâmico (Erickson *et al.*, 2004).

Vieira *et al.*, (2012) consideram que mesmo sendo um micronutriente essencial, o Mn pode ser tóxico para peixes e outros organismos aquáticos, e a faixa de concentração tóxica varia de acordo com a espécie, com o estágio de vida, como também é influenciada pelas características físico químicas da água. Por exemplo, sabe-se que seus efeitos tóxicos diminuem com o aumento da dureza da água e da mesma forma que o Al, a chuva ácida também promove um aumento na concentração deste metal do sedimento para a coluna d'água.

Entre os efeitos tóxicos primários do Mn sobre os peixes, inicialmente as brânquias são os primeiros órgãos a serem afetados, seguidas de órgãos que possibilitem a absorção e a circulação deste metal no organismo: pele, rins, fígado, intestinos, plasma sanguíneo e em seguida para tecidos e órgãos que possam atuar como receptores deste metal: ossos, cabeça, nadadeiras e músculos (Vieira *et al.*, 2012). Fisiologicamente, os distúrbios iniciais são na ionorregulação e osmorregulação, alterações metabólicas (Partridge e Lymbery, 2009) lipoperoxidação e estresse oxidativo (Vieira *et al.*, 2012). Os mecanismos pelos quais tais efeitos ocorrem ainda estão sendo investigados.

Além de mamíferos e peixes, as informações sobre a toxicidade do Mn para outros vertebrados são praticamente inexistentes e devido as já conhecidas alterações neuroendócrinas e esteroidogênicas deste metal em mamíferos, e frente ao contexto atual de poluição em inúmeras bacias hidrográficas do Estado de São Paulo, torna-se imperativo avaliar a influência deste metal sobre a reprodução de peixes, principalmente sobre os hormônios envolvidos na reprodução bem como em processos metabólicos (CT, T₃ e T₄) importantes para a preservação da ictiofauna e integridade da biota aquática.

2 – Materiais e Métodos

O item 2.1 encontra-se descrito no capítulo 2.

2.1.1 – Desenho experimental

O delineamento experimental foi o mesmo que o empregado nos testes com Al, exceto que ao invés de exposição a este metal, foi preparado um grupo (duplicata) para a exposição aquática ao Mn.

2.2. Preparação e manipulação do contaminante metálico

Foi preparada uma solução estoque de Mn a partir de Mn_2SO_4 (MERCK). A massa do sal correspondente a concentração de 0,5 mg/L em 140 L foi mantida em estufa a 60° C durante 12 horas e após este período a massa seca foi dissolvida em água MilliQ. A solução obtida foi armazenada em frasco de vidro âmbar previamente lavado com HNO_3 10% SUPRAPUR (MERCK) e acidificada com o mesmo ácido a 65% e refrigerada a 4° C. Alíquotas de cada solução estoque foram pipetadas entre os aquários experimentais para a concentração nominal metálica de 0,5 mg.L⁻¹.

Os demais procedimentos referentes a este item são os mesmos que foram feitos para o Al, portanto estão descritos no capítulo 2.

2.3 *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)

Estas informações encontram-se no capítulo 2.

2.4 Procedimentos de amostragem de tecidos e plasma sanguíneo

Estas informações encontram-se no capítulo 2.

2.5 – Dosagens hormonais

Estas informações encontram-se no capítulo 2.

2.6. Análise quantitativa de Al em tecidos e órgãos

Estas informações encontram-se no capítulo 2.

2.6.1 Digestão ácida

Para quantificação de Mn foi necessária a massa (peso úmido) equivalente a 50 mg para o fígado e brânquias, 100 mg para os músculos e ovários, e para rins, baço, encéfalo e vesícula biliar foi necessário o órgão todo. Os procedimentos adotados foram os mesmos utilizados para o Al, portanto encontram-se descritos no capítulo 2.

2.7. Fecundidade e frequência oocitária

Estas informações encontram-se no capítulo 2.

2.8. Expressão gênica de gonadotropinas

Estas informações encontram-se no capítulo 2.

2.8.1 PCR em tempo real (qRT-PCR)

Estas informações encontram-se no capítulo 2.

3.0. Análises estatísticas

Estas informações encontram-se no capítulo 2.

4 – RESULTADOS

4.1- Características físico – químicas da água

Estes resultados encontram-se descritos no capítulo 2.

4.1.1 – Temperatura, Oxigênio dissolvido e Compostos Nitrogenados

A temperatura da água e a concentração de oxigênio dissolvido (OD) dos grupos CTRL – n e pH – ac encontram-se descritas no capítulo 2. Estes dados para o grupo Mn foram respectivamente de $24,38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,81$ e $7,24 \pm 0,44\text{ mg. L}^{-1}$, no experimento agudo e de $25,05\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,12$ e $7,03 \pm 0,07\text{ mg. L}^{-1}$ na fase experimental de recuperação. Semelhantemente ao que foi observado para os demais grupos, a concentração de compostos nitrogenados, expressa em mg. L^{-1} de amônia total (NH_3) e nitrito (NO_2^-) mantiveram-se praticamente nulas.

4.1.2 – pH

Os valores médios registrados para o pH do grupo Mn do período de exposição aguda foi de $5,7 \pm 0,22$ demonstrando pouca variação ao longo do tempo, sendo a média da variação diária de $0,67 \pm 0,1$. A média para o pH deste grupo na recuperação foi de $7,4 \pm 0,09$. As tabelas 3 e 4 do capítulo 2 contém as informações referentes ao pH dos grupos CTRL – n e CTRL – ac. A tabela 1 abaixo apresenta a média do pH antes e após as trocas de água entre cada intervalo de 24 horas, bem como sua respectiva variação para o grupo Mn.

Tabela 1: Variação de pH durante as 96 horas de exposição aguda de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* do Grupo Mn (média $\pm$ DP).

Grupo Manganês – Média dos valores iniciais e finais de pH				
Intervalo de tempo	pH inicial	pH final	Média	Variação diária
0 – 24	$5,28 \pm 0,08$	$6,11 \pm 0,11$	$5,70 \pm 0,04$	0,83
24* – 48	$5,29 \pm 0,11$	$5,94 \pm 0,03$	$5,61 \pm 0,07$	0,66
48* – 72	$5,55 \pm 0,03$	$6,09 \pm 0,05$	$5,82 \pm 0,01$	0,54
72* – 96	$5,35 \pm 0,05$	$6,00 \pm 0,14$	$5,67 \pm 0,10$	0,66

4.2 – Manganês

Da mesma forma como foi feito para o Al, a concentração nominal de Mn foi de 0,5 mg. L⁻¹ e devido a dinâmica de especiação e complexação resultantes da interação com a água, a média de Mn total foi de 0,5 ± 0,04 mg.L⁻¹ e a média de Mn dissolvido foi de 0,4 ± 0,1 mg.L⁻¹. A variação diária na concentração deste metal, nas frações total e dissolvida e sua relação com o pH para este grupo, encontram-se na figura 1. A concentração deste metal durante o período de recuperação foi nula em todos os grupos experimentais.

Figura 1: Variação na concentração de Mn total, dissolvido e de pH durante o experimento agudo com *Astyanax bimaculatus* no grupo Mn. (*) Indicam os momentos das trocas de água.

Diferente do Al, que possui características anfóteras (se dissolve tanto no pH ácido quanto no alcalino), a concentração de Mn total ou dissolvida não foi influenciada pelo pH.

4.3 – Índices corporais de *Astyanax bimaculatus*

As médias referentes ao comprimento total e a massa corpórea, além do IGS e do IHS para o grupo Mn estão apresentadas na tabela 2. As informações referentes aos animais dos grupos controle e pH ácido foram apresentadas no capítulo 2, item 3.4. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada para o IGS entre os grupos no experimento agudo (P=0,743), como na fase de recuperação (P=0,604), ou na comparação interexperimental: Mn com Mn (P = 0,692). A análise estatística do IHS

também não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos no experimento agudo ($P = 0,180$) como na recuperação ($P = 0,209$) ou entre Mn com Mn ($P = 0,182$).

Tabela 2 - Dados morfométricos, ponderais, IGS e IHS de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* submetidas ao Mn (média $\pm$ EPM).

ENSAIO	N	Comprimento Total (cm)	Massa Corpórea (g)	IGS	IHS
AGUDO	10	14,25 $\pm$ 0,86	50,97 $\pm$ 8,71	17,96 $\pm$ 7,90	0,97 $\pm$ 0,17
RECUPERAÇÃO	10	13,95 $\pm$ 0,37	47,49 $\pm$ 5,42	19,05 $\pm$ 3,30	1,08 $\pm$ 0,18

4.4 – Fecundidade e frequência oocitária

Os dados apresentados em relação a fecundidade (tabela 3) estão expressos na forma de fecundidade relativa (FR), ou seja, número de oócitos de cada fêmea divididos pela sua massa corpórea. A exposição de *A. bimaculatus* ao Mn não alterou a fecundidade, quando comparado ao grupo controle ($P = 0,282$).

O grupo pH – ac apresentou os menores valores para FR, sendo diferente estatisticamente do grupo Mn do período de exposição aguda ($P = 0,038$). No período de recuperação este mesmo grupo também apresentou a menor fecundidade, sendo diferente estatisticamente do grupo CTRL – n ($P = 0,003$) e do grupo Mn ($P = 0,017$). Fica evidente que apenas a exposição ao pH ácido exerceu efeitos negativos sobre a FR de *A. bimaculatus*, não tendo sido registrado efeitos para a exposição ácida ao Mn.

A figura 2 representa a frequência oocitária encontrada para *A. bimaculatus* e apresenta as maiores porcentagens encontradas, que ocorreram de 700 a 900 μ m de diâmetro, demonstrando que estes animais estavam no período reprodutivo (ovários maduros).

Tabela 3: Fecundidade relativa de *Astyanax bimaculatus* dos períodos de exposição aguda e de recuperação CTRL – n (grupo controle), pH – ac (grupo pH ácido), Mn (grupo Mn) (Média ± EPM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais.

Fecundidade relativa a massa corpórea de *Astyanax bimaculatus*

	CTRL - n	pH - ac	Mn
AGUDO	444,17 ± 139,42 ^{ab}	58,89 ± 23,41 ^a	682,09 ± 167,70 ^b
RECUPERAÇÃO	612,21 ± 108,54 ^a	72,70 ± 20,46 ^b	423,43 ± 50,16 ^a

Figura 2: Frequência oocitária de *Astyanax bimaculatus* de todos os grupos experimentais do período agudo e do período de recuperação. Grupo controle neutro (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), Manganês (Mn). A abreviação (recup) indica grupos experimentais do período de recuperação. Diâmetros oocitários em classes de 100 µm com variação de 0 a 1100 µm de diâmetro.

4.5 - Caracterização da Bioconcentração de Mn

A figura 3 apresenta a distribuição de Mn entre os diferentes tecidos analisados de *A. bimaculatus* do grupo Mn na fase de exposição aguda a este metal. As brânquias foram o principal órgão de deposição, enquanto que os demais órgãos apresentaram valores semelhantes de bioconcentração, na seguinte ordem decrescente: rins, fígado, encéfalo, baço, vesícula biliar, ovários e músculo branco.

Figura 3: Bioconcentração de Mn em (mg.g⁻¹) nos diferentes tecidos de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* após a fase de exposição aguda (média ± EPM)..

Da mesma forma como foi observado para o Al no período de recuperação, a bioconcentração nas brânquias diminuiu drasticamente e a relação de bioconcentração entre os demais tecidos segue a seguinte ordem decrescente: fígado, ovários, rins, vesícula biliar, músculo branco, encéfalo e baço (Figura 4). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre as fases de experimento agudo e recuperação em nenhum órgão ou tecido (Tabela 4).

Tabela 4: Bioconcentração de Mn nos diferentes órgãos e tecidos de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* nas duas etapas experimentais do grupo Mn.(média $\pm$ EPM)

Bioconcentração de Mn (mg.g⁻¹) em diferentes órgãos e tecidos de <i>A.bimaculatus</i>								
	Brânquias	Fígado	Encéfalo	Ovários	Vesícula	Baço	Músculo	Rins
AGUDO	5,68 $\pm$ 0,5	0,61 $\pm$ 0,2	0,55 $\pm$ 0,15	0,23 $\pm$ 0,18	0,34 $\pm$ 0,14	0,38 $\pm$ 0,0	0,15 $\pm$ 0	0,75 $\pm$ 0,2
RECUPERAÇÃO	1,08 $\pm$ 0,5	0,74 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,52 $\pm$ 0,2	0,24 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0	0,33 $\pm$ 0

Figura 4: Bioconcentração de Mn em (mg.g⁻¹) nos diferentes tecidos de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* após a fase de recuperação (média ± EPM)..

4.6 – Hormônios Esteroides

Após a exposição aguda de 96 horas, não foram observadas alterações plasmáticas de E₂, nos grupos pH – ac (P = 0,485) e Mn (P = 0,278) em relação ao grupo CTRL – n. O grupo pH – ac apresentou uma maior concentração de E₂ em relação ao grupo Mn (P = 0,033). Nenhum efeito foi observado para os animais em nenhum dos grupos do período de recuperação (P = 0,333).

A acidez da água, embora sem diferenças estatísticas significativas pode resultar em um aumento da concentração plasmática de E₂, fato que pode ser constatado na comparação entre os grupos pH – ac dos dois períodos experimentais, pois quando os animais remanescentes da exposição aguda retornam para o pH neutro, a concentração de E₂ diminui, sendo a comparação estatística entre estes dois grupos significativa (P = 0,005). A figura 5 apresenta em detalhes estes resultados.

A concentração plasmática de 17α OHP (Figura 6) dos animais do grupo Mn da etapa de exposição aguda diminuiu drasticamente após as 96 horas experimentais (P = 0,001), e embora nenhum efeito tenha sido observado entre os grupos da etapa de recuperação (P = 0,587), a análise estatística demonstrou que no pH – ac e no Mn houve redução na concentração plasmática deste hormônio quando estes grupos são comparados com seus respectivos grupos entre as duas etapas experimentais, (P = 0,030) e (P = 0,001).

Figura 5. Concentração plasmática do hormônio 17 β Estradiol em fêmeas *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), grupo de exposição ao manganês (Mn). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas. Os (*) indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

Figura 6. Concentração plasmática do hormônio 17 α OHP em fêmeas *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), grupo de exposição ao manganês (Mn). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais. Os (*) indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

Pode-se observar (Figura 7) uma diminuição na concentração plasmática de CT durante a fase aguda ($P = 0,018$) para os animais expostos ao Mn, enquanto que na fase de recuperação em todos os grupos a concentração plasmática deste hormônio foi semelhante, não havendo diferenças estatísticas significativas ($P = 0,325$).

Figura 7. Concentração plasmática do hormônio CT em fêmeas *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), manganês (Mn). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

4.7 – Hormônios Tireoidianos

Nenhum efeito foi observado na concentração plasmática de T_3 após a fase de exposição aguda, entretanto, após a recuperação foi registrado um acentuado aumento hormonal no grupo Mn ($P = 0,001$), conforme pode ser verificado na figura 8. Diferenças estatísticas também foram encontradas na comparação entre os grupos Mn dos períodos agudo e recuperação ($P = 0,002$), evidenciando um aumento na concentração plasmática de T_3 no período de recuperação.

Os dados referentes a concentração plasmática de T_4 mostram que ocorreu diminuição plasmática deste hormônio nos grupos pH – ac e Mn em relação ao CTRL – n ($P = 0,023$) durante a fase de exposição aguda, sem alterações observadas na fase de recuperação (Figura 9).

Figura 8. Concentração plasmática do hormônio T₃ em fêmeas *A. bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), grupo de exposição ao manganês (Mn). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais. Os (*) indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

Figura 9. Concentração plasmática do hormônio T₄ em fêmeas *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), grupo de exposição manganês (Mn). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

4.8 – Expressão gênica de FSH e LH

Estes dados foram descritos no capítulo 2.

4.9 – Resultados do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Nenhum efeito foi encontrado para a expressão gênica do mRNA do β LH de *A. bimaculatus* (Figura 10) nos animais dos grupos Mn e pH – ac tanto na fase de exposição aguda (P = 0,806) como na fase de recuperação (P = 0,096).

Os *primers* para qRT – PCR referentes ao FSH não amplificaram nenhum produto. Estes *primers* foram inespecíficos e, portanto não foram utilizados neste estudo, embora tenham sido desenhados especificamente para *A. bimaculatus* e tenham demonstrado especificidade na construção da curva padrão, os mesmos não funcionaram.

Figura 10: Número de cópias absolutas do mRNA de LH normalizadas pelo número de cópias do mRNA de ELF 1 – α de *Astyanax bimaculatus*. Grupo controle (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), manganês em pH ácido (Mn).

5. Discussão

A relação dos parâmetros físico-químicos da água analisados nestes ensaios de toxicidade não implicaram em interferência nos resultados obtidos. Sendo estes parâmetros e as condições de exposição as mesmas delineadas para os ensaios com o Al. As particularidades e detalhes envolvidos foram discutidos no capítulo 2.

A temperatura média de exposição dos animais de $24 \pm 0,4^{\circ} \text{C}$ e a concentração de OD de $7,14 \pm 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ mostraram-se as ideais para a fisiologia de *A. bimaculatus* (Hayashi *et al.*, 2004) e se enquadraram nas exigências para a realização destes experimentos. A adequada manutenção dos aquários garantiu uma baixa concentração de compostos nitrogenados nos meios experimentais, eximindo os resultados de uma possível interferência destes compostos. Considera-se também que a variação de pH entre os 4 períodos de cada 24 horas que totalizaram os ensaios de toxicidade apresentou pouca variação, a qual não influenciou a concentração de Mn dissolvido, pois nos momentos de menor pH registrados, a solubilidade do Mn não foi necessariamente favorecida, diferente do que foi observado para o Al nos resultados apresentados no capítulo 2.

O resultado referente ao Mn biodisponível (dissolvido) com a concentração média de $0,4 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ demonstra que as condições de exposição e manutenção dos ensaios de toxicidade propostos mantiveram-se muito próximas às condições iniciais propostas de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, portanto, os efeitos observados sobre os peixes podem seguramente ser relacionados a toxicidade deste metal e aos efeitos de acidez da água.

Notadamente, o Mn não exerceu nenhuma influência sobre a FR de *A. bimaculatus*, pois os valores encontrados para os animais deste grupo foram muito próximos aos do grupo controle nos dois períodos experimentais. E possivelmente as condições experimentais testadas não tenham sido suficientes para afetar a fecundidade, talvez devido a essencialidade biológica do Mn e também por ter ocorrido uma relativamente baixa bioconcentração deste metal nos tecidos e órgãos quando comparando com dados da literatura referente a outros metais, ou ainda devido a um efeito antagônico resultante da interação dos íons Mn^{n+} com os íons H^{+} .

O mesmo não pode ser afirmado para o grupo pH – ac, o qual demonstrou ser prejudicial para a fecundidade de *A. bimaculatus*. Sabe-se que o pH ácido da água pode

influenciar negativamente a reprodução de teleósteos. Entre alguns dos efeitos promovidos pela acidez da água estão a redução na incorporação de vitelo e atresia oocitária (Tam e Zhang, 1996), falhas no recrutamento de oócitos e impedimento da desova (Mount *et al.*, 1988; Vuorinen *et al.*, 1991), atrasos no período de ovulação e maturação final dos oócitos, morte de larvas e embriões e redução do IGS (Vuorinen *et al.*, 2003). Todos estes processos estão associados a declínios populacionais. A análise conjunta da FR com outros parâmetros reprodutivos deve ser conduzida para uma proposição mais elaborada a cerca dos efeitos do pH ácido na reprodução desta espécie.

Os resultados de bioconcentração demonstraram que a distribuição de Mn entre os tecidos analisados ocorre preferencialmente nas brânquias, pois este é o órgão em que geralmente sobrevém o maior acúmulo deste metal (Patridge e Lymbery, 2009) assim como para a grande maioria dos metais (Tabari *et al.*, 2010), sendo a bioconcentração deste metal nos demais órgãos muito baixa, ou seja, menores do que 1 mg.g⁻¹. Estes resultados corroboram a descrição encontrada na literatura para mamíferos que afirma que a distribuição de Mn nos órgãos e tecidos é bastante homogênea e que a concentração deste metal é maior nos tecidos ricos em mitocôndrias e pigmentos além de ossos, fígado, pâncreas e rins que acumulam mais Mn do que os demais tecidos do organismo (Aschner e Aschner, 1990, 2000).

Os resultados do período de recuperação evidenciam que as brânquias ainda são o principal órgão que acumulou o Mn, provavelmente devido a rota de exposição, neste caso a aquática, em que as brânquias foram o órgão de interface do organismo com o Mn do ambiente externo. Novamente os demais órgãos bioconcentraram valores muito baixos deste metal, comparando estes resultados aos da exposição aguda.

Em um estudo com *Labeo umbratus*, uma espécie de teleósteo que habita o Sul da África capturada em ambiente natural contaminado por vários metais, demonstrou a seguinte distribuição de Mn nos tecidos: brânquias, fígado, músculo e pele (Nussey *et al.*, 2000). Em outro estudo, novamente com uma espécie de peixe que também habita o sul do continente africano, *Barbus marequensis*, a bioacumulação de Mn nos diferentes órgãos e tecidos teve maiores concentrações nos intestinos, seguido das brânquias, vértebras, fígado e rins (Seymore *et al.*, 2006). De acordo com Sindayigaya *et al.*, (1994) o fígado é um dos locais de maior acumulação para metais, exceto o Mn.

Adam *et al.*, (1997) demonstraram que a transferência do Mn da água para a truta *O. mikiss* se bioconcentra principalmente nos ossos, nas brânquias, na pele e na cabeça, sendo que fígado e rins são os órgãos que menos bioacumulam este metal. Howe *et al.*, (2004 *apud* Hernández 2009) chamam a atenção de que a variação da concentração de Mn nos tecidos de peixes marinhos ou dulcícolas pode variar de concentrações menores do que 0,2 a 19 mg/kg de peso seco, alcançando 100 mg/kg de peso seco nos peixes que habitam águas superficiais poluídas.

Em virtude do exposto e apesar da escassez de dados na literatura sobre este assunto, independente da rota de absorção, bioconcentração ou bioacumulação, fica evidente que as brânquias são um dos principais locais de acúmulo de Mn. A caracterização da distribuição nos demais órgãos e tecidos precisa ser melhor avaliada para uma compreensão mais refinada destes processos.

Nas condições experimentais em que este estudo foi conduzido, não houve nenhum efeito do Mn sobre a concentração plasmática de E₂, embora tenha sido observada uma alteração deste hormônio na comparação entre os grupos pH – ac das duas etapas experimentais. Estas particularidades referentes ao pH ácido encontram-se retratadas em detalhes no capítulo 2.

Apesar de não ter sido observado nenhum efeito sob o E₂, a diminuição plasmática da 17 α OHP registrada para o grupo Mn implica em possíveis prejuízos a reprodução desta espécie. Com base na informação disponível na literatura atual é possível conjecturar alguns possíveis mecanismos pelos quais o Mn possa atuar como um desregulador endócrino, mais especificamente, como um agente antiesteroidogênico.

Nos ecossistemas aquáticos, o MnO₂ é capaz de se adsorver a metais e a componentes orgânicos e devido a esta particularidade, tem sido estudada a sua aplicação para oxidação de resíduos de hormônios esteroides artificiais presentes na água em estações de tratamento de esgoto (Rudder *et al.*, 2004). Biologicamente, a toxicidade do Mn parece ser dependente do seu estado de oxidação (Dobson e Aschner, 2007).

Devido ao fato de que a reprodução nos vertebrados está sob o controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG), é importante antes de se discutir a influência do

Mn nos processos reprodutivos, abordar alguns dos mecanismos pelos quais este metal causa neurotoxicidade.

Os mecanismos pelos quais os compostos de Mn causa neurotoxicidade celular e molecular são diversos, e seus impactos nos sistemas biológicos dependem da rota de exposição, dose/concentração, idade e duração da exposição (Villalobos *et al.*, 1994). Muitos dos mecanismos de toxicidade deste metal estão relacionados a sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos, GABAérgicos, colinérgicos, etc (Finkelstein *et al.*, 2007). Devido a interferência nestes sistemas, o Mn pode atuar sobre o hipotálamo prejudicando a reprodução.

Vários estudos com mamíferos *in vivo* e *in vitro* têm relatado que o Mn altera os níveis de neurotransmissores como a dopamina (DA), o glutamato (Glu), e o ácido gama aminobutírico (GABA) (Quintanar, 2008). Esses três neurotransmissores são intimamente relacionados e, por conseguinte, uma alteração em um deles inevitavelmente terá efeito sobre os outros, por exemplo, no metabolismo de Glu e GABA, o Glu é transformado em glutamina (Gln), por uma enzima chamada glutamina sintase – Mn, e a Gln, por sua vez pode ser convertida em GABA pela enzima *ácido glutâmico desidrogenase* (Hazell, 2002).

Todas essas inter-relações têm complicado a interpretação dos resultados referentes aos níveis de neurotransmissores em consequência da neurotoxicidade do Mn (Erickson e Aschner, 2003). A desestruturação no metabolismo destes neurotransmissores pode afetar o controle neuroendócrino da reprodução em vertebrados por ser um agente inibidor em neuro-hormônios hipotalâmico e hormônios hipofisários (Erickson e Aschner, 2003).

Pine *et al.*, (2005) demonstraram que em mamíferos (machos) o Mn aumenta a liberação de GnRH *in vitro*, liberação *in vivo* das gonadotropinas FSH e LH como também de E₂ e testosterona (Lee *et al.*, 2006). O mecanismo hipotalâmico da ação interferente do Mn²⁺ é devido a sua capacidade de ativar o sistema óxido nítrico sintase (ONS)/ óxido nítrico (ON) (Prestifilippo *et al.*, 2007). A ativação do sistema (NOS/ON) ocorre da seguinte maneira: O ácido glutâmico (GA) e as catecolaminas são importantes neurotransmissores envolvidos na liberação de GnRH, sendo assim, o GA estimula os neurônios noradrenérgicos terminais resultando na liberação da norepinefrina, que por sua vez ativa os receptores α_1 –adrenérgicos dos neurônios nitridérgicos promovendo um aumento do Ca²⁺ intracelular o qual ativa a NOS resultando num aumento da

produção de ON. A difusão do ON ativa a cGMP (guanosina monofostato cíclico) que por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG) (Prestifilippo *et al.*, 2008). A capacidade do Mn de influenciar estes mecanismos deixa evidente seu potencial em impactar a reprodução por promover desajustes hipotalâmicos.

Os dados de expressão gênica do mRNA do β LH de fêmeas de *A. bimaculatus* deixam claro que a parte do eixo neuroendócrino da reprodução que envolve o hipotálamo e a hipófise não foi afetada pela exposição ao Mn, o que isenta desajustes tanto no GnRH, LH e nos mecanismos de *feedback* negativos envolvidos. Portanto a desregulação endócrina registrada para a 17 α OHP possivelmente envolveu mecanismos de inibição da esteroidogênese ovariana. O resultado da concentração deste hormônio registrado para os animais do grupo de recuperação demonstra que o efeito tóxico foi temporário, pois após terem sido retirados do contato com o Mn a concentração plasmática se restabeleceu e isso também indica uma capacidade da espécie de recuperação dos efeitos tóxicos.

O Mn pode ser considerado um agente antiesteroidogênico, pois em estudos *in vitro* com células de Leydig de ratos este metal impediu/suprimiu a expressão do gene responsável pela proteína StAR cuja função é de transportar o colesterol (que é a molécula precursora de todos os hormônios esteroides) para as membranas internas das mitocôndrias, como também de influenciar o passo seguinte da esteroidogênese, que é a conversão do colesterol em pregnenolona, reduzindo a atividade do complexo multi-enzimático P450_{scc} responsável por esta conversão. Além destes efeitos, neste mesmo estudo, foi demonstrado que o Mn diminuiu a atividade da enzima 3 β – HSD (responsável pela conversão da 17 α hidroxipregnenolona em 17 α OHP) (Cheng *et al.*, 2005) e a concentração plasmática de testosterona e de progesterona.

Ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas no qual o Mn é passível de atuação, existem enzimas quinases como a PKC além do cAMP e proteínas fosforiladas como a StAR (Cheng *et al.*, 2003), o que demonstra que da mesma forma como outros metais, tais como o Al, o Mn comprova afinidade por este tipo de molécula, provocando efeitos antiesteroidogênicos. Sugere-se que a redução da 17 α OHP registrada neste estudo pode ter sido devido à ação do Mn em um dos mecanismos citados acima.

Com relação à concentração plasmática dos corticosteroides, propõe-se neste estudo que a redução plasmática do CT no grupo de exposição ao Mn em pH ácido, de igual modo ao que já discutido para os efeitos do Al no capítulo 2, pode ter sido por um efeito antiesteroidogênico, da mesma forma como sugerido anteriormente pra a 17 α

OHP, bem como a um efeito de hormese (Calabrese e Blain, 2011). Contudo, em ambos os casos, a possibilidade da exposição a íons metálicos resultar na interação destes com proteínas transportadoras de hormônios no plasma, como a albumina não pode ser totalmente descartada.

Algumas proteínas transportadoras de hormônios no plasma são altamente seletivas transportando apenas hormônios esteroides ou da tireoide. Estas proteínas de transporte altamente seletivas incluem a globulina ligadora de hormônios sexuais ou SHBG (do inglês *Sex Hormone-Binding Globulin*), que é uma glicoproteína plasmática transportadora de esteroides sexuais (Teixeira *et al.*, 2002), a CBG, (do inglês *Corticosteroid Binding Globulin*), que é responsável pelo transporte de corticosteroides e a TBG (do inglês *Thyroid Binding Globulin*), que é transportadora de hormônios da tireoide (Baker, 2002). Muitas das proteínas transportadoras do plasma, como as globulinas, a albumina e as proteínas da família das transferrinas possuem em sua estrutura molecular um domínio que se liga a íons metálicos (Lambert *et al.*, 2005) como o Zn^{2+} e o Ca^{2+} , os quais interferem na especificidade e na afinidade pelas moléculas transportadas, por exemplo pelo E_2 (Avvakumov *et al.*, 2010).

Íons de Al, por uma interação competitiva podem deslocar e substituir íons como o Mg^{2+} , o Zn^{2+} e o Ca^{2+} (Poléo, 1995), neste ponto, é importante destacar a conhecida capacidade do Mn de se ligar a proteínas plasmáticas como a albumina e a transferrina (Aschner e Aschner, 1990, 2000) da mesma forma que outros metais, como o Al e o Fe e reduzir a afinidade e a capacidade destas moléculas transportadoras.

Sabendo-se que metais como o Al e o Mn podem se ligar a proteínas plasmáticas transportadoras, como a transferrina (Mundy *et al.*, 1994; Nagaoka e Maitani, 2005), seria possível que a exposição metálica tenha interferido também na afinidade das globulinas transportadoras de esteroides, levando a um aumento no *clearance* plasmático (Patiño *et al.*, 1985), fato que poderia estar associado a diminuição da concentração plasmática de 17α OHP e de CT, pois os metais podem alterar a estrutura das moléculas transportadoras destes hormônios, impedindo que haja uma resposta hormonal adequada e que a concentração hormonal plasmática permaneça elevada (Ward *et al.*, 2007).

Além das alterações observadas nos hormônios esteroides, algumas alterações foram observadas nos hormônios tireoideanos de *A. bimaculatus*. Sugere-se neste estudo que a redução da concentração de T_4 na verdade correspondeu a um efeito de aclimação e modulação endócrina resultante da exposição metálica. Entretanto, o

aumento de T_3 observado no grupo Mn do período de recuperação sugere possíveis efeitos sob os mecanismos de *feedback* negativo, que na ausência do Mn apresentaram desajustes, ou ainda que alterações possam ter sido decorrentes de outros mecanismos ainda desconhecidos.

Muito pouco é conhecido sobre a relação entre o Mn e os hormônios da tireoide. Postula-se que o Mn pode afetar a homeostase dos hormônios tireoidianos agindo diretamente sobre glândula tireoide e seus respectivos hormônios (T_3 e T_4), ou indiretamente através de alterações no controle dopaminérgico da glândula tireoide (Soldin e Aschner, 2007). As disfunções hipotálamo-hipofisárias, promovidas pela exposição ao Mn podem estar associadas com desajustes sobre o TRH (hormônio liberador de tireotrofina) e TSH (hormônio estimulante da tireoide) (Bianco *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007), atribuídos principalmente a perda da homeostase sobre a dopamina (Soldin e Aschner, 2007), interferindo dessa forma nos mecanismos de *feedback* para estes hormônios.

A apreciação dos resultados aqui apresentados demonstra a capacidade potencial do Mn em prejudicar a reprodução de teleósteos, principalmente por reduzir a concentração plasmática da 17α OHP que é a precursora do hormônio responsável pela desova e alterar hormônios importantes no metabolismo dos animais como corticosteroides e hormônios tireoidianos. A bioconcentração registrada para este metal evidencia que ele pouco se acumulou nos tecidos biológicos nas condições experimentais testadas, embora estas tenham sido suficientes para causar efeito tóxico. Entretanto, a toxicidade do Mn parece ser temporária e não permanente como ocorre para muitos metais, pois os animais sujeitos a exposição aparentemente conseguem, pelo menos parcialmente se recuperar da toxicidade.

6. Referências bibliográficas

- Adam, C., Laplace, G., Bauduin, J. P. 1997. Uptake from water, release and tissue distribution of Mn in the rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss walbaum*). Environmental Pollution. 97 (1-2), 29 – 38.
- Aschner, M., Aschner, J. L. 2000. Brains transport and emerging research needs. Environmental Health Perspective 108, 429 – 432.
- Aschner, M., Aschner, J. L. 1990. Manganese transport across the blood brain barrier: Relationship to ion homeostasis. Brain Resident Bulletin 24, 857 – 860.
- Avvakumov, G. V., Cherkasov, A., Muller, Y. A., Hammond, G. L. 2010. Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. Molecular and Cellular Endocrinology. 316,13–23.
- Baker, M. E. 2002. Beyond carrier proteins albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. Journal of Endocrinology. 175, 121-127.
- Bianco, C. A., Kim, B.W. 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. J Clin Invest. 116 (10), 2571 – 2590.
- Calabrese, E. J., Blain, R. B. 2011. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. Regulatory Toxicology and Pharmacology 61. 73 – 81.
- Cheng, J., Fu, J., Zhou, Z, C. 2005. The mechanism of manganese-induced inhibition of steroidogenesis in rat primary Leydig cells. Toxicology. 211: 1–11.
- Cheng, J., Fu, J. L., Zhou, Z, C. 2003. The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. Toxicology. 187: 139 - 148.

- Chiswell, B., Mokhtar, M. B., 1986. The speciation of manganese in freshwaters. *Talunia*. 33 (8), 665 – 677.
- Citak, D., Tuzen, M., Soylak, M. 2010. Speciation of Mn(II), Mn(VII) and total manganese in water and food samples by coprecipitation–atomic absorption spectrometry combination. *Journal of Hazardous Materials* 173, 773 – 777.
- Dobson, A. W., Aschner, M. 2007. Manganese induced oxidative stress. *Oxidative stress and neurodegenerative disorders*. 433 – 450.
- Erikson, K. M., Dobson, A. W., Dorman, D. C., Aschner, M. 2004. Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. *Science of the Total Environment*. 409 – 416.
- Erickson, K. M., Aschner, M. 2003. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochemistry International* 43, 475 – 480.
- Finkelstein, Y., Milatovic, D., Ascher, M. 2007. Modulation of cholinergic systems by manganese. *NeuroToxicology* 28, 1003 – 1014.
- Gerber, G. B., Leonard, A., Hantson, P. 2002. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Critical Reviews Oncology Hematology* 42, 25 – 34.
- Hazell, A. S. 2002. Astrocytes and manganese neurotoxicity. *Neurochemistry International* 41, 271 – 277.
- Hayashi, C., Meurer, F., Boscolo, W. R., Lacerda, C. H. F., Kavata, L. C. B., 2004. Frequência de Arraçoamento para Alevinos de Lambari do Rabo-Amarelo (*Astyanax bimaculatus*). *Revista Brasileira Zootecnia* 33 (1), 21-26.
- Hernández, R. B. 2009. Manganês: o papel no fracionamento químico e da especiação como determinantes de seu comportamento geoquímico e neurotóxico nos organismos em desenvolvimento. Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado. 140p.

- Howe, P., Malcolm, H., Dobson, S. 2004. Manganese and its compounds: Environmental aspects. World Health Organization. Geneva.
- Iavicoli, I., Fontana, L., Bergamaschi, A. 2009. The effect of metals as endocrine disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 12, 206 – 233.
- Lambert, L. A., Perry, H., Halbrooks, P. J., Mason, A. B. 2005. Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 142, 129 – 141.
- Lee, B., Hiney, J. K., Pine, M. D., Srivastava, V. K., Dees W. L. 2007. Manganese stimulates luteinizing hormone releasing hormone secretion in prepubertal female rats: hypothalamic site and mechanism of action. *Journal of Physiology* 578 (3), 765 – 772.
- Lee, B., Pine, M., Johnson, L., Rettori, V., Hiney, J. K., Dees, H. L. 2006. Manganese acts centrally to activate reproductive hormone secretion and pubertal development in male rats. *Reproductive Toxicology* 22, 580 – 585.
- Lima, P. D. L., Vasconcellos, M. C., Bahia, M. O., Montenegro, R. C., Pessoa, C. O., Costa-Lotufo, L. V., Moraes, M. O., Burbano, R. R. 2008. Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Toxicology in Vitro* 22, 1032 – 1037.
- Morello, M., Zatta, P., Zambenedetti, P., Martorana, A., D'Angelo, A., Melchiorri, G., Bernardi, G., Sancesario, G. 2007. Manganese intoxication decreases the expression of manganoproteins in the rat basal ganglia: An immunohistochemical study. *Brain Research Bulletin* 74, 406 – 415.
- Mount, D. R., Hockett, J. R.; Gern, W. A. 1988. Effect of long – term exposure to acid, aluminum, and low calcium on adult brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Vitellogenesis and hormone regulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, 1633-1642.
- Nagaoka, M. H., Maitani, H. 2005. Binding affinity of aluminium to human serum transferrin and effects of carbohydrate chain modification as studied by HPLC/high-

resolution ICP-MS Speciation of aluminium in human serum. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 1887 – 1994.

Nayak, P. 2002. Aluminum: Impacts and disease. *Environmental Research A*. 89, 101- 115.

Nussey, G., Vuren, J. H. J., Preez, H. H. Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. *Water SA*. 26, 269 – 274.

Partridge, G. J., Lymbery, A. J. 2009. Effects of manganese on juvenile mullet (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity-Implications for inland mariculture. *Aquaculture* 290 (3-4), 311 – 316.

Patiño, R., Screck, C. B., Redding, J. M. 1985. Clearance of plasma corticosteroids during smoltification of coho salmon *Oncorhynchus kistuch*. *Comp. Biochem. Physiol.* 82, 531 – 535.

Pine, M., Lee, B., Dearth, R., Hiney, J. K., Dees, W. L. 2005. Manganese Acts Centrally to Stimulate Luteinizing Hormone Secretion: A Potential Influence on Female Pubertal Development. *Toxicological Sciences* 85, 880 – 885.

Poléo, A. B. S. 1995. Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic Toxicology*. 31, 347-356.

Prestifilippo, J. P., Solari, J. F. Laurentiis, A. D., Mohn, C. E., Cal, C., Reynoso, R., Dees, W. L., Retori, V. 2008. Acute Effect of Manganese on Hypothalamic Luteinizing Hormone Releasing Hormone Secretion in Adult Male Rats: Involvement of Specific Neurotransmitter Systems. *Toxicological Sciences* 105 (2), 295 – 302.

Prestifilippo, J. P., Solari, J. F., Mohn, C., Laurentiis, A. D., McCann, S. M., Dees, W. L. Rettori, V. 2007. Effect of Manganese on Luteinizing Hormone–Releasing Hormone Secretion in Adult Male Rats. *Toxicological Sciences* 97 (1): 75 – 80.

- Quintanar, L. 2008. Manganese neurotoxicity: A bioinorganic chemist's perspective. *Inorganica Chimica Acta* 361, 875 – 884.
- Rudder, J., Van de Wiele, T., Dhooge, W., Comhaire, F., Verstraete, W. 2004. Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2). *Water Research* 38, 184–192.
- Santamaria, A. B. 2008. Manganese exposure, essentiality & toxicity. *Indian Journal Medical Research* 128, 484 – 500.
- Seymore, T., Preez, H.H., Vuren, H. H. J. 2006. Manganese, lead and strontium bioaccumulation in the tissues of yellowfish, *Barbus marequensis* from the lower Olifants river, Eastern Transvaal. *Water SA* 21, 159 – 172.
- Sindayigaya, E., Cauwenbergh, R., Robberecht, H., Deelstra, H. 1994. Copper, zinc, manganese, iron, lead, cadmium, mercury and arsenic in fish from Lake Tanganyika, Burundi. *The Science of the Total Environment* 144, 103-115.
- Soldin, O. P., Aschner, M. 2007. Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: Potential links. *NeuroToxicology* 28, 951 – 956.
- Tabari, S., Saravi, S. S. S., Bandany, G. A., Dehghan, A., Shokradeh, M. 2010. Heavy metals (Zn, Pb, Cd and Cr) in fish, water and sediments sampled from Southern Caspian Sea, Iran. *Toxicology and Industrial Health* 26 (10), 649 – 656.
- Tam, W. H., Zhang, X. 1996. The development and maturation of vitellogenic oocytes, plasma steroid hormone levels, and gonadotrope activities in acid-stressed brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal Zoology* 74, 587-593.
- Teixiera, R. J., Dimetz, T., Bordallo, M. A., Guimarães, M. M. 2002. Papel dos Androgênios Adrenais e Periféricos na Modulação dos Níveis da Globulina Ligadora dos Hormônios Sexuais na Pubarca Precoce. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo* 46, 520– 525.

- Vieira, M. C., Torronteras, R., Córdoba, F., Canalejo, A. 2012. Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 212 – 217.
- Villalobos V, Bonilla E, Este ´vez J, Da ´vila Jo, Castro F. 1994. Manganese toxicity: muscarinic receptor binding in the mouse brain. *Journal Toxicology Environmental Health* 42,185 –191.
- Vuorinen, P. J., Keinanen, M., Seppo, P And Tigerstedt, C., 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula L.*) in long – term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 255 – 276.
- Vuorinen, P. J., Vuorinen, M. 1991. Effects of long-term prespawning acid/aluminium exposure on whitefish (*Coregonus wartmanni*) reproduction and blood and plasma parameters. *Finnish Fisheries Research* 12, 125 – 133.
- Ward, C. K., Fontes, C., Breuner, C. W., Mendonça, M. T. 2007. Characterization and quantification of corticosteroid-binding globulin in a southern toad, *Bufo terrestris*, exposed to coal-combustion-waste. *General and Comparative Endocrinology* 152, 82 – 88.
- Zagatto, A. P.; Bertoletti, E. (Eds). 2006. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima. 478p

CAPÍTULO 4

Efeitos endócrinos, reprodutivos e de bioconcentração resultantes da exposição sincrônica ao alumínio e ao manganês em fêmeas de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae)

1 – Introdução

Interações toxicológicas resultantes das misturas de compostos químicos na água, invariavelmente acarretam em consequências ecofisiológicas para toda a biota aquática. No entanto, os mecanismos e os resultados de tais interações ainda carecem de explicações (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Estes mesmos autores reiteram que esta é uma questão muito complexa, pois em muitos casos nota-se uma ambiguidade entre os resultados esperados. Por exemplo, enquanto efeitos aditivos foram registrados na interação de poluentes em baixas concentrações, por outro lado, efeitos antagônicos destes mesmos poluentes foram registrados para altas concentrações. Esta realidade contraproducente ainda requer muitas pesquisas para que a ecotoxicologia seja capaz de prever os efeitos e os eventos de toxicidade (Santore *et al.*, 2002).

Considerando-se as interações entre os compostos químicos, Rand (1995) *apud* Zagatto e Bertoletti (2006) sugerem definições para os efeitos tóxicos resultante deste sincronismo:

- *Efeito sinérgico*: o efeito é maior do que a soma dos efeitos de cada agente em separado ($2 + 3 = 20$).
- *Efeito de potenciação*: um contaminante só apresentará efeito quando estiver simultaneamente com outro contaminante ($0 + 2 = 10$).
- *Efeitos antagônicos*: o efeito de um agente é diminuído, inativado ou eliminado quando se combina com outro agente ($4 + 6 = 8$; $3 + 0 = 1$).
- *Efeitos aditivos*: o efeito final é igual a soma dos efeitos de cada um dos agentes envolvidos quando aplicados separadamente ($2 + 3 = 5$).

Pesquisas com o objetivo de elucidar os efeitos tóxicos de metais aplicados individualmente e em forma de mistura (dois ou mais metais) utilizando os peixes como modelo têm aumentado no mundo todo devido aos agravos ambientais e à saúde humana, pois os ecossistemas aquáticos têm sido expostos a misturas complexas, tanto orgânicas, quanto metálicas que podem apresentar significativa interação entre si (Javed, 2012).

Muitos metais são essenciais, como por exemplo, Zn, Cu, Mn, enquanto que outros como o Al não são essenciais e não possuem função biológica conhecida (Nayak, 2002). Em um estudo com larvas do peixe *Mogurnda mogurnda* foi demonstrado que o Si sendo um semimetal atenua os efeitos tóxicos do Al devido a formação de complexos (Camilleri *et al.*, 2003). Em outro estudo, conduzido por França *et al.*, (2007), foi demonstrado que o Se (não metal) quando aplicado simultaneamente tem efeito antagônico à ação tóxica ao cloreto de mercúrio (HgCl_2) em alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus* após exposição aguda. Ainda neste contexto, pode-se citar o resultado da interação entre Ag, Zn, Cu, Se e Hg na bioacumulação no peixe *Brachydanio rerio* após 12 dias de exposição aquática, demonstrando que a Ag promoveu efeitos antagônicos sobre a bioacumulação de Hg, enquanto que Zn, Cu e Se promoveram uma maior bioacumulação de Ag (Ribeyre *et al.*, 1995).

Em ensaios de toxicidade embrio-larvais com o ouriço do mar *Strongylocentrotus intermedius* foi utilizada uma mistura de Cu, Pb, Zn e Cd em 11 diferentes combinações a fim de se testar as possíveis interações entre si. Foi demonstrado que para a maioria das combinações binárias houve um efeito sinérgico, enquanto que efeitos antagônicos também ocorreram e foram observados, mas neste caso, para as seguintes misturas (Cu + Pb e Zn + Cd). Estes resultados demonstram que a toxicidade e o comportamento dos componentes metálicos resultaram da combinação da mistura (Xu *et al.*, 2011).

Situados também nesta realidade estão muitos compostos químicos orgânicos, por exemplo, os surfactantes perfluorados os quais são resistentes a degradação ambiental química e biológica e podem apresentar alguma interação com outros compostos químicos presentes na água, tais como os metais HgCl_2 e CdCl_2 . Destas interações ocorreram efeitos antagônicos, enquanto que quando misturados a compostos orgânicos de mesma natureza química o efeito observado foi sinérgico (Palomares *et al.*, 2012).

Diante do exposto, fica claro que o comportamento e interação de compostos químicos no ambiente estão totalmente sujeitos a inúmeras variáveis. Neste sentido, é oportuno salientar que Al e Mn, segundo os dados da CETESB (CETESB, 2011), estão com as concentrações médias dos últimos quatro anos acima dos padrões CONAMA (CONAMA 357, 2005) em cerca de 31% e 18% respectivamente em não conformes em

vários rios e tributários de diversas bacias hidrográficas do Estado de São Paulo, por exemplo, a bacia do Alto Tietê e a do rio Paraíba do Sul. Entretanto, não existe relação direta do aumento na concentração destes metais com efluentes industriais ou domésticos (CETESB, 2008).

Sejam quais forem os processos que resultem no enriquecimento dos corpos hídricos com os metais em questão, não são conhecidas as respostas biológicas da exposição a estes metais em peixes neotropicais. E pelo fato de que tanto o Al como o Mn são notoriamente neurotóxicos e podem interferir sobre o eixo hipotálamo – hipófise – gônadas, a compreensão das consequências reprodutivas da exposição a estes dois metais são essenciais para subsidiar programas de monitoramento ambiental, preservação das comunidades ícticas e proteção dos ecossistemas aquáticos.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Ensaio de toxicidade

Estes itens encontram-se descritos no capítulo 2.

2.1.1 – Grupos experimentais

Para a exposição sincrônica de *A. bimaculatus* ao Al e ao Mn foram constituídos três grupos experimentais (duplicatas), separados entre: Grupo Controle em pH neutro (CTRL – n), Grupo pH ácido (pH – ac), Grupo Sincrônico (Sin) em que os animais foram expostos sincronicamente a estes metais em pH ácido.

Outros detalhes quanto ao desenho experimental encontram-se descritos no capítulo 2.

2.2. Preparação e manipulação do contaminante metálico

Soluções estoque de Al e Mn foram preparadas isoladamente a partir de sais de Al_2SO_4 e Mn_2SO_4 (MERCK). A massa de cada sal correspondente a concentração de 0,5 mg/L em 140 L foi mantida em estufa a 60° C durante 12 horas e após este período a massa seca foi dissolvida em água MilliQ. A solução obtida foi armazenada em frasco de vidro âmbar previamente lavado com HNO_3 10% SUPRAPUR (MERCK) e acidificada com o mesmo ácido a 65% e refrigerada a 4°C. As soluções estoque de Al e Mn foram utilizadas isoladamente para a introdução simultânea no meio experimental nas concentrações nominais de 0,5 mg. L⁻¹ cada uma.

Outros detalhes quanto à preparação e manipulação dos contaminantes metálicos encontram-se descritos no capítulo 2.

2.3 – Procedimentos de amostragem de tecidos e plasma sanguíneo

Estes itens encontram-se descritos no capítulo 2.

2.4 – Dosagens hormonais

Estes itens encontram-se descritos no capítulo 2.

2.5 – Análise quantitativa de Al e Mn em tecidos e órgãos

Estes itens encontram-se descritos no capítulo 2.

2.6 – Digestão ácida

Estes itens encontram-se descritos no capítulo 2.

2.7 – Fecundidade e frequência oocitária

Estes itens encontram-se descritos no capítulo 2.

2.8 – Expressão gênica de gonadotropinas

Estes itens encontram-se descritos no capítulo 2.

2.8.1 – PCR em tempo real (qRT-PCR)

Estes itens encontram-se descritos no capítulo 2.

3 – Análises estatísticas

Estes itens encontram-se descritos no capítulo 2.

4 – RESULTADOS

4.1- Características físico – químicas da água

Estes resultados encontram-se descritos no capítulo 2.

4.1.1 – Temperatura, Oxigênio dissolvido e Compostos Nitrogenados

A temperatura da água e a concentração de oxigênio dissolvido (OD) dos grupos CTRL – n e pH – ac encontram-se descritas no capítulo 2. Estes mesmos dados, para o grupo Sin foram respectivamente de $24,36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,39$ e $7,34 \pm 0,48\text{ mg.L}^{-1}$, no experimento agudo, e de $25,35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,42$ e $7,22 \pm 0,19\text{ mg.L}^{-1}$ na fase experimental de recuperação. Semelhantemente ao que foi observado para os demais grupos, a concentração de compostos nitrogenados, expressa em mg. L^{-1} de amônia total (NH_3) e nitrito (NO_2^-) mantiveram-se praticamente nulas.

4.1.2 – pH

As tabelas 3 e 4 do capítulo 2 contêm as informações referentes ao pH dos grupos CTRL – n e pH – ac. A tabela 1 deste capítulo apresenta a média do pH antes e após as trocas de água entre cada intervalo de 24 horas, bem como sua respectiva variação para o grupo Sin. A média final registrada para o período agudo foi de $5,8 \pm 0,6$ e para a recuperação $7,4 \pm 0,0$.

Tabela 1: Variação do pH durante as 96 horas de exposição aguda de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* do grupo Sin (média $\pm$ DP). (*) Indicam os momentos de renovação da água experimental.

Grupo Sincrônico – Média dos valores iniciais e finais de pH				
Intervalo de tempo	pH inicial	pH final	Média	Variação diária
0 – 24	$5,24 \pm 0,15$	$5,92 \pm 0,09$	$5,58 \pm 0,20$	0,69
24* – 48	$5,43 \pm 0,09$	$6,02 \pm 0,23$	$5,72 \pm 0,08$	0,60
48* – 72	$5,41 \pm 0,23$	$6,00 \pm 0,08$	$5,70 \pm 0,18$	0,59
72* – 96	$5,32 \pm 0,08$	$5,92 \pm 0,26$	$5,62 \pm 0,17$	0,60

4.2 – Alumínio e Manganês – exposição sincrônica

A concentração na água para os dois metais nas frações total e dissolvida foram nulas para os grupos controle, e de $0,55 \pm 0,12 \text{ mg. L}^{-1}$ para o Al e de $0,52 \pm 0,0 \text{ mg. L}^{-1}$ para o Mn, ambos para a fração total, enquanto que para a fração dissolvida foi respectivamente de $0,38 \pm 0,15 \text{ mg. L}^{-1}$ de Al e $0,44 \pm 0,05 \text{ mg. L}^{-1}$ de Mn. Ambos os resultados foram muito semelhantes às condições de exposição isoladas de cada metal. A variação diária na concentração destes metais, nestas duas frações e sua relação com o pH, encontra-se na figura 1.

Figura 1: Variação nas concentrações de Al e de Mn nas frações total e dissolvida e de pH durante o experimento agudo com *Astyanax bimaculatus* no grupo Sin (Al e Mn). (*) Indicam os momentos das trocas de água.

4.3 – Índices corporais de *Astyanax bimaculatus*

As médias referentes ao comprimento total e a massa corpórea, além do IGS e do IHS para o grupo Sin estão apresentadas na tabela 2. As informações referentes às fêmeas dos grupos controle foram apresentadas no capítulo 2, item 3.4. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada para os valores de IGS entre os grupos no experimento agudo ($P=0,570$) e também na fase de recuperação ($P = 0,949$), ou na comparação interexperimental: Sin com Sin ($P = 0,534$). A análise estatística do IHS

também não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos tanto no experimento agudo ($P = 0,076$) como na recuperação ($P = 0,343$) ou entre Sin com Sin ($P = 0,857$).

Tabela 2: Dados morfométricos, ponderais, IGS e IHS de *Astyanax bimaculatus* experimento síncrono com Al e Mn. (média $\pm$ EPM).

ENSAIO	N	Comprimento Total (cm)	Massa Corpórea (g)	IGS	IHS
Agudo	10	13,95 $\pm$ 0,88	46,73 $\pm$ 12,57	16,01 $\pm$ 3,79	1,08 $\pm$ 0,29
Recuperação	10	13,85 $\pm$ 0,58	45,77 $\pm$ 7,49	17,15 $\pm$ 4,45	1,09 $\pm$ 0,38

4.4 – Fecundidade relativa e frequência oocitária

A fecundidade calculada no presente trabalho foi relativa (FR) à massa corpórea das fêmeas de *A. bimaculatus*. Nenhum efeito foi registrado para a FR de *A. bimaculatus* após as 96 horas de exposição síncrona ao Al e ao Mn ($P = 0,060$). Entretanto, após as 96 horas de recuperação foi registrada uma diminuição da FR para o grupo pH – ac em relação aos grupos CTRL – n ($P = 0,003$) e Sin ($P = 0,011$). Nota-se que nos dois períodos experimentais a FR do grupo pH – ac foi menor do que a dos demais grupos, embora diferenças estatísticas significativas tenham sido observadas apenas no período de recuperação (Tabela 3).

Para a análise da frequência oocitária foram separadas 11 categorias para a classificação do diâmetro dos oócitos, dentre as quais a primeira categoria foi de 0 – 100 μm e a última categoria de 1001 a 1100 μm de diâmetro. Os oócitos com diâmetro inferior a 500 μm foram considerados perinucleolares, enquanto que os maiores do que 500 μm foram classificados como vitelogênicos. A apreciação dos resultados referentes a frequência oocitária (Figura 2) revelou uma porcentagem maior para os oócitos acima de 700 μm . Estes resultados indicam animais reprodutivamente maduros.

Tabela 2: Fecundidade relativa de *Astyanax bimaculatus* nos períodos de exposição aguda e de recuperação CTRL – n (Grupo controle), pH – ac (Grupo pH ácido), Sin (Grupo Sin). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

Fecundidade relativa a massa corpórea de *Astyanax bimaculatus*

	CTRL - n	pH - ac	Sincrônico
AGUDO	444,17 ± 139,42	58,89 ± 23,41	402,01 ± 64,66
RECUPERAÇÃO	612,21 ± 108,54 ^a	72,70 ± 20,46 ^b	473,17 ± 59,33 ^a

Figura 2 Frequência oocitária de *Astyanax bimaculatus* de todos os grupos experimentais do período agudo e do período de recuperação. Grupo controle (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), Sincrônico (Sin). A identificação (recup) indica os grupos do período de recuperação. Diâmetros oocitários separados em classes de 100 µm com variação de 0 a 1100 µm.

4.5 – Caracterização da Bioconcentração de Al e Mn

Al e Mn foram quantificados em oito tecidos diferentes de *A. bimaculatus* (Tabela 4). Destes, seis acumularam mais Al do que Mn nos dois períodos experimentais: brânquias, fígado, vesícula biliar, baço, músculo branco e os rins. Somente o encéfalo e os ovários bioconcentraram mais Mn do que Al após o período agudo, mas mesmo nestes dois tecidos o Al bioconcentrou mais que o Mn após a recuperação.

Os tecidos e órgãos dos animais do experimento agudo que mais bioconcentraram Al em ordem decrescente foram: brânquias, fígado, vesícula biliar, baço, rins, músculo branco, ovários e encéfalo; e em relação ao Mn foram: brânquias, encéfalo e ovário, rins, vesícula biliar, baço, músculo branco e fígado. Estes mesmos resultados para o período de recuperação em relação ao Al foram: fígado, brânquias, vesícula biliar, encéfalo, ovários, baço, rins e músculo branco, enquanto que para o Mn foram: brânquias, fígado, rins, encéfalo e ovários, vesícula biliar, músculo branco e baço. Diante destes dados, fica evidente que as brânquias e o encéfalo foram os dois principais locais de deposição metálica.

Os resultados de bioconcentração da exposição sincrônica de *A. bimaculatus* ao Al e ao Mn demonstram que o Al se deposita no organismo muito mais do que o Mn. A comparação entre os tecidos dos dois períodos experimentais revelou diferenças estatísticas significativas apenas para o Al nas brânquias e no fígado, ($P = 0,001$).

Tabela 4: Bioconcentração de Al e Mn nos diferentes órgãos e tecidos de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* nas duas etapas experimentais do grupo Sin. (*)Indicam diferenças estatísticas significativas. (média $\pm$ EPM)

Bioconcentração de Al e Mn (mg.g⁻¹) em diferentes órgãos e tecidos de <i>A. bimaculatus</i>								
	Brânquias	Fígado	Encéfalo	Vesícula Biliar	Baço	Músculo Branco	Ovários	Rins
Al	189 $\pm$ 24,17 *	4,43 $\pm$ 2,48	0,13 $\pm$ 0,02	3,2 $\pm$ 1,85	2,95 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,03 *	0,76 $\pm$ 0,03
Al recuperação	8,98 $\pm$ 7,56 *	9,5 $\pm$ 8,5	4,74 $\pm$ 2,26	6,74 $\pm$ 3,78	1,17 $\pm$ 0,56	0,44 $\pm$ 0,29	1,55 $\pm$ 0,32 *	0,63 $\pm$ 0,16
Mn	1,69 $\pm$ 0,24	0,16 $\pm$ 0,05	1,15 $\pm$ 0,65	0,39 $\pm$ 0,26	0,35 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,0	0,12 $\pm$ 0,0	0,45 $\pm$ 0,34
Mn recuperação	1,29 $\pm$ 0,14	0,45 $\pm$ 0,14	0,38 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,06

4.6 - Hormônios Esteroides

A exposição sincrônica aguda de *A. bimaculatus* causou uma diminuição na concentração do E₂ (P= 0,001). Nenhum efeito ocorreu sobre a concentração plasmática deste hormônio após o período de recuperação (P = 0,401). Por outro lado, apenas para o grupo previamente exposto ao pH ácido, é notório que em condições de pH neutro (recuperação) os animais diminuem a concentração hormonal (P=0,005), caracterizando uma recuperação dos efeitos da exposição à acidez aquática (Figura 4).

Figura 4. Concentração plasmática do hormônio 17β Estradiol em fêmeas *Astyanax. bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), exposição sincrônico (Sin). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas. Os (*) Indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

Na figura 5, pode-se verificar que os efeitos da exposição sincrônica ao Al e ao Mn sobre a concentração plasmática de 17α OHP foram os mesmos observados na exposição ao Mn (capítulo 3), ou seja, uma diminuição da concentração plasmática deste hormônio (P = 0,001). Após o período de recuperação não houve diferenças estatísticas significativas (P = 0,075) na concentração plasmática deste progestágeno entre as fêmeas dos diferentes grupos experimentais. Entretanto, no grupo pH – ac a concentração hormonal diminuiu significativamente quando comparado com o pH – ac do período de exposição aguda (P = 0,030), da mesma forma a comparação entre os grupos Sin, demonstra um aumento na concentração plasmática deste hormônio, demonstrando que em ambos ocorreu recuperação dos efeitos tóxicos (P = 0,031).

Figura 5. Concentração plasmática do hormônio 17α OHP em fêmeas *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), sincrônico (Sin). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais: para o período agudo (ab). Os (*) indicam diferenças estatísticas interexperimentais entre um mesmo grupo.

A concentração plasmática de CT não apresentou alterações entre os grupos nas duas fases experimentais ($P = 0,079$ para a fase aguda e $P = 0,331$ para a fase de recuperação) (Figura 6).

Figura 6: Concentração plasmática do hormônio CT em fêmeas *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), sincrônico (Sin).

4.7 – Hormônios Tireoidianos

Na figura 7, pode-se constatar que após a exposição aguda não houve alterações na concentração plasmática do hormônio T_3 , ($P = 0,875$). Diferentemente do observado no período agudo, a concentração plasmática deste hormônio diminuiu no grupo Sin após o período de recuperação ($P = 0,001$). A análise estatística também revelou diferenças na comparação do grupo Sin entre os dois períodos experimentais, ou seja, agudo e recuperação ($P = 0,001$) com valores reduzidos após as 96 horas de recuperação. É importante destacar que a alteração hormonal foi observada quando os animais remanescentes do período agudo retornam a condições experimentais em pH neutro e ausência dos metais (Al e Mn).

Figura 7: Concentração plasmática do hormônio T_3 em fêmeas de *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), sincrônico (Sin). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais. Os (*) Indicam diferenças estatísticas entre o período agudo e recuperação do mesmo grupo.

Por outro lado, a exposição sincrônica aos metais resultou em uma diminuição da concentração plasmática do hormônio T_4 após o período de exposição aguda nos grupos pH – ac e Sin ($P = 0,001$). Nenhum efeito foi observado após o período de recuperação ($P = 0,122$) (Figura 8).

Figura 8: Concentração plasmática do hormônio T₄ em fêmeas de *Astyanax bimaculatus* após as etapas de exposição aguda e de recuperação. Grupo controle pH neutro (CTRL – n), grupo de exposição ao pH ácido (pH – ac), grupo de exposição sincrônica (Sin). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

4.8 – Expressão gênica de FSH e LH

Estes dados foram descritos no capítulo 2.

4.9 – Resultados do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Nenhum efeito foi observado sobre a expressão do mRNA de β LH para os grupos pH – ac e Sin após o período de exposição aguda ($P = 0,718$), assim como na recuperação ($P = 0,164$), (Figura 9).

Figura 9 Número de cópias absolutas do mRNA de β LH normalizadas pelo número de cópias do mRNA de ELF 1 – α de *Astyanax bimaculatus*. Grupo controle (CTRL – n), pH ácido (pH – ac), Sincrônico (Sin).

Assim como nos resultados apresentados nos capítulos 2 e 3, os *primers* para qRT – PCR referentes ao FSH não amplificaram nenhum produto.

5 – DISCUSSÃO

A tendência a alcalinização observada no pH da água dos aquários no final de cada intervalo de 24 horas exerceu efeito negativo sobre a concentração de Al dissolvido, reduzindo sua biodisponibilidade. Pode-se notar que o final das 48 e das 72 horas experimentais foram os momentos mais críticos para a biodisponibilidade, com os menores valores registrados para Al dissolvido. Todavia, nos momentos de renovação da água experimental, nos menores valores registrados para o pH o Al dissolvido alcançou as maiores concentrações, enquanto que a concentração de Mn mostrou-se indiferente à variação do pH.

A análise da FR demonstra claramente que a exposição sincrônica aos dois metais não resultou em nenhum efeito prejudicial para *A. bimaculatus*. Desta forma, pelo fato de que a exposição ao Al causou uma redução na FR mesmo que na fase de recuperação (capítulo 2) e a exposição ao Mn não causou nenhum efeito (capítulo 3), considera-se que a ação combinada destes dois metais sobre a FR seja antagônica. Os efeitos relacionados ao grupo pH – ac foram descritos no capítulo 2.

Os resultados de bioconcentração apresentados nos capítulos 2 e 3 demonstraram que após a exposição aguda, o Al se bioconcentrou primariamente nas brânquias, fígado e encéfalo, ao passo que para o Mn apenas as brânquias se destacaram, pois os valores observados para os demais tecidos foram baixos e bastante homogêneos. Neste sentido, os resultados deste mesmo parâmetro para a exposição sincrônica demonstraram o mesmo padrão para o Al, em que as maiores concentrações foram registradas também nas brânquias, fígado e neste caso, a vesícula biliar ao invés do encéfalo, enquanto que para o Mn, novamente as brânquias foram os órgãos que mais bioconcentraram.

A concentração de Al bioconcentrado nas brânquias dos animais do grupo Sin foi aproximadamente o dobro do valor observado para este metal nos animais expostos somente ao Al (detalhes no capítulo 2). Estes resultados revelam uma interação sinérgica entre Al e Mn para a bioconcentração, pois a acumulação de certos íons metálicos pode ser favorecida pela presença de outros íons metálicos presentes no

mesmo meio (Ribeyre *et al.*, 1995), fato que beneficiou a deposição de Al nas brânquias dos animais do grupo Sin.

Comparando estes mesmos grupos, Sin e Al, percebe-se que o padrão de bioconcentração no tecido hepático foi semelhante, embora o Al bioconcentrado na vesícula biliar do grupo Sin do período de recuperação tenha sido maior do que no grupo Al, possivelmente este resultado está associado a maior funcionalidade do fígado em relação a desintoxicação deste metal, demonstrando ser esta uma possível via de excreção deste. Estudos relacionados a eliminação de Al em mamíferos, demonstraram que a via de excreção biliar está associada a forte ligação deste metal com transferrinas (Klein *et al.*, 1993).

A exposição sincrônica de teleósteos a dois ou mais metais resulta em diferentes padrões de distribuição iônica nos tecidos, devido a fatores intrínsecos a fisiologia de cada espécie e a relação competitiva dos íons metálicos por sítios de associação biológica (Jaben *et al.*, 2012; Oberholster *et al.*, 2012). A exposição de 3 diferentes espécies de peixes ao Zn, Ni, Cu, Cd e Co demonstrou diferentes padrões de bioacumulação, mas em todas as espécies os órgãos que mais concentraram metais foram o fígado e os rins e, independente da ação sinérgica ou antagônica registrada para a interação entre estes íons metálicos, em todos os casos ocorreu toxicidade (Javed, 2012).

Xu *et al.*, (2011) demonstraram que a interação aquática entre os íons de Cu, Pb, Zn e Cd pode ser sinérgica, antagônica ou aditiva, sendo estas interações dependentes da combinação entre estes íons em uma mesma mistura. Os resultados da exposição sincrônica entre o Al e o Mn em *A. bimaculatus* demonstraram que o Al se acumula mais do que o Mn e que o padrão de acúmulo para o Al envolve primeiramente e de forma mais intensa as brânquias seguidas pelo fígado, encéfalo e a vesícula biliar. O acúmulo de Mn foi considerável apenas nas brânquias e, além disso, o efeito sinérgico entre estes dois metais foi observado unicamente neste órgão.

As consequências endócrinas da exposição sincrônica ao Al e ao Mn para as fêmeas de *A. bimaculatus* demonstraram diferentes interações entre estes metais. Da mesma forma que ocorreu com a exposição ao Mn, a exposição sincrônica resultou numa redução do E₂ plasmático nos animais e não houve recuperação. De forma semelhante, os resultados da concentração plasmática de 17 α OHP plasmática

demonstraram que no grupo Sin também ocorreu uma redução na concentração deste hormônio. E, embora tenha ocorrido restauração dos valores, pode-se dizer que a recuperação no grupo Mn foi maior do que a recuperação demonstrada nos animais deste grupo.

Diferentemente do registrado para os esteroides sexuais, a exposição sincrônica não causou efeitos sobre a concentração plasmática de CT, como havia sido observado para os dois metais isoladamente, que causaram redução nos valores deste corticosteroide. Este resultado sugere um efeito antagônico da interação destes metais sobre o CT e suscita a possibilidade de um efeito hormese, a qual pode ser definida como um fenômeno dose-resposta em que os efeitos opostos aos esperados são observados em baixas doses, quando comparados a altas doses para um mesmo parâmetro avaliado, sendo este conceito de considerável interesse na ecotoxicologia. (Calabrese *et al.*, 2011). Neste caso, a exposição sincrônica, além de conter os dois metais objeto deste estudo, também ocorreu em pH ácido, o que a princípio a denota como a exposição toxicologicamente mais deletéria.

Os resultados referentes à concentração plasmática do T₄ para os animais do grupo Sin foram os mesmos observados para os animais expostos individualmente ao Al e ao Mn, ou seja, a redução da concentração plasmática. Entretanto, os resultados da concentração plasmática do T₃ mostraram-se contraproducentes na exposição sincrônica, pois sabe-se que peixes teleósteos em geral, mas principalmente salmonídeos, quando expostos ao Al e/ou pH ácido, exibem como resposta endócrina um aumento plasmático de CT, T₃ e T₄, em parte devido a regulação iônica na qual estes hormônios participam (Waring *et al.*, 1996).

A depleção dos hormônios da tireoide registrada num estudo com *Clarias gariepinus*, foi associada a uma diminuição do GnRH, (devido a participação do T₃ na modulação da expressão do mRNA deste neurohormônio, Parhar *et al.*, 2000) e consequentemente diminuição no LH (Swapna e Senthilkumaran, 2007). Entretanto, como os resultados deste estudo não mostraram variação no mRNA do β LH, não há corroboração destes resultados com os resultados apresentados neste trabalho, o que permite inferir outros mecanismos estiveram envolvidos.

Estudos têm sugerido que teleósteos, como por exemplo, *Oreochromis niloticus* possuem três tipos de enzimas deiodinases, as quais tem a função de regular a

concentração sistêmica do T₃ por sua conversão a partir do T₄ (Power *et al.*, 2001), e que a circulação plasmática destes hormônios ocorre com a participação de lipoproteínas e proteínas transportadoras específicas como a albumina, as quais podem ser afetadas por íons metálicos e portanto perder sua funcionalidade e especificidade (Aschner e Aschner, 1990, 2000). Neste aspecto sabe-se que os hormônios tireoidianos sofrem inativação principalmente no fígado, sendo a principal via de inativação a deaminação oxidativa, a descarboxilação da molécula hormonal, ou sua deiodinação e excreção através da bile (Power *et al.*, 2001; Wieneke *et al.*, 2009).

Possivelmente, a redução na concentração para o T₃ observada no período de recuperação do grupo Sin, pode estar associada, pelo menos em parte a um dos processos descritos acima, haja vista que neste grupo, a análise dos metais na vesícula biliar demonstrou as maiores concentrações de Al entre todas as condições experimentais testadas neste estudo. Considerando-se que esta seja uma evidência indireta de um aumento da excreção biliar, seria possível que neste caso, parte da concentração plasmática do T₃ sofreu inativação hepática e excreção biliar. Coimbra *et al.*, (2007) sugeriram que a diminuição do T₄ plasmático observada para *Oreochromis niloticus* exposta ao pesticida endosulfan foi devida a um aumento no *clearance* hormonal, o que pode ter ocorrido no presente experimento.

Os resultados hormonais obtidos para as fêmeas vitelogênicas de *A. bimaculatus* indicam evidências de desregulação endócrina, e dependendo do hormônio a ser considerado, os efeitos estão relacionados às diferentes interações entre os íons de Al e de Mn resultantes da exposição sincrônica

6 – Referências bibliográficas

- Aschner, M., Aschner, J. L. 2000. Brains transport and emerging research needs. *Environmental Health Perspective* 108, 429 – 432.
- Aschner, M., Aschner, J. L. 1990. Manganese transport across the blood brain barrier: Relationship to ion homeostasis. *Brain Resident Bulletin* 24, 857 – 860.
- Calabrese, E. J., Blain, R. B. 2011. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 61, 73 – 81.
- Camilleri, C., Markich, S. C., Nolder, B. N., Turley, C. J., Parker, G., van Dam, R. A. 2003. Silica reduces the toxicity of aluminium to a tropical freshwater fish (*Mogurnda mogurnda*). *Chemosphere* 50, 355 – 364.
- CETESB. 2008. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo
- CETESB. 2011. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.
- Coimbra, A. M., Fernandes, A. F., Henriques, M. A. R. 2007. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), liver morphology, CYP1A activity and thyroid hormones after Endosulfan dietary exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 89, 230–236.
- CONAMA, 2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. 1-23p.
- França, J. G., Lombardi, J. V., Paiva, M. J. T. R., Carvalho, S. 2007. Toxicidade Aguda do Mercúrio, Associado ao Selênio, para Alevinos de Tilápia *Oreochromis niloticus*. *Journal Brazilian Society Ecotoxicological* 2 (3), 243 – 248.
- Jaben, G., M. Javed and H. Azmat, 2012. Assessment of heavy metals in the fish collected from the river Ravi, Pakistan. *Pakistan Vet. J.*, 32, 107 – 111.
- Javed, M. 2012. Effects of Metals Mixture on the Growth and their Bioaccumulation in Juvenile Major Carps. *International Journal of Agriculture & Biology*. 14, 477 – 480.

- Klein, G. L., Goldblum, R. M., Molsen, M. T., Pyron, D. L. Mann, P. A. Lee, T.C. Alfrey, A. C. 1993. Increased biliary transferrin excretion following parenteral aluminium administration to rats. *Pharmacol Toxicol.* 72 (6), 373 – 376.
- Nayak, P. 2002. Aluminum: Impacts and disease. *Environmental Research.* A. 89, 101-115.
- Oberholster, P. J., Myburgh, J. G., Ashton, P. J., Coetzee, J. J., Botha, A. M. 2012. Bioaccumulation of aluminium and iron in the food chain of Lake Loskop, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 75, 34–141.
- Palomares, I. R., Leganés, F., Rosal, R., Piñas, F. F. 2012. Toxicological interactions of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) with selected pollutants. *Journal of Hazardous Materials.* 201–202, 209 – 218.
- Parhar, I. S., Soga, T., Sakuma, Y. 2000. Thyroid hormone and estrogen regulate brains region specific messenger ribonucleic acids encoding three gonadotropin-releasing hormone genes in sexually immature male fish. *Oreochromis niloticus*. *Endocrinol.* 141, 1618 – 1626.
- Power, D. M., Llewellyn, L., Faustino, M., Norwell, M. A., Bjornsson, B. Th., Canario, A. V. M., Sweeney, G. E. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 130, 447 – 459.
- Rand, G. M. 1995. Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment. Second edition. Taylor & Francis, Washington, DC, USA. 1125p.
- Rybeire, F., Triquet, C. A., Boudou, A., Amiard, J. C. 1995. Experimental study of interactions between five trace elements – Cu, Ag, Se, Zn and Hg toward their bioaccumulation by fish (*Brachydanio rerio*) from the Direct Route. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, 1 – 11.
- Santore, R. C., Mathew, R., Paquin, P. R., DiToro, D. 2002. Application of the biotic ligand model to predicting zinc toxicity to rainbow trout, fathead minnow, and *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133, 271 – 285.

- Swapna, I., Senthilkumaran, B. 2007. Thyroid hormones modulate the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis in teleosts: Molecular insights. *Fish Physiol Biochem.* 33, 335 – 345.
- Xu, X., Li, Y., Wang, Y., Wang, Y. 2011. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. *Toxicology in Vitro.* 25, 294 – 300.
- Waring, C. P.; Brown, J. A.; Collins, J. E.; Prunet, P. 1996. Plasma Prolactin, Cortisol, and Thyroid Responses of the Brown Trout (*Salmo trutta*) Exposed to Lethal and Sublethal Aluminium in Acidic Soft Waters. *General and Comparative Endocrinology* 102, 377-385.
- Wieneke, N., Rube, F. N., Bode, L. M., Kuna, M., Andres, J., Carnevalli, L. C., Ernst, K. I. H., Püschel, G. P. 2009. Synergistic acceleration of thyroid hormone degradation by phenobarbital and the PPAR α agonist WY14643 in rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 240, 99 – 107.

CAPÍTULO 5

Discussão e Considerações Finais

1 – Discussão e Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram uma relação direta com os ensaios de toxicidade conduzidos, pois a exposição individual ou simultânea ao Al e ao Mn implicou em consequências sobre a fecundidade, bem como em distintas respostas endócrinas, influenciando ainda os processos de bioconcentração. Adicionalmente, os biomarcadores utilizados permitem concluir que ocorreram diferentes processos de interações entre Al e Mn que serão discutidos com base na classificação inicialmente apresentada de Zagatto e Bertoletti (2006), novamente aqui descrita:

- *Efeito sinérgico*: o efeito é maior do que a soma dos efeitos de cada agente em separado ($2 + 3 = 20$).
- *Efeito de potenciação*: um contaminante só apresentará efeito quando estiver simultaneamente com outro contaminante ($0 + 2 = 10$).
- *Efeitos antagônicos*: o efeito de um agente é diminuído, inativado ou eliminado quando se combina com outro agente ($4 + 6 = 8$; $3 + 0 = 1$).
- *Efeitos aditivos*: o efeito final é igual a soma dos efeitos de cada um dos agentes envolvidos quando aplicados separadamente ($2 + 3 = 5$).

A redução na FR das fêmeas de *Astyanax bimaculatus* utilizadas neste estudo causadas pela exposição ao pH ácido e pelo Al em pH ácido corroboram os dados da literatura que reportam a capacidade deste tipo de exposição em reduzir o recrutamento e a viabilidade de oócitos para a desova (Vuorinen *et al.*, 2003; Keinänen *et al.*, 2004). Em relação a FR dos animais do grupo Al, embora os resultados tenham demonstrado uma redução apenas nos animais do período de recuperação, a análise deste mesmos dados para este mesmo grupo no período de exposição aguda revela uma tendência a ocorrer estes mesmos efeitos. É importante destacar que em todas as condições experimentais testadas, os animais do grupo pH – ac não foram capazes de se recuperar dos efeitos impostos sobre a FR. Em relação ao grupo Sin, considera-se que a ausência de efeitos sobre a FR nos animais deste grupo é devida a uma interação antagônica entre os íons de Al e de Mn, pois os efeitos provocados sobre a FR nos animais expostos ao Al e a ausência de efeitos sobre os animais expostos ao Mn demonstram que quando juntos, os íons de Mn impediram efeitos negativos sobre a FR provocado pelos íons de Al.

Nas condições experimentais testadas, a exposição ao Mn, tanto isolada quanto sincrônica demonstrou pouca acumulação deste metal em *A. bimaculatus*, enquanto que o Al demonstrou uma capacidade de bioconcentração muito maior do que o Mn em todos os testes de exposição. Além disso, o Mn demonstrou favorecer a bioconcentração de Al principalmente nas brânquias, evidenciando uma interação sinérgica entre estes dois metais nos animais do grupo Sin. Estudos em campo e no laboratório têm demonstrado que a acumulação de metais nos tecidos é dependente principalmente da concentração dos metais e do período de exposição, embora alguns fatores abióticos, como pH, alcalinidade, dureza e temperatura desempenhem um papel importante nesta acumulação (Canli e Atli, 2003).

Os resultados endócrinos evidenciaram que dependendo do hormônio a ser considerado e do tipo de exposição a qual os animais foram submetidos, distintos efeitos de modulação ou de desregulação endócrinas foram encontrados. Os efeitos de redução no E₂ plasmático registrados para os animais do grupo Sin, demonstram uma interação sinérgica entre os íons de Al e de Mn, pois os resultados da exposição sincrônica são maiores do que a soma dos efeitos registrados para cada metal em separado sem recuperação na concentração plasmática deste hormônio.

A análise da concentração plasmática de 17 α OHP demonstrou que o Al não causou alterações neste hormônio, enquanto que na exposição ao Mn, embora tenha ocorrido a diminuição da concentração plasmática, os animais do período de recuperação foram capazes de restaurar as concentrações plasmáticas deste progestágeno. Entretanto, os resultados dos animais do grupo Sin demonstraram uma redução plasmática deste hormônio na exposição aguda, e apesar de serem capazes de se recuperar, esta recuperação foi bem inferior quando comparada aos animais da recuperação da exposição ao Mn, o que sugere uma interação de potenciação entre os íons de Mn e de Al, pois o Al intensificou os efeitos causados pelo Mn.

Os resultados para o CT plasmático demonstraram uma interação antagônica entre os íons de Al e de Mn para os animais do grupo Sin, assim como observado na FR, o que resultou na ausência de efeitos sobre este hormônio. Interações semelhantes entre CT e FR sugerem uma relação direta entre estes dois biomarcadores, considerando que o CT apresenta um importante papel na reprodução em peixes, afetando principalmente importantes parâmetros reprodutivos como fecundidade e qualidade dos

gametas (Schreck *et al.*, 2001). Devido aos resultados encontrados, sugere-se que a relação do CT com a exposição não somente ao Al, mas como ao Mn deva ser considerada com parcimônia e que a possibilidade do efeito hormese não deva ser descartada.

Da mesma forma, efeitos antagônicos foram associados a concentração plasmática de T₃, embora neste caso, estas interações tenham demonstrado ser mais complexas, pois nos animais do grupo Sin do período agudo, pode-se dizer que os íons Mn tiveram ação antagônica sobre os íons de Al impedindo um aumento na concentração hormonal neste grupo, enquanto que os efeitos remanescentes (toxicologicamente residuais) desta interação no período de recuperação também do grupo Sin, agiram de forma novamente oposta, ou seja, os íons de Al impediram que uma possível resposta de recuperação ocorresse nesse período, tal como no grupo Mn. Em relação ao T₄, pode-se dizer que os mesmos efeitos ocorreram em todas as condições de exposição, indicando uma interação aditiva entre os íons de Al e de Mn no grupo Sin, uma vez que os efeitos da exposição isolada foram os mesmos encontrados na exposição sincrônica.

Os peixes expostos ao Al demonstraram uma possível resposta de modulação endócrina, a qual não pôde ser avaliada quanto ao seu limiar devido às condições de exposição a este metal delineadas neste estudo. O T₃ e o T₄ aparentemente desempenharam um papel nesta modulação endócrina decorrente da aclimação e tolerância dos peixes a este metal.

Embora incoerências tenham sido associadas ao E₂ e à 17 α OHP decorrentes da exposição ao Al, seria imprudente sugerir um provável efeito inócuo deste metal sobre estes hormônios, haja vista as consequências negativas registradas sobre a fecundidade, fato que pode estar associado a considerável capacidade de bioconcentração demonstrada por este metal que nem mesmo possui função biológica conhecida. E, além disso, o Al já foi classificado como desregulador endócrino em outras espécies de teleósteos (Correia, 2008; Narcizo, 2009; Correia *et al.*, 2010; Narcizo e Moreira, 2012).

Com relação ao Mn, diante dos resultados deste estudo, este metal pode ser considerado um desregulador endócrino antiesteroideogênico, por impor uma diminuição na concentração plasmática do progestágeno 17 α OHP que é o precursor do hormônio da maturação final e desova em teleósteos. Entretanto, a espécie em questão A.

bimaculatus mostrou-se hábil em se recuperar destes efeitos após permanecer em água limpa por um período de tempo igual ao que permaneceu exposta a este metal, o que permite inferir que os efeitos da concentração do Mn apresentados neste estudo, considerando-se este hormônio, podem ser considerados temporários.

Por fim, a exposição aquática ao Al e ao Mn de forma sincrônica está sujeita a diversas possibilidades de interações entre estes íons, o que acarretou em imprevisíveis e distintas respostas endócrinas nas fêmeas de *A. bimaculatus* e está relacionada à capacidade de recuperação dos efeitos tóxicos nesta espécie. Considera-se que estas respostas, principalmente endócrinas devam ser avaliadas em machos e juvenis desta espécie, para uma compreensão mais consistente que possa ser analisada conjuntamente com os postulados da ecotoxicologia e premissas básicas que envolvem este tipo de pesquisa.

2 – Referências bibliográficas

- Canli, M., Atli, G. 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution* 121, 129 – 136.
- Keinanen, M., Tigerstedt, C., Peuranen, S., Vuorinen, P. J. 2004. The susceptibility of early developmental phases of an acid-tolerant and acid-sensitive fish species to acidity and aluminum. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 160 – 172.
- Narcizo, A. M., Moreira, R. G. 2012. Aluminum as blocker response of ovarian steroids of *Oreochromis niloticus*. In: 10th International Congress on the Biology of Fish, Madison. Abstracts, 2012 p93.
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W., Fitzpatrick, M. S. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197, 3–24.
- Vuorinen, P. J., Keinanen, M., Seppo, P And Tigerstedt, C. 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula L.*) in long – term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54, 255 – 276.
- Zagatto, A. P.; Bertoletti, E. (Eds). 2006. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima. 478p

ANEXOS

Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH

Beliehene gemäß § 8 Absatz 1 AkkStelleG i.V.m. § 1 Absatz 1 AkkStelleGBV
Unterzeichnerin der Multilateralen Abkommen
von EA, ILAC und IAF zur gegenseitigen Anerkennung

Akkreditierung

Die Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH bestätigt hiermit, dass das Prüflaboratorium

görtler analytical services gmbh
Johann-Sebastian-Bach-Straße 40, 85591 Vaterstetten

die Kompetenz nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 besitzt, Prüfungen in folgenden Bereichen durchzuführen:

physikalische, physikalisch-chemische und chemische Untersuchungen von Wasser, Trinkwasser, natürlichem Mineralwasser, Heilwasser, Tafelwasser, Quellwasser, Abwasser, Sickerwasser, Schlämmen, Klärschlamm, Sedimenten, Abfall, Kompost, Stoffen zur Verwertung, Böden und kontaminierten Böden; chemische und sensorische Untersuchung von Trinkwasser nach Anlage 2 und 3 der Trinkwasserverordnung: 2001 ohne radiologische Parameter; physikalisch-chemische und chemische Untersuchungen von Bodenluft und Gasen; ausgewählte Schnelltests zur Wasseruntersuchung mit Fertigreagenzien; ausgewählte Untersuchungen von Raumluft, Mineralölen, Brennstoffen, Bioabfall, Futtermitteln, Kosmetika, pharmakologisch wirksamen Stoffen, Lebensmitteln und textilen Bedarfsgegenständen; Untersuchung auf Holzschutzmittel, Pflanzenbehandlungsmittel und rüstungsspezifische Altlasten sowie Rückstandsanalytik; chemische Untersuchungen für das Schadstoff-Monitoring in Fischen; Untersuchungen auf Toxine in Lebensmitteln und Futtermitteln; Untersuchung auf Pestizide in Lebensmitteln; Untersuchung auf Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln und Umweltproben; Probenahme von Wasser, Abwasser, Roh- und Trinkwasser, Wasser aus stehenden Gewässern, Fließgewässern, Quellwässern, Schwimm- und Badebeckenwasser; Probenahme von Abfall zur Ablagerung; Fachmodule Wasser, Boden und Altlasten sowie Abfall

Die Akkreditierungsurkunde gilt nur in Verbindung mit dem Bescheid vom 25.01.2012 mit der Akkreditierungsnummer D-PL-14282-01 und ist gültig bis 24.01.2017. Sie besteht aus diesem Deckblatt, der Rückseite des Deckblatts und der folgenden Anlage mit insgesamt 65 Seiten.

Registrierungsnummer der Urkunde: **D-PL-14282-01-00**

Im Auftrag

Andrea Valbuena
Abteilungsleiterin

Berlin, 25.01.2012

Siehe Hinweise auf der Rückseite

Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH

Standort Berlin
Spittelmarkt 10
10117 Berlin

Standort Frankfurt am Main
Gartenstraße 6
60594 Frankfurt am Main

Standort Braunschweig
Bundesallee 100
38116 Braunschweig

Die auszugsweise Veröffentlichung der Akkreditierungsurkunde bedarf der vorherigen schriftlichen Zustimmung der Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH (DAkKS). Ausgenommen davon ist die separate Weiterverbreitung des Deckblattes durch die umseitig genannte Konformitätsbewertungsstelle in unveränderter Form.

Es darf nicht der Anschein erweckt werden, dass sich die Akkreditierung auch auf Bereiche erstreckt, die über den durch die DAkKS bestätigten Akkreditierungsbereich hinausgehen.

Die Akkreditierung erfolgte gemäß des Gesetzes über die Akkreditierungsstelle (AkkStelleG) vom 31. Juli 2009 (BGBl. I S. 2625) sowie der Verordnung (EG) Nr. 765/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. Juli 2008 über die Vorschriften für die Akkreditierung und Marktüberwachung im Zusammenhang mit der Vermarktung von Produkten (Abl. L 218 vom 9. Juli 2008, S. 30).

Die DAkKS ist Unterzeichnerin der Multilateralen Abkommen zur gegenseitigen Anerkennung der European co-operation for Accreditation (EA), des International Accreditation Forum (IAF) und der International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). Die Unterzeichner dieser Abkommen erkennen ihre Akkreditierungen gegenseitig an.

Der aktuelle Stand der Mitgliedschaft kann folgenden Webseiten entnommen werden:

EA: www.european-accreditation.org

ILAC: www.ilac.org

IAF: www.iaf.nu

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro

Coordenação Geral de Acreditação

Signatário dos Acordos de Reconhecimento Mútuo da International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC),
da Interamerican Accreditation Cooperation (IAAC)

Certificado de Acreditação

Acreditação nº CRL 0167

Acreditação inicial: 17-3-2004

LABORATÓRIO DE ENSAIOS EM AMBIENTAL
NOVA AMBI SERVIÇOS ANALÍTICOS LTDA
RUA SEBASTIÃO EUGÊNIO DE CAMARGO, 59 – BUTANTÃ
SÃO PAULO – SP

A Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro concede acreditação ao Laboratório acima
identificado, segundo os requisitos estabelecidos na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Esta acreditação
constitui a expressão formal do reconhecimento da sua competência para realizar os ensaios
constantes no Escopo de Acreditação.

Emissão: 02-02-2012

Marcos Aurélio Lima de Oliveira
Coordenador Geral de Acreditação

Validade: 17-03-2016