Raisa Pereira Abdalla

Efeito do alumínio e manganês, em pH ácido,
nos parâmetros de estresse oxidativo em
machos de *Astyanax altiparanae*
(Characiformes: Characidae)

Effect aluminum and manganese, in acidic pH,
on the oxidative stress parameters of *Astyanax*
altiparanae males (Characiformes:
Characidae)

São Paulo

2015

Raisa Pereira Abdalla

Efeito do alumínio e manganês, em pH ácido,
nos parâmetros de estresse oxidativo em
machos de *Astyanax altiparanae*
(Characiformes: Characidae)

Effect aluminum and manganese, in acidic pH,
on the oxidative stress parameters of *Astyanax*
altiparanae males (Characiformes:
Characidae)

VERSÃO CORRIGIDA

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

Orientadora: Renata Guimarães
Moreira Whitton

São Paulo

2015

Abdalla, Raísa

Efeito do alumínio e manganês, em pH ácido, nos
parâmetros de estresse oxidativo em machos de
Astyanax altiparanae (Characiformes: Characidae)

60p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia.

1. Estresse oxidativo
2. Peixes
3. Biomarcadores

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 Renata Guimarães Moreira Whitton
Orientadora

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade, é saber que os outros creem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos...”

Albert Einstein

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Fisiologia.

À CAPES pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

À CESP de Paraibuna pela disponibilização dos animais para o estudo realizado neste trabalho.

À Profa. Renata Guimarães Moreira Whitton pela orientação, compreensão, incentivo, paciência e confiança, acreditando no meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço também pela grande amizade construída, que levarei por toda a minha vida.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial à Profa. Cláudia Martinez, Juliana Delatim, Luciana de Oliveira, Bruna Lunardelli, Carlos Eduardo Vieira, Natara Dias, Angélica Tronco e a todo Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) pela contribuição e colaboração com este trabalho, além de todo suporte para que eu permanecesse na cidade de Londrina e conseguisse realizar todas as análises.

À Universidade Federal de São Carlos, em especial à Profa. Marisa Fernandes e Vinícius Azevedo pela colaboração com este trabalho, por todo o ensinamento e paciência.

Ao LAMEROA: Aline Dal'Olio, Amanda Narcizo, Andreone Medrado, Bianca Kida, Bruno Araújo, Carlos Eduardo Garcia, Carlos Eduardo Tolussi, Cristiéle Ribeiro, Gabriela Brambila, Jandyr Rodrigues Filho, Mariana Frias, Paulo Mello, Renato Honji, Roberta Mourão, Tiago Correia, Vanessa Vieira, Walquíria Pedra, pelo companheirismo, por todo auxílio disponibilizado para realização deste trabalho e pelos momentos de descontração que são sempre muito especiais ao lado de todos vocês.

E em especial à Bianca Kida, que esteve presente durante toda a elaboração e realização deste trabalho, pela paciência em explicar várias vezes sobre o mesmo assunto, pelo companheirismo nos experimentos e pelos momentos ruins e bons de descontração que passamos juntas, que com certeza fortaleceram nossa amizade. À Gabriela Brambila que apareceu como um suporte nos experimentos e hoje é uma amiga muito especial e de todas as horas. Ao Andreone Medrado, por toda a estrutura disponibilizada no biotério, facilitando o nosso trabalho. Ao Juan Fernández, por ter disponibilizado um pouco do seu tempo para nos explicar ferramentas importantes da estatística neste trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Biociências e do Departamento de Fisiologia por todo suporte prestado ao longo dos anos, pela preocupação com os alunos e acompanhamento de todos os processos.

Aos alunos do Departamento de Fisiologia, principalmente aqueles que juntamente comigo, participaram da PROAP e do Curso de Inverno - Tópicos em Fisiologia Comparada, que apesar das dificuldades, sempre conseguimos solucionar os problemas e trabalharmos em equipe.

A minha família, minha mãe Tânia Mendes, meu pai João Mendes, meus irmãos, meu avós, que estiveram sempre do meu lado, me dando suporte nos momentos ruins, e tornando ainda mais alegres os momentos bons. Obrigada por acreditarem no meu potencial e terem disponibilizado recursos para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos, tanto de Paraguaçu Paulista como de São Paulo, por acompanharem os meus projetos profissionais e sempre estarem ao meu lado.

Índice

Resumo	09
Abstract	10
1. Introdução	11
1.1. A Ecotoxicologia e a contaminação aquática	11
1.2. Os metais e seus efeitos sobre fisiologia dos peixes	13
1.3. Biomarcadores e bioindicadores	15
1.4. O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes	17
1.5. O papel das brânquias e do fígado na detoxificação	19
1.6. <i>Astyanax altiparanae</i>	21
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. Material e Métodos	23
3.1. Delineamento experimental	23
3.2. Condições experimentais e análise química da água	25
3.3. Coleta de Amostras	26
3.4. Análise enzimática	26
3.4.1 Catalase	26
3.4.2 Superóxido Dismutase	27
3.4.3 Glutathione Peroxidase	27
3.4.4 Tripeptídeo Glutathione	27
3.4.5 Glutathione S-transferase	27
3.4.6 Glutathione Redutase	27
3.4.7 Peroxidação Lipídica	27
3.4.8 Metalotioneína	28
3.4.9 Proteínas	28
3.5. Análises Histológicas	28
3.6. Análises Estatísticas	28
4. Resultados	30
4.1. Análise físico-química da água	30
4.2. Estádio de maturação de <i>Astyanax altiparanae</i>	34
4.3. Análise dos parâmetros do estresse oxidativo:	
hepática e branquial	36
4.3.1. Análises Hepáticas	38
4.3.2. Análises Branquiais	49

5. Discussão	40
5.1. Análise físico-química da água	40
5.2. Análises do estresse oxidativo: hepática e branquial	41
6. Conclusões	49
7. Considerações Gerais Finais	49
8. Referências bibliográficas	51

Resumo

Muitos metais como alumínio e manganês, quando adicionados nas águas pela atividade antrópica, podem produzir efeitos deletérios nos organismos. Estes metais causam alterações no sistema fisiológico, como alterações metabólicas, respiratórias, além de serem capazes de aumentar a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), o que podem alterar a atividade das enzimas antioxidantes que atuam no estresse oxidativo. O presente estudo investigou se a exposição aguda por 24 e 96 horas ao alumínio (Al) e manganês (Mn) em pH ácido, de forma isolada ou combinada (Al+Mn), são capazes de causar estresse oxidativo em machos sexualmente maduros de *Astyanax altiparanae*, e também verificou se 96 horas em água livre de metais, eram suficientes para que estes animais se recuperassem dos possíveis efeitos deletérios destes metais. O pH ácido alterou os níveis da atividade da SOD branquial no período agudo (96h) e não se retornou aos níveis do controle no período de recuperação. O Al aumentou a concentração de GSH (24h) nas brânquias no período agudo, retornando aos níveis do controle (96h). O Mn não alterou os níveis dos parâmetros de defesas estudados, no entanto isso ocasionou ao aumento de MDA nas células, acarretando em peroxidação lipídica. O grupo Al+Mn apresentou diversas variações, aumentando a concentração de GSH e GPx no período agudo (24h) nas brânquias. Apesar da tentativa de defesa no período agudo, o período de recuperação apresentou alterações nos níveis de catalase no fígado (96h), aumento da metaloteoneína (24h), altos níveis de lipoperoxidação (96h). Os metais estudados, independentemente da água em pH ácido, podem ser considerados indutores do estresse oxidativo em machos de *A. altiparanae*, influenciando na atividade enzimática e ocasionando alterações fisiológicas que podem interferir na reprodução. Os resultados obtidos no presente estudo ajudarão a entender os mecanismos de estresse oxidativo em machos de *A. altiparanae* induzido pelos metais (Al e Mn) e sua possível influência na reprodução.

Abstract

Many metals such as aluminum and manganese, when added in the waters by human activity, can produce deleterious effects on organisms. These metals cause changes in the physiological system, such as metabolic, respiratory disorders, as well as being able to increase the production of reactive oxygen species (ROS), which can alter the activity of antioxidant enzymes that act on oxidative stress. This study investigated whether acute exposure for 24 and 96 hours to aluminum (Al) and manganese (Mn) in acidic pH, in isolation or in combination (Al + Mn), are capable of causing oxidative stress in sexually mature males of *Astyanax altiparanae*, and also there is 96 hour free metal water was sufficient for these animals to recover from the possible deleterious effects of these metals. The acidic pH altered levels of gill SOD activity in the acute period (96 hours) and not returned to control levels in the recovery period. Al increased the concentration of GSH (24) in the gills in the acute period, returning to control levels (96h). The Mn has altered levels of the studied defense parameters, however this led to an increase in MDA cells, resulting in lipid peroxidation. The Al + Mn group presented several variations, increasing the concentration of GSH and GPx in the acute period (24) in the gills. Despite the defense attempt in the acute period, the recovery period showed changes in catalase levels in the liver (96h), increased metallothionein (24), high levels of lipid peroxidation (96h). The metals studied, irrespective of water at acid pH, they can be considered inducing oxidative stress in male *A. altiparanae* influencing enzyme activity and causing physiological changes that can interfere with reproduction. The results obtained in this study will help to understand the mechanisms of oxidative stress in males of *A. altiparanae* induced by metals (Al and Mn) and its effect on reproduction.

1. Introdução

1.1 A Ecotoxicologia e a contaminação aquática

Com a crescente interferência do homem sobre os recursos naturais, observa-se um aumento da carga de efluentes lançadas no ar, no solo e na água, tendo como consequência o aumento da poluição e da contaminação no ambiente (Zagatto & Bertoletti, 2006). O ecossistema aquático é considerado o mais susceptível à contaminação (Bertoletti, 1990), a qual está comumente associada à descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas (Mason, 1996), podendo ocorrer de forma intencional ou acidental a partir de fontes naturais, ou em decorrência da atividade humana (Qu *et al.*, 2014).

A avaliação dos efeitos desses contaminantes nos ecossistemas aquáticos vem sendo alvo de várias pesquisas na área da ecotoxicologia, que é 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 assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado” (Plaa, 1982; Farrel *et al.*, 2011). Os peixes são considerados modelos interessantes para estudos na ecotoxicologia. Estes animais representam grande parte das espécies de água doce e marinha, com capacidade de adaptação às variações ambientais, além de estarem submetidos a estresses químicos que podem ocasionar alterações em diferentes órgãos (Bouraoui, 2008).

Os estudos em ecotoxicologia aquática podem ser qualitativos e quantitativos em relação aos efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos. Estes efeitos podem incluir efeitos subletais, como alterações no crescimento, reprodução, desenvolvimento, patologia, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais, acarretando em alta taxa de mortalidade. A toxicologia aquática também está relacionada com as concentrações, quantidades, tempo de exposição, suscetibilidade do organismo, características químicas, entre outras propriedades dos agentes químicos que podem ocorrer no ambiente aquático (água, sedimento ou alimento) (Farrel *et al.*, 2011).

O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) determina concentrações aceitáveis de diversas substâncias encontradas nas águas, bem como determina que, quando apropriado, a qualidade dos ambientes aquáticos pode ser avaliada por análises

da água ou por indicadores biológicos, utilizando-se organismos e comunidades aquáticas (CONAMA n° 357, 2005).

Diante dessa problemática, o Estado de São Paulo realiza um monitoramento anual dos índices das substâncias nos recursos hídricos pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), refletindo a realidade dos níveis de poluição de cada rio. Os resultados desconformes com os padrões de qualidade, estabelecidos pela Resolução CONAMA n° 357(2005), em relação a 2013 e ao período de 2008 a 2012 (Figura 1). De forma a se obter uma visão geral da sua qualidade, adotaram-se os padrões da Classe 2 (água para abastecimento do consumo humano, após tratamento), uma vez que cerca de 70% dos corpos d'água, monitorados pela CETESB no Estado de São Paulo, estão assim classificados. Constam na Figura 1 as variáveis que foram determinadas em todos os pontos da Rede Básica, exceto o número de células de Cianobactérias, Toxicidade Crônica (ensaio Ecotoxicológico com *Ceriodaphnia dubia*) e *Clorofila a*, que possuem resultados em 11%, 75% e 78% dos pontos, respectivamente. Ressalta-se que o número de pontos e a frequência anual de cada variável não são semelhantes.

Figura 1. Porcentagens de resultados em não conformidade na Rede Básica com relação aos padrões estabelecidos para a Classe 2 (Resolução CONAMA n° 357/05), em 2013 e no período de 2008 a 2012. Fonte: CETESB (2013).

Os resultados acima demonstram que grande parte dos parâmetros monitorados estão desconformes com a legislação, como por exemplo, o manganês e o alumínio, que deveriam apresentar a concentração máxima de 0,1mg/L cada. Dessa forma, entende-se

que é de extrema importância que sejam realizados estudos adicionais a fim de se obter um conhecimento abrangente sobre a situação destes corpos d'água, bem como estas substâncias afetam a biota e os animais presentes.

1.2 Os metais e seus efeitos sobre a fisiologia dos peixes

Os metais ocorrem em baixas concentrações nos sistemas aquáticos naturais (Biney *et al.*, 1994; Farrel *et al.*, 2011). Esses metais incluem elementos essenciais como cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), cobalto (Co), iodo (I), ou seja, requeridos em pequenas quantidades nos processos fisiológicos, constituintes obrigatórios do metabolismo, participando de processos envolvendo compostos enzimáticos, fazendo parte do sistema aceptor/doador de elétrons, dentre outros processos. No entanto, mesmo elementos com função biológica conhecida, quando em grandes concentrações, podem apresentar toxicidade aos organismos (Farrel *et al.*, 2011).

Já os metais não essenciais como cádmio (Cd), mercúrio (Hg), chumbo (Pb), alumínio (Al), ainda não possuem função biológica conhecida (Heath, 1995; Qu *et al.*, 2014) e, portanto podem ser extremamente tóxicos aos organismos, ocasionando uma série de distúrbios, tais como baixa fertilidade, diminuição nas defesas imunológicas, desnaturação de proteínas, inativação de enzimas, redução da taxa de crescimento e doenças que podem levar à morte dos indivíduos (Bainy *et al.*, 1998).

As atividades antrópicas têm elevado a biodisponibilidade destes elementos para níveis extremamente prejudiciais, já que a industrialização dos processos de produção tornou-se maciça e na maioria dos casos sem qualquer atenção aos princípios de redução ao mínimo de resíduos gerados (Biney *et al.*, 1994). Segundo os dados apresentados na Figura 1, os metais Al e Mn apresentaram, em vários pontos analisados, valores que excedem os permitidos pelo padrão CONAMA n° 357 (2005).

Para a compreensão dos efeitos dos metais, são fundamentais os estudos de assimilação e acúmulo destes poluentes em organismos aquáticos. O termo biodisponibilidade varia consideravelmente e é normalmente específico em certas situações. Porém, uma definição genérica é a relativa facilidade com que o agente químico é transferido do ambiente a uma localidade específica do organismo de interesse. Ou seja, a biodisponibilidade, entre outros fatores, é diretamente influenciada pela forma química do componente avaliado. Entre estes fatores que influenciam a

disponibilidade estão o pH, a dureza, a temperatura e a capacidade complexante do metal (Wang *et al.*, 2015).

O Al se torna tóxico em águas acidificadas, bem como quando encontrado em altas concentrações, tornando-se biodisponível para os organismos (Fernandez *et al.*, 2012). O Al possui uma grande abrangência na crosta terrestre (Poléo *et al.*, 1995), no entanto até o presente momento não se conhece nenhuma função biológica para esse metal (Nayak, 2002). Já o Mn, ao contrário do Al, possui função biológica conhecida, participando na manutenção da homeostase e participando de diversos processos biológicos como metabolismo, cofator enzimático e na reprodução (Prestifilippo *et al.*, 2007). Porém, em altas concentrações este metal pode afetar negativamente os organismos, causando alterações na ionorregulação e osmorregulação, alterações metabólicas (Partridge & Lymbery, 2009), assim como causar a lipoperoxidação e o estresse oxidativo (Almeida *et al.*, 2002).

Estes metais apresentam afinidade por moléculas contendo átomos de nitrogênio e enxofre, ligando-se com relativa facilidade a proteínas e macromoléculas celulares. Assim, sua toxicidade se deve principalmente à sua capacidade de interferir em reações enzimáticas (bloqueando, deslocando o íon essencial ou modificando a conformação ativa de biomoléculas como proteínas e enzimas) e também sua baixa mobilidade, em virtude das pequenas dimensões e das cargas duplas e triplas. Essa fraca mobilidade faz com que se acumulem, modificando profundamente o metabolismo do organismo (Qu *et al.*, 2014).

Quando expostos à esses metais em altas concentrações, os peixes podem acentuar a formação das espécies reativas de oxigênio (ERO). Dessa forma, os organismos aquáticos desenvolveram uma variedade de mecanismos para se proteger dos efeitos tóxicos, já que estes podem vir a causar estresse oxidativo, prejudicando a saúde e a sobrevivência destes organismos (Almeida *et al.*, 2002; Oakes & Van Der Kraak, 2003; Dautremepuits *et al.*, 2004).

1.3 Bioindicadores e biomarcadores

Para avaliar os efeitos dos poluentes, como os metais, foram definidas ferramentas para um monitoramento adequado, que auxiliam no entendimento das consequências na biota, como os bioindicadores, que são definidos como organismos que fornecem informações sobre as condições ambientais de seu habitat, seja pela presença ou ausência, pelo comportamento (Van Gestel & Van Brummelen, 1996; Van der Oost *et al.*, 2003) ou por alterações em funções vitais e/ou composição química frente à presença de contaminantes (Fernandez *et al.*, 2012). A utilização de bioindicadores é sugerida por legislações, como o CONAMA nº 357/05, que determina que a qualidade dos ambientes aquáticos seja avaliada por indicadores biológicos, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas como instrumentos para monitorar e avaliar a situação de corpos d'água.

A utilização de alguns parâmetros fisiológicos e morfológicos pode ser uma ferramenta útil para a avaliação dos efeitos da contaminação ambiental nas populações de peixes. Muitas das variáveis biológicas podem ser alteradas como consequência da interação entre o agente químico e o organismo; entretanto, a determinação quantitativa desses parâmetros pode ser usada como biomarcador somente se existir uma correlação com a intensidade da exposição e/ou com o efeito biológico da substância. Biomarcadores são alterações biológicas nos fluídos corporais, células ou tecidos indicativos da exposição a concentrações subletais de poluentes ambientais, detectadas em nível molecular, celular e fisiológico (Farrel *et al.*, 2011).

Os biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas modernos de monitoramento ambiental de países desenvolvidos. Esta interação entre o sistema biológico, biomarcadores e poluentes está intimamente associada à biodisponibilidade dos contaminantes. Isto porque ele pode estar associado à matéria orgânica dissolvida, particulada e ao sedimento. Assim, sua concentração disponível é muito variável, e afetará o organismo através da relação entre sua taxa de captação e eliminação. (Stegeman *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1996; Amorim, 2003).

Os efeitos diretos destes contaminantes ocorrem através de interações com proteínas receptoras celulares, distúrbios na homeostase celular, inibição enzimática, danos a macromoléculas, entre outros. O organismo então é capaz de responder, inicialmente em nível molecular e celular, a fim de evitar ou diminuir o efeito tóxico

destes contaminantes através de respostas adaptativas. Caso estas respostas não sejam suficientes, poderá ocasionar diminuição no crescimento, redução da fertilidade e reprodução, distúrbios funcionais, mutação, câncer, distúrbios comportamentais ou a morte. Entretanto, o total ajuste pode ser alcançado caso as respostas desenvolvidas pelos organismos sejam eficientes para contrabalancear os distúrbios causados pelo poluente (Fernandez *et al.*, 2012; Farrel *et al.*, 2011).

Uma vez que contaminantes podem gerar alterações em vários níveis de organização biológicas existem diversos tipos de biomarcadores que podem ser utilizados para determinar a ação de um contaminante (Bouraoui, 2008). Dentre eles, os biomarcadores morfológicos e bioquímicos tem grande destaque na literatura (Farrel *et al.*, 2011). O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento oferece algumas vantagens porque são normalmente os primeiros a serem detectados, são bastante sensíveis à presença de determinados poluentes, fornecem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo xenobiótico e apresentam alta especificidade (Stegeman *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1996; Amorim, 2003).

Quando um xenobiótico entra no organismo, no caso dos teleósteos, mais comumente pelas brânquias, este é transportado via corrente sanguínea até os órgãos, onde são armazenados ou metabolizados para sua eliminação. Como alguns dos xenobióticos possuem propriedade lipofílica, possuem grande capacidade de atravessar as membranas biológicas, podendo causar danos aos componentes celulares (Paulino *et al.*, 2012). O organismo tem duas maneiras principais de eliminar um composto xenobiótico, podendo excretá-lo em sua forma original; ou através da biotransformação, que geralmente leva à formação de compostos mais hidrofílicos que são mais facilmente eliminados pelo organismo (Jobling & Sumpter, 1995; Van Der Oost *et al.*, 2003; Camargo & Martinez, 2006).

A biotransformação de xenobióticos é um processo que envolve sistemas enzimáticos e consiste na alteração estrutural de um composto químico com caráter lipofílico em hidrofílico. Este processo não se restringe a biotransformação de xenobióticos, uma vez que também exerce papel importante na transformação de compostos endógenos como os esteroides, ácidos biliares e ácidos graxos (Di Giulio *et al.*, 1995). Porém é preciso realçar que nem sempre os produtos metabólicos gerados são de menor toxicidade, podendo estes se apresentarem mais tóxicos que o composto original (Van der Oost *et al.*, 2003).

1.4 O Estresse Oxidativo e as Defesas Antioxidantes

O processo de metabolização de xenobióticos é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio, que correspondem aos produtos da redução do oxigênio molecular, como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As espécies reativas de oxigênio passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou diminuição de agentes antioxidantes. Em qualquer uma dessas situações, existe a predominância de EROs no organismo, o que é denominado estresse oxidativo. Essa situação pode derivar tanto de fatores internos como de fatores externos (Stegeman *et al.*, 1992). EROs são compostos que apresentam alta reatividade, podendo ser radicais, quando o átomo de oxigênio associado ou não a outro elemento possui um ou mais elétrons desemparelhados como no caso da hidroxil ($OH^{\cdot}$), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical peroxil ($ROO^{\cdot}$) e alcóxila ($ROH^{\cdot}$), ou o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que possui alta reatividade (Halliwell & Gutteridge, 1990). Para combater essas espécies reativas de oxigênio existe um sistema de defesa antioxidante, composto por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), todas elas abundantes nos tecidos de peixes (Storey, 1996; Van Der Oost *et al.*, 2003; Farrel *et al.*, 2011).

O radical superóxido é a primeira ERO formada, podendo agir como oxidante ou como redutor, dando origem a outras espécies reativas (Fridovich, 1989; Wang *et al.*, 2015). Existem várias vias metabólicas onde este radical é formado, como por exemplo, a cadeia respiratória na mitocôndria, o sistema xantina/oxidase, através da NADPH oxidase em células fagocíticas, via síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema P-450 (Ribeiro *et al.*, 2005). Apesar do radical superóxido ser seletivamente reativo, ele é responsável pela geração de outras espécies reativas mais tóxicas e agressivas. Esse radical pode gerar peróxido de hidrogênio através de uma reação espontânea ou catalisada pela SOD, e pode gerar também o radical hidroxila através da reação de Fenton, na qual o ânion superóxido reduz principalmente o cobre e o ferro, que por sua vez reagem com o peróxido de hidrogênio formando o radical hidroxila. (Sies, 1985; Ribeiro *et al.*, 2005).

A Catalase (CAT) não necessita consumir equivalente redutores celulares para remover o H_2O_2 formado nas células sob condições de estresse, se mostrando um

mecanismo muito eficiente para impedir a formação de EROs. Esta enzima se localiza principalmente nos peroxissomos e a proliferação peroxissômica resulta na elevação da atividade catalásica nos tecidos (Halliwell & Gutteridge, 2005).

A principal peroxidase em peixes é a glutathione peroxidase (GPx), uma enzima citosólica tetramérica, dependente de selênio, que possui a glutathione reduzida (GSH) como cofator. A GPx catalisa o metabolismo da H_2O_2 e de um grande número de hidroperóxidos orgânicos (ROOH), envolvendo a oxidação concomitante da GSH para sua forma oxidada (GSSG). A enzima glutathione-S-transferase (GST) também envolve reações de conjugação na presença da GSH, no entanto ela desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos, incluindo agroquímicos. Assim, animais aquáticos que habitam ambientes poluídos podem estar expostos a xenobióticos os quais sofrem detoxificação mediada pela glutathione na sua forma reduzida, catalisada pela enzima GST (Qu *et al.*, 2014).

A GSH está envolvida em vários processos fisiológicos como degradar peróxidos endógenos, participar no transporte de aminoácidos e detoxificação de toxinas, formar moléculas bioativas e atuar como coenzima em várias reações enzimáticas (Stamler & Slivka, 1996). A GSH participa ainda na decomposição do H_2O_2 , potencialmente tóxico, que é convertido em H_2O em reação catalisada pela GPx, oxidando a glutathione reduzida; a glutathione oxidada resultante é reciclada à forma reduzida pela glutathione redutase e NADPH (Bouraoui, 2008). Dessa forma, este processo de reciclagem e a manutenção de níveis adequados de GSH podem prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (Stamler & Slivka, 1996).

Já é conhecido que os vertebrados, quando expostos a metais, induzem a síntese de um tipo particular de proteína, as metalotioneínas (MTs). Estas proteínas compreendem uma família de baixo peso molecular, ricas em cisteína que tem como propriedades fundamentais a detoxificação de metais, proteção celular contra a citotoxicidade da radiação ionizante e captura de radicais livres. Estas proteínas possuem uma elevada afinidade por íons metálicos. A sua principal função está relacionada com a regulação das concentrações intracelulares de metais essenciais, bem como, reserva intracelular de íons para o metabolismo de ácidos nucleicos, síntese de proteínas e outros processos metabólicos (Wang *et al.*, 2015).

Em longo prazo, de acordo com o agente estressor e tempo de exposição, as defesas antioxidantes podem não ser suficientes para impedir consequências no organismo, como danos a macromoléculas, redução na capacidade reprodutiva ou

tolerância aos fatores de estresse e lipoperoxidação. A peroxidação lipídica é um processo regular no organismo, responsável pela manutenção celular e mobilização de lipídios. Porém, determinados contaminantes podem potencializar os efeitos deletérios, resultando no mau funcionamento celular, destruição da função das membranas celulares e organelas essenciais tais como o processo de transporte, a manutenção de gradiente de metabólitos e íons, e a transdução de sinais mediada por receptores, com consequentes modificações estruturais dos complexos lipoproteicos das membranas celulares (Mason, 1996; Girotti, 1998; Baker & Kramer, 1999). Além de danos a membrana, esse processo também induz à formação de novas espécies reativas de oxigênio, acarretando danos ainda maiores no organismo (Girotti, 2002; Wang *et al.*, 2015).

1.5 O papel das brânquias e do fígado na detoxificação

Durante todo o processo de contaminação, desde o contato dos peixes com o meio enriquecido com metais (absorção) até a excreção, vários processos bioquímicos e fisiológicos são alterados como forma de atenuar os efeitos causados pela presença de metais nos organismos (Heath, 1995). Um exemplo clássico desses efeitos é a hipersecreção de muco nas brânquias e pele (Lichtenfels *et al.*, 1996). Distúrbios no comportamento, na regulação iônica, nos parâmetros hematológicos e danos histopatológicos entre outros são frequentemente observados em peixes expostos a metais (Heath, 1995).

As brânquias atuam como órgão alvo dos peixes quando são avaliados os impactos dos poluentes, justificado pelo fato de estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma área superficial muito grande, representada pelas lamelas. As brânquias exercem funções vitais nos teleósteos, tais como respiração, osmorregulação e excreção e ainda constituem o sítio de tomada e depuração de contaminantes e o local onde a detoxificação e o metabolismo destes agentes tóxicos, podem ocorrer (Fernandes *et al.*, 2003).

As brânquias dos teleósteos são evolutivamente o primeiro órgão de trocas gasosas dos vertebrados e consiste essencialmente por filamentos, lamelas, uma vascularização altamente complexa (sistema artério-arterial e sistema artério-venoso), um sistema de suporte (cartilagens e ossos) e músculos envolvidos por um epitélio que proporciona uma fina barreira entre o sangue e ambiente aquático. Na maior parte dos

peixes, os filamentos branquiais são projeções longas e estreitas laterais ao arco branquial e as lamelas, que constituem a superfície respiratória, estão uniformemente distribuídas ao longo do comprimento dos filamentos, formando os espaços interlamelares através dos quais a água flui (Evans *et al.*, 2005).

A exposição aos poluentes podem causar alterações morfológicas nas brânquias, refletindo um impacto gradual no metabolismo e levam às respostas adaptativas ou degenerativas, com consequências importantes na sobrevivência do animal. Em peixes um dos órgãos mais importantes na íono e osmorregulação é a brânquia, sendo importante avaliar e diferenciar os danos induzidos por agentes tóxicos e doenças. Além disso, as brânquias também podem apresentar atividades enzimáticas para combater o estresse oxidativo, como aumento da atividade, principalmente da CAT e SOD (Wang *et al.*, 2015).

Enquanto a brânquia é o órgão de entrada dos poluentes, podendo sofrer consequências e distúrbios na sua função, o fígado é considerado um órgão-alvo e de grande importância para os peixes, pois participa dos processos de biotransformação e eliminação de xenobióticos e, por isso, pode ser utilizado em biomonitoramentos devido à sua alta sensibilidade aos poluentes (Farrel *et al.*, 2011). É o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos e provavelmente também para excreção de metais. Assim, muitos metais e outros xenobióticos se acumulam no fígado, de modo que suas células ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes no meio ambiente ou em outros órgãos do peixe (Heath, 1985). As células hepáticas têm várias funções vitais além da secreção da bile e metabolismo de xenobióticos. Elas apresentam um importante papel no metabolismo das proteínas, lipídios e carboidratos e, além disso, estão envolvidas na hematopoiese e na produção de anticorpos durante o período larval dos peixes. Sobretudo, elas também servem como local de estocagem para alguns nutrientes (Paris-Palacios *et al.*, 2000).

Devido a sua função no metabolismo de xenobióticos e sua sensibilidade à poluentes do ambiente, o fígado tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes por agentes químicos orgânicos e inorgânicos, isso porque a maior atividade das enzimas de detoxificação estão presentes neste órgão (Wang *et al.*, 2015).

1.6 *Astyanax altiparanae*

O *Astyanax altiparanae* (Linnaeus, 1758), conhecido como lambari do rabo amarelo, é uma espécie nativa, ativa e largamente distribuída no território brasileiro, sendo encontrada em grandes grupos habitando rios, lagos e represas em todo o Brasil. É um peixe onívoro e detritívoro, alimentando-se de frutos, sementes e insetos terrestres, vegetais aquáticos, escamas, ovócitos e outros peixes (Sampaio & Almeida, 2009). O lambari possui características como coloração prateada, e nadadeiras amarelas ou pretas; seu corpo é alongado e um pouco comprimido (Figura 2). Possui duas manchas, sendo uma próxima à nadadeira peitoral, com forma ovalada e posição horizontal, e outra em forma de clava, seguindo do pedúnculo caudal à porção mediana do corpo (Sampaio & Almeida, 2009). Seu sucesso reprodutivo se deve à grande gama de táticas reprodutivas, variando de acordo com as condições ambientais, sendo capaz de se ajustar a essas variações. Diversos fatores favorecem os estudos com esta espécie, como ajustes a diferentes habitats, fácil manejo e manutenção em laboratório, além de serem sensíveis às mudanças ambientais, apresentando-se como bons bioindicadores (Sampaio & Almeida, 2009).

Figura 2: Espécime macho de *Astyanax altiparanae* (Linnaeus, 1758).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito dos metais Al e Mn, isolados ou combinados, em pH ácido, nos parâmetros do estresse oxidativo hepáticos e branquiais, em machos adultos e sexualmente maduros de *Astyanax altiparanae*. Considerando os efeitos já conhecidos de alguns metais no estresse oxidativo, levantamos a hipótese de que a exposição ao Al e Mn também possam causar estresse oxidativo, e em consequência distúrbio na atividade das principais enzimas antioxidantes, mas que os níveis de atividade se recuperam em água livre de metais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar através de bioensaios os efeitos da exposição independente e em conjunto dos metais Al e Mn, durante um período de exposição aguda (96h), sobre os parâmetros do estresse oxidativo hepáticos e branquiais;
- Avaliar se os animais são capazes de se recuperar dos efeitos dos metais Al e Mn, quando mantidos na ausência destes, depois de um período agudo de exposição a estes contaminantes metálicos.

3. Materiais e Método

3.1 Delineamento experimental

Machos sexualmente maduros de *A. altiparanae* - Linnaeus (1758) com massa corpórea média de $24,29 \pm 1,17$ g e $11,78 \pm 0,18$ cm de comprimento total ($n = 120$) foram doados pela Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP) (Figura 3), localizada no município de Paraibuna, SP (S 23°24.53,71' W 45°59,82'). Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados no Biotério de Ectotermos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP). Esta espécie representa um componente importante da ictiofauna, e se distribui na América do Sul (Pavanelli & Caramaschi, 1997), incluindo regiões em que ocorre um aumento da concentração de Al e Mn nos rios (CETESB, 2013).

Figura 3: Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna - CESP.

Os animais passaram por um período de sete dias de aclimação, já nas condições do biotério (Figura 4), em 10 tanques de vidro de 40 x 50 x 70 cm (132 L de água/tanque, 2,20 g.L⁻¹ de peixe), com renovação de água (90%) a cada 24 horas e alimentados diariamente com ração comercial extrusada com 32% de proteína bruta. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início do experimento. O fotoperíodo utilizado no experimento, com iluminação artificial do biotério, foi de 13:11 C:E (13 horas de claro, 11 horas de escuro).

Figura 4: Estrutura experimental do biotério do Instituto de Biociências – Departamento de Fisiologia/USP.

Foram determinados cinco grupos experimentais (em duplicatas) para a condução do presente experimento: 1) grupo controle em pH neutro (ctr – n), sendo todos os demais em pH ácido: 2) grupo pH ácido (pH ácido), 3) grupo Al (Al), 4) grupo Mn (Mn) e um 5) grupo com ambos os metais Al+Mn (Al+Mn). O pH neutro e pH ácido refere-se à 7,5 e 5,5 respectivamente.

A solução de Al foi obtida utilizando-se sulfato de alumínio $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (Sigma Aldrich) a partir de uma solução estoque preparada com água Milli-Q, acidificada para pH 2,5 com ácido nítrico (HNO_3) 65% (Suprapur; Merck). Para a solução de Mn utilizou-se sulfato de manganês MnSO_4 (Sigma Aldrich) a partir de uma solução estoque também preparada com água Milli-Q, acidificada para pH 2,5 com HNO_3 65%. Os metais foram mantidos em uma concentração nominal de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ nos grupos 3, 4 e 5 (neste último, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ para cada metal). A concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ foi determinada através de uma média das concentrações dos metais ao longo do rio Tietê, São Paulo.

O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira etapa compreendeu a exposição aguda aos metais por 96 horas, sendo que esta se dividiu em dois momentos: uma coleta após 24 horas e outra coleta após 96 horas de exposição. Na segunda etapa, nomeada como período de recuperação, também de 96 horas, os animais voltaram às condições iniciais, ou seja, água com pH neutro e sem adição de metais, alimentação

normal. Os animais foram coletados após 24 e 96 horas a partir do início da segunda parte do experimento. A troca de água ocorreu diariamente (90% do volume total) (Figura 5).

Figura 5: Esquema do delineamento experimental (Kida, 2014)

3.2 Condições experimentais e análise química da água

A água utilizada, de abastecimento público, foi filtrada com o uso de dois filtros, um mecânico, composto por um filtro de polipropileno (Health do Brasil), e outro de carvão ativado (Aleas) para remover partículas sólidas e para reduzir a matéria orgânica e os eventuais contaminantes químicos. Os parâmetros físicos e químicos da água foram posteriormente avaliados e descritos. O meio experimental foi continuamente aerado, e a temperatura da água (mantida em 25°C com um aquecedor) e a concentração de oxigênio dissolvido (mantido em 7 mg.L⁻¹ com aeradores) foram monitoradas diariamente com uma sonda multiparâmetros (Pro Plus, YSI), utilizada ainda para determinar as concentrações de nitrato (NO₃) e amônio (NH₄). O pH (mantido em diferentes valores, de acordo com o grupo experimental) foi monitorado com um pHmetro digital (Gehaka). As concentrações de Al e Mn foram monitoradas antes e depois da renovação da água (Tabela 1), com um espectrofotômetro de absorção atômica (GBC, AAS 932 Avanta-Plus, IL, EUA) (Figura 6).

Figura 6: Esquema (vista frontal) de estrutura montada para a condução do experimento no Biotério de Ectotérmicos do Departamento de Fisiologia – IB/USP. Legenda: A: Aquários; B: Saída de água; C: Entrada de água; D: armazenamento de água; E: Filtro químico F: Filtro mecânico; G: Bomba de água submersa; H: Bomba de água anfíbia (Kida, 2014).

3.3 Coleta de amostras

Os peixes foram alocados em recipientes e anestesiados com benzocaína (1g.10 L⁻¹ de água). Após a anestesia, cada peixe foi colocado sobre uma cuba de dissecação e o fígado e as brânquias foram coletados, distribuídos em alíquotas e congelados em freezer -80°C até a sua utilização. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 163/2012.

3.4 Análises enzimáticas

As amostras de fígado foram pesadas e homogeneizadas (1:10) em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,0), centrifugadas (20 minutos; 13000 rpm; 4°C) e o sobrenadante separado para as análises dos parâmetros bioquímicos conforme descrito a seguir.

3.4.1. Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada através da velocidade da decomposição de H₂O₂ pela enzima, com leitura em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 240 nm (Beutler *et al.*, 1975).

3.4.2. Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em espectrofotômetro a 550 nm, acompanhando a inibição da taxa de medida da inibição do citocromo c pelo radical superóxido, de acordo com o método descrito em McCord & Fridovich (1969). A atividade da enzima foi expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹, representando a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c.

3.4.3. Glutathione peroxidase

O método Hopkins & Tudhope (1973) estipula que a atividade de glutathione peroxidase (GPx) seja estimada através da oxidação do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) na presença de H₂O₂, em espectrofotômetro a 340 nm.

3.4.4. Tripeptídeo Glutathione

A concentração de glutathione (GSH) foi estimada de acordo com Beutler *et al.* (1963) através da reação da glutathione com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB), que foi quantificado em espectrofluorímetro de microplacas, em 412 nm e expressa em µg de GSH.mg de proteína⁻¹.

3.4.5. Glutathione S-transferase

A complexação da atividade da GSH com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), faz com que seja estimada a concentração de GSH, com leitura em espectrofotômetro a 340 nm (Keen *et al.*, 1976).

3.4.6. Glutathione reductase

A atividade da glutathione reductase (GR) foi determinada indiretamente pela redução do NADPH mediante a presença da glutathione oxidada, em espectrofotômetro a 340 nm (Carlberg & Mannervik, 1975).

3.4.7. Peroxidação Lipídica

A produção do malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais produzidos na peroxidação lipídica. Dessa forma, a lipoperoxidação foi determinada pelo ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), a partir da produção de

malondialdeído (MDA), e quantificado em espectrofluorímetro de microplacas, em 530 nm de acordo com Satoh (1978).

3.4.8. Metaloteoneína

O fígado foi homogeneizado em tampão TRIS-HCL 20 mM com pH 8,6, contendo sacarose 0,5M e β -mercaptoetanol 0,01%, e centrifugado a 12000 g por 20 minutos a 4°C. A concentração das metaloteoneínas foi estimada através da concentração de grupamentos sulfidrilas (Viarengo *et al.*, 1997) e quantificada em espectrofotômetro utilizando-se o reagente de Ellman (NaCl 2M, DTNB 0,43M em tampão fosfato 0,2M e pH 8,0) em 412 nm.

3.4.9. Proteínas

A concentração de proteínas totais é utilizada como referência para expressar a atividade das enzimas. Esta concentração foi utilizada como referência para expressar a atividade das enzimas. A leitura foi feita em 700 nm, utilizando-se como padrão proteico albumina sérica bovina, de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951).

3.5 Análises histológicas

Frações dos testículos foram colocadas em uma solução de resina metacrilato e etanol absoluto (proporção de 1:1) por 2 horas, infiltradas em solução de resina pura por mais sete dias na geladeira. Cortes com 3 μ m de espessura foram obtidos com o auxílio de micrótomo *Leica* RM2255 equipado com navalha de vidro. Os testículos foram corados com hematoxilina-eosina, e ácido periódico de Schiff (PAS) + hematoxilina + Metanil Yellow (Quintero-Hunter *et al.*, 1991). Os cortes preparados foram analisados e documentados, utilizando-se um sistema computadorizado de captura de imagens (microscópio de luz transmitida – *Leica DM 1000*; câmera fotográfica – *Leica DFC 295*; e programa de captura de imagem – *Leica Application Suite Professional, LAS V3.6*).

3.6 Análises estatísticas

Após verificação da normalidade e homogeneidade de variância das amostras, os dados que foram considerados paramétricos foram submetidos ao teste ANOVA (*One way*) seguido do teste Holm-Sidak. Para os dados não paramétricos a ANOVA foi

seguida do teste Student-Newman-Keuls (SNK). Em ambos os testes, foi considerado cada experimento separadamente (24h, 96h período agudo; 24h, 96h período recuperação). Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) e os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Considerou-se que houve recuperação quando os valores da variável analisada dos animais dos tratamentos não apresentaram diferença significativa em relação aos valores dos animais do grupo ctr-n no mesmo período. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa Bioestat (versão 5.3).

4. Resultados

4.1 Análise físico-química da água

Foram monitorados os parâmetros físico-químicos da água, como: $\text{Ca}^{2+} = 8,88 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{Fe} = 0,09 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{SO}_4 = 12 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{PO}_4 = 0,46 \text{ mg.L}^{-1}$, compostos nitrogenados totais = $0,40 \text{ mg.L}^{-1}$, alcalinidade = $15 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$, matéria orgânica = 19%, cloretos = $4,90 \text{ mg.L}^{-1}$, condutividade elétrica (a 25°C) = $65,50 \mu\text{S.cm}^{-1}$, carbono orgânico = $1,3 \text{ mg C. L}^{-1}$, carbono inorgânico = $1,2 \text{ mg C.L}^{-1}$, dureza total = $26 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$, e turbidez = 1 NTV. Todas estas variáveis apresentaram valores adequados, permitindo uma taxa de sobrevivência de 100% durante o período experimental. Outros parâmetros também foram avaliados, a fim de garantir as condições necessárias para a manutenção dos organismos (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água durante o experimento (Média $\pm$ DP) (ND- não detectado).

Parâmetros	CTR – n	pH ac	Al	Mn	Al-Mn
pH	$7,20 \pm 0,2$	$5,84 \pm 0,5$	$5,64 \pm 0,3$	$5,86 \pm 0,5$	$5,71 \pm 0,4$
O₂ dissolvido (mg.L⁻¹)	$7,39 \pm 0,4$	$7,51 \pm 0,3$	$7,43 \pm 0,6$	$7,45 \pm 0,3$	$7,43 \pm 0,5$
Temperatura (°C)	$24,82 \pm 0,4$	$24,84 \pm 0,4$	$24,98 \pm 0,3$	$24,80 \pm 0,4$	$24,83 \pm 0,3$
NH₄ (mg.L⁻¹)	$0,72 \pm 0,4$	$0,81 \pm 0,5$	$1,18 \pm 0,6$	$0,76 \pm 0,6$	$1,10 \pm 1,2$
NO₃ (mg.L⁻¹)	$0,39 \pm 0,1$	$0,42 \pm 0,1$	$0,42 \pm 0,1$	$0,45 \pm 0,1$	$0,50 \pm 0,2$
Al total (mg.L⁻¹)	ND	ND	$0,60 \pm 0,09$	ND	$0,55 \pm 0,14$
Al dissolvido (mg.L⁻¹)	ND	ND	$0,36 \pm 0,11$	ND	$0,38 \pm 0,16$
Mn total (mg.L⁻¹)	ND	ND	ND	$0,52 \pm 0,13$	$0,57 \pm 0,06$
Mn dissolvido (mg.L⁻¹)	ND	ND	ND	$0,31 \pm 0,16$	$0,51 \pm 0,11$

A partir dos dados de concentração dos metais, estes foram organizados em gráficos para representar a variação em relação ao pH durante o período experimental. Para os metais, tanto na forma total (Figuras 7 e 9) quanto dissolvida (Figuras 8 e 10), pode-se perceber que no momento em que foi realizada a troca de água, o pH se encontrava em valores próximos ou abaixo de 5,5, e a concentração dos metais tendiam a aumentar. A partir do momento em que as características físico-químicas da água

foram capazes de causar um tamponamento no valor do pH, a concentração metálica tendia a diminuir. Essa característica é mais expressiva na concentração do metal dissolvido.

Figura 7. Concentração de Al total e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

Figura 8. Concentração de Al dissolvido e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

A variação na concentração de Mn dissolvido se mostrou expressiva durante o experimento, e o pH sofreu uma grande oscilação, atuando sobre a biodisponibilidade

desse metal (Figura 10). Além disso, a concentração de Mn dissolvido se manteve em valores inferiores a $0,5\text{mg.L}^{-1}$.

Figura 9. Concentração de Mn total e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

Figura 10. Concentração de Mn dissolvido e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

Já nos aquários em que os dois metais estavam presentes, tanto na fração total (Figura 11) quanto dissolvida (Figura 12) foram observadas respostas diferentes frente ao mesmo pH, sendo o Al mais dependente do pH do que o Mn.

Figura 11. Concentração de Al e Mn total e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

Figura 12. Concentração de Al e Mn dissolvido e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

4.2 Estádio de maturação de *Astyanax altiparanae*

Algumas características específicas auxiliaram na determinação do estágio reprodutivo do *Astyanax altiparanae*. Inicialmente, na morfologia externa destes animais foram identificadas diferenças como, os machos maduros apresentaram a anal áspera, enquanto que em fêmeas essa característica não foi encontrada. Esta característica auxiliou na separação dos animais para o experimento. Além disso, as gônadas masculinas foram coletadas e se encontravam bem desenvolvidas, com coloração esbranquiçada evidenciando a presença de sêmen, além de ocupar grande proporção da cavidade celômica, indicando uma fase de maturação avançada do animal (Figura 13).

Figura 13. *Astyanax altiparanae*. Macho adulto. T: testículos; B: bexiga natatória.

Outra análise para confirmar o estágio reprodutivo do animal foi a histologia dos testículos, trazendo informações mais detalhadas em relação à morfologia interna das gônadas, indicando a frequência de cistos contendo gametas em diferentes estágios de desenvolvimento, o que confirma o estágio de maturação. Nas secções histológicas foi possível evidenciar mais claramente o estágio reprodutivo desses animais, visto que o lúmen estava preenchido por espermatozoides (Figura 14A), ocupando a maior parte deste espaço. A presença de cistos em diferentes fases de desenvolvimento da espermatogênese (Figura 14B) como espermatogônias (cabeça de seta branca), espermátócitos primários (SP) e secundários (SS) e cistos de espermátides (ST) organizados, evidenciaram a renovação dos estoques de espermatozoides no período reprodutivo. Foi interessante observar o exato momento do rompimento de um cisto de espermátides para o lúmen (Figura 14C), caracterizado como a fase final de maturação

dos espermatozoides e assim a liberação dos gametas para a reprodução. A figura 14D destaca a célula de Sertoli, que está localizada ao redor dos cistos.

Figura 14: Secções histológicas de testículos de *Astyanax altiparanae*. A) Visão geral do testículo com o lúmen preenchido com espermatozoides (SZ) e a presença de cisto em diferentes fases da espermatogênese; B) Visão detalhada, no qual há a presença de cistos formados por espermatogônias (cabeça de seta branca), espermatócitos primários (SP) e secundários (SS), e espermatídes (ST), com o lúmen completo por SZ C) Detalhe para o cisto de espermatídes rompendo para o lúmen (cabeça de seta branca); D) Visão detalhada com enfoque na célula de Sertoli, indicada pela cabeça de seta branca A) Barra= 100µm B) Barra=7,5µm C) Barra=50µm D) Barra=20µm. Hematoxilina-eosina, PAS+hematoxilina+*Metanil Yellow* (Kida, 2014).

4.3 Análises dos parâmetros do estresse oxidativo: Hepática e Branquial

4.3.1 Análises Hepáticas

Figura 15: Parâmetros do estresse oxidativo hepáticos em machos de *Astyanax altiparanae* após exposição aguda ao pH neutro, pH ácido, Al, Mn e Al+Mn (24h e 96h) e recuperação (24h e 96h). Grupo controle pH neutro (ctr), grupo pH ácido (pH ac), Al (Alumínio), Mn (Manganês), Al+Mn (Alumínio e Manganês). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre o grupo experimental, separadamente.

A exposição de 96h ao pH ácido e aos metais, isolados ou combinados, não alterou a atividade da SOD, da GR, GST, assim como a concentração de GSH (Figs. 15A, E, F, D). O pH ácido diminuiu a atividade enzimática da CAT em relação ao controle em 24h do período agudo ($P = 0,000645$). O período de recuperação de 96h não foi suficiente para retornar aos níveis do controle ($P < 0,05$) (Fig. 15B). A exposição ao Al juntamente com o manganês em 24h causou a diminuição da atividade enzimática da GPX ($P = 0,000137$). No entanto, em 96h de recuperação, os níveis retornaram iguais aos níveis do controle ($P = 0,154$) (Fig. 15C).

A exposição de 96h aos metais e ao pH ácido não alterou as concentrações de MTL. No entanto, 24h do período da recuperação, o grupo Al+Mn aumenta a concentração ($P = 0,000230$) (Fig. 15G). A exposição de 96h ao pH ácido e aos metais não alterou as concentrações de MDA dos indivíduos. No entanto, no período de recuperação houve um aumento em 96h no grupo de Mn e Al+Mn ($P < 0,01$) (Fig. 15H).

4.3.2 Análises Branquiais

Figura 16: Parâmetros do estresse oxidativo branquial em machos de *Astyanax altiparanae* após exposição aguda ao pH neutro, pH ácido, Al, Mn e Al+Mn (24h e 96h) e recuperação (24h e 96h). Grupo controle pH neutro (ctr), grupo pH ácido (pH ac), Al (Alumínio), Mn (Manganês), Al+Mn (Alumínio e Manganês). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre o grupo experimental, separadamente.

A exposição em pH ácido por 96h aumenta a atividade enzimática da SOD em relação ao controle ($P = 0,00635$) e um período de 96h de recuperação não é suficiente para a recuperação do pH ácido ($P = 0,00106$), causando a diminuição da atividade enzimática em todos os outros grupos respectivamente ($P = 0,000309$; $P = 0,00720$; $P = 0,0000205$) em relação ao controle (Fig. 16A).

O período de exposição de 96h aos metais e pH ácido não alterou a atividade enzimática da CAT. No entanto, no período de 24h de recuperação há um aumento da atividade no grupo exposto ao Al+Mn ($P = 0,0000293$), que se recupera no período de 96h ($P = 0,273$) (Fig. 16B).

A concentração da GSH aumenta em 24h de exposição nos grupos Al ($P = < 0,05$) e também no grupo Al+Mn ($P = < 0,05$) (Figura D).

A exposição de 96h ao pH ácido e aos metais não altera a atividade da GPx (Figura 16C), GR (Figura 16E) e GST (Figura 16F).

O período de 24h de exposição não altera os níveis de MDA. No entanto, em 96h os níveis de MDA diminuem nos animais do grupo Al+Mn ($P = 0,00239$), que retorna aos níveis do controle em 24h do período de recuperação ($P = 0,083$) (Fig. 16G).

5. Discussão

5.1 Parâmetros físico-químicos da água

Para manter as condições ideais e controladas em experimentos ecotoxicológicos faz-se necessário o monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água. Dessa forma, as condições experimentais devem ser controladas para que não haja interferência nos resultados da influência dos metais nos tecidos. É de grande importância que a concentração de oxigênio dissolvido e temperatura sejam constantemente acompanhadas, pois estes parâmetros podem interferir diretamente nos animais. Além disso, o oxigênio dissolvido é capaz de influenciar na disponibilidade de metais, bem como a temperatura pode interferir no metabolismo energético e também ser capaz de alterar as estruturas químicas das substâncias (Aragão e Araújo, 2006). Dessa forma, as concentrações de oxigênio dissolvido foram mantidas durante o experimento acima 6 mg.L^{-1} , concentração adequada e acima do requerimento mínimo da maioria dos teleósteos; a temperatura se manteve estável, a $24,83^{\circ}\text{C} \pm 0,14$, o que é considerada ideal para peixes tropicais, já que engloba temperaturas de 22 a 28°C (Huet, 1974). Da mesma forma, os compostos nitrogenados podem influenciar nos resultados dos experimentos, pois em altas concentrações podem ser deletérios para os peixes, podendo causar distúrbios fisiológicos e até a morte (Ruyet *et al.*, 1997). Portanto, o monitoramento e controle desses fatores foram realizados através da troca diária de 90% de água dos aquários, não acumulando compostos nitrogenados na água, e não interferindo nos resultados observados.

Outro fator abiótico importante é o pH, considerado um dos principais fatores abióticos com a capacidade de influenciar na toxicidade de várias substâncias na água. Isso ocorre devido ao pH ácido tornar os metais biodisponíveis (Aragão & Araújo, 2006). Este estudo evidenciou que os metais Al e Mn são influenciados por esse parâmetro, principalmente o Al, pois nos momentos em que o pH encontrava-se ácido (após a troca de água), há o aumento da concentração de Al dissolvido. Esta concentração diminui conforme a manutenção da água torna o pH alcalino. A diminuição desta concentração pode ter ocorrido pela deposição de metal nos tecidos dos animais, bem como pela diminuição da solubilidade do metal na água. A concentração do pH neste experimento foi pH 5,5, em que as principais formas de Al encontradas na água são AlOH^{2+} e AlOH_2^{+} e a forma mais encontrada no caso do Mn é

Mn³⁺ (Buckler *et al.*, 1995). Como visto, pH é capaz de alterar a disponibilidade dos metais e também pode causar efeitos deletérios nos tecidos. Dessa forma, optou-se neste estudo pelo monitoramento isolado dos animais expostos ao pH ácido, para distinguir os efeitos do pH ácido isolado com os efeitos do pH ácido combinados com os metais.

5.2. Análises do Estresse Oxidativo: Hepático e Branquial

O organismo tem dois principais mecanismos de eliminação de agentes químicos: excreção, podendo ser na sua forma original, ou biotransformação, levando à formação de compostos hidrofílicos, os quais são excretados mais facilmente que o composto original (Van der Oost *et al.*, 2003). Apesar do principal órgão de biotransformação de xenobióticos ser o fígado, alguns autores destacam a importância de outros órgãos detoxificantes como os rins, intestino e brânquias (Fernandez *et al.*, 2012). Para este trabalho foram selecionadas as análises de brânquias e fígado, com base em critérios funcionais, que os tornam alvos preferenciais, isto é, a absorção de xenobióticos (brânquias) e o processo de detoxificação metabólica (fígado).

Primeiramente, verificou-se que estes tecidos mostraram diferentes níveis basais de atividades enzimáticas, proteínas e hidroperóxidos de lipídios, que podem ser explicadas por diferenças nas suas funções nos peixes. Os resultados também demonstraram uma resposta específica pelas enzimas antioxidantes em cada órgão, principalmente nos animais expostos ao Al+Mn (Ahmad *et al.*, 2006; Velma & Tchounwou, 2010). A resposta individual de cada órgão retratou que as brânquias podem ser consideradas como o órgão mais sensível, uma vez que induziu respostas variadas aos metais, se tornando um biomarcador de dano oxidativo efetivo. Isso porque este órgão possui maior contato com o metal na água, o que é particularmente relevante em exposições agudas (Atli *et al.*, 2006) e também foi demonstrada a sua eficiência em refletir a contaminação da água no contexto da avaliação ambiental (Pereira *et al.*, 2010). Já no fígado foram evidenciadas variações pontuais, demonstrando uma baixa sensibilidade aos poluentes em relação às brânquias (Velma & Tchounwou, 2010). Dessa forma as brânquias se apresentaram como uma proteção efetiva para os outros órgãos dos animais (Livingstone, 2001; Zhang *et al.*, 2004).

Em áreas poluídas, a exposição de peixes aos xenobióticos pode resultar em alterações na atividade das enzimas antioxidantes (Gul *et al.*, 2004), causadas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio. A expressão dessas enzimas é um mecanismo

de adaptação importante ao estresse induzido por poluentes (Livingstone, 2001; Zhang *et al.*, 2004). As respostas esperadas em relação à ativação das defesas antioxidantes, ligação aos metais pela MT e a indução de glutathionas para a conjugação com os metais ocorrem a partir de 6 horas e até 48 horas após a exposição a substâncias tóxicas (Cho *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2007; Bouraoui, 2008). O presente estudo demonstrou em apenas 24 h de exposição, efeitos adversos, caracterizando os metais e o pH ácido como estressores em machos de *A. altiparanae*. Adicionalmente, na maioria dos casos, o período de 96 h em água livre de metais (recuperação), foi suficiente para que os valores fossem restabelecidos conforme os valores dos animais do grupo controle.

As enzimas antioxidantes são biomarcadores eficazes, pois quando há a exposição aos poluentes, seus efeitos são evidenciados no complexo bioquímico ou no processo metabólico, apresentando alterações em suas atividade de GPx, SOD, CAT, GST e GR (Walker *et al.*, 1996). A relação entre as espécies reativas de oxigênio e indução na atividade das enzimas antioxidantes é bastante complexa, além de estas respostas poderem sofrer influência de seus produtos (Cao *et al.*, 2012) (Figura 15).

Figura 15: Esquema sobre a interação das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no combate à ERO (Adaptado de Hermes-Lima, 2004).

O pH ácido não se mostrou tão deletério para os organismos como em conjunto com os metais, porém o período de 96 h de recuperação não foi suficiente para que os níveis de CAT hepática e SOD branquial retornassem aos níveis encontrados nos animais do grupo controle, corroborando com os experimentos conduzidos por Nilsen *et al.* (2013) com salmão do Atlântico, em que foram necessárias mais de duas semanas para uma recuperação total dos animais após exposição ao pH ácido, e também ao Al no que diz respeito aos efeitos causados sobre funções fisiológicas.

Considerando que a SOD é uma enzima que catalisa a reação espontânea de dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), com a produção final de H_2O_2 e O_2 , e a CAT catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 , o sistema SOD-CAT pode fornecer uma importante linha de defesa contra as EROs (Fernandez *et al.*, 2012). Os animais expostos ao pH ácido demonstraram uma diminuição da atividade da CAT hepática no período agudo (24 h), enquanto que nas brânquias não houve alteração. Já a atividade da SOD aumenta nas brânquias (96 h) e não retorna aos níveis do controle no período de recuperação, evidenciando o papel do sistema SOD-CAT nestes animais. Enquanto que nas brânquias há aumento da concentração de SOD, os tecidos hepáticos apresentam aumentam a atividade da CAT. Fernandez *et al.* (2012) explicam que é necessária uma regulação das concentrações de H^+ , visto que a atividade da maioria das enzimas é influenciada pelo pH. O pH da água afeta a estrutura e atividade das enzimas e em baixas concentrações, o pH pode desnaturar muitas das enzimas na mitocôndria. Moore *et al.* (2008) sugerem que a faixa de pH ótimo para a atividade da CAT está entre 6,5 a 7,0. Dessa forma as alterações do pH no ambiente parecem influenciar a atividade da CAT, modificando a relação entre a ação enzimática e a concentração do substrato.

A acidificação das águas tem causado redução e extinção de populações de salmão no sul da Noruega, desde o final do século XIX (Hesthagen & Hansen, 1991). Vários estudos têm demonstrado efeitos fisiológicos graves e mortalidade de peixes nesses ambientes (Monette & McCormick, 2008). Asagba *et al.* (2008) explicam que essa condição das águas tem causado alterações na fisiologia desses animais, como efeitos na osmorregulação branquial, alterando os níveis de Na^+ e Cl^- e atividade da bomba Na^+/K^+ , além de variações nas atividades das enzimas antioxidantes branquiais e hepáticas, causadas não apenas pela exposição ao pH ácido, mas também em conjunto à formas catiônicas de Al que se tornam biodisponíveis nessas condições.

A atividade da SOD nas brânquias, nos animais expostos aos metais apresentaram o mesmo comportamento do pH ácido, indicando que os efeitos

observados nos grupos, são interferências do próprio pH. Sabemos que o estresse oxidativo ocorre quando a quantidade de EROs aumenta significativamente ou o sistema de defesa antioxidante se torna inativo (Manoj & Padhy, 2013), o que ocorre na exposição ao pH ácido.

Ao contrário do pH ácido, o Al possui atividade pró-oxidante, ou seja, é indutor do estresse oxidativo através da geração de EROs. Diversos estudos demonstraram que a exposição a altas concentrações de Al podem induzir o estresse oxidativo, estimulando as espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células (Sinha *et al.*, 2007), indução de peroxidação lipídica (LPO), alteração da atividade de diversas enzimas antioxidantes incluindo SOD, CAT e GPX, e promoção da oxidação de proteínas (Almroth *et al.*, 2005; Vlahogianni *et al.*, 2007). Além disso, o Al pode competir diretamente com outros metais essenciais e até mesmo substituí-los. Uma forte evidência de que o Al seja um oxidante potente é a indução da formação de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil, gerando o estresse oxidativo nas espécies salmão e truta (Campbell, 2013; Witters *et al.*, 1996). No presente estudo, o efeito do Al foi pontual na brânquia. No entanto, o aumento da concentração da proteína GSH, sugere que a presença do Al induz o aumento da síntese de GSH para proteger contra o estresse oxidativo resultante da exposição ao metal (Ross, 1988).

A concentração de GSH nos tecidos pode aumentar como resultado de um mecanismo de adaptação ao estresse oxidativo, em que a alteração provém do aumento da síntese de GSH, o que provavelmente aconteceu neste trabalho (Zhang *et al.*, 2004). Este dado indica um papel importante de antioxidante que a GSH exerce como primeira linha de defesa (Ahmad *et al.*, 2000). O estresse oxidativo pode estimular a biossíntese de antioxidantes (Winston & Di Giulio, 1991) e dentre seus papéis, a GSH pode atuar diretamente nas espécies reativas de oxigênio a fim de promover sua neutralização e evitar danos oxidativos (Hermes- Lima, 2004). Peixes expostos a herbicidas, apresentam aumento da concentração de GSH tanto nas brânquias (Oropesa *et al.*, 2009), como também no fígado (Modesto & Martinez, 2010). Trutas expostas à metais como cádmio, cobre e zinco, apresentaram o mesmo padrão deste estudo, aumentando a concentração de GSH somente nas brânquias (Hansen, 2007).

Estes dados, juntamente com os dados de peroxidação lipídica indicam que o aumento nas concentrações branquiais de GSH pode estar relacionado à proteção das membranas plasmáticas contra os danos oxidativos, sendo eficiente o controle nas brânquias para não atingir o fígado. Apesar do fígado ser o órgão mais comumente

relacionado à biotransformação de xenobióticos, alguns autores também destacam a importância de outros órgãos detoxificantes, como os rins e as brânquias (Simonato *et al.*, 2010). Além disso, a baixa sensibilidade do tecido branquial a alguns poluentes faz com que as células sejam capazes de suportar, até certo ponto, as alterações oxidativas sem que ocorra nenhum efeito deletério na função ou viabilidade celular do próprio tecido e também de outros órgãos (Hermes- Lima, 2004).

Ao contrário do Al, o Mn é um metal essencial, e tem sua entrada facilitada no organismo pelos canais de Ca^{+2} . No entanto em altas concentrações, o Mn também causa danos oxidativos. Quando há aumento na disponibilidade de Mn intracelular, ele se acumula nas mitocôndrias, principalmente como Mn^{+2} . Dessa forma, o Mn interfere no processo de respiração celular, levando a produção excessiva de EROs, e consequentemente à disfunção mitocondrial (Gunter & Pfeiffer, 1990). Isso ocorre porque a transição de Mn^{+2} para Mn^{+3} aumenta a sua capacidade pró-oxidante, produzindo superóxidos e também peróxidos de hidrogênio (Archibald & Tyree, 1987; Gunter & Pfeiffer, 1990). Sugere-se que a exposição de machos de *A. altiparanae* por 96 h ao Mn em pH ácido não desencadeou as respostas de defesas antioxidantes e não antioxidantes, bem como não apresentou aumento das metalotioneínas, que são enzimas específicas relacionadas a proteção de metais. Essa ausência de respostas dos sistemas de defesa resultou mesmo mantidos em água limpa, em um aumento da peroxidação lipídica branquial em 24 h de recuperação.

Quando o sistema de defesa antioxidante é insuficiente ou inativado, podem ocorrer danos como peroxidação lipídica (Manoj & Padhy, 2013). A peroxidação lipídica pode ser descrita como um processo degenerativo, gerado por um estresse oxidativo que provoca danos na função das membranas celulares, tais como uma mudança na sua estrutura e um aumento da sua permeabilidade (Storey, 1996; Girotti, 1998). Todo o organismo pode sofrer consequências por causa de lesões nas membranas celulares, gerados pelos ataques oxidantes sobre os lipídios, ácidos graxos e colesterol (Uz-Zaman *et al.*, 2008). A fosfolipase, ativada por substâncias tóxicas desintegra os fosfolipídios e libera ácidos graxos insaturados (Halliwell & Gutteridge, 1989), resultando em efeitos nocivos dos peróxidos lipídicos e entre outros efeitos, as alterações no DNA. O malondialdeído (MDA), um produto gerado na peroxidação lipídica, analisado neste estudo, está fortemente relacionado com danos nas proteínas (Traverso *et al.*, 2004; Suji & Sivakami, 2008). Nos organismos aquáticos, a peroxidação lipídica é induzida através da exposição a agentes tóxicos, como efluentes

industriais, metais, como o manganês neste trabalho, e pesticidas (Ahmad *et al.*, 2000; Oakes & Van der Kraak, 2003; Almeida *et al.*, 2007).

Da mesma forma, o grupo Al+Mn apresentou aumento de LPO hepática após o período de exposição, além de apresentar um padrão de variação totalmente diferente dos metais isolados. Os metais Al e Mn em combinação apresentaram maiores efeitos nas brânquias do que no fígado. Isso devido às brânquias serem a primeira superfície de contato com a água (Farrel *et al.*, 2011). Durante o processo respiratório, o fluxo de água que entra pela boca do peixe leva consigo agentes químicos, dissolvidos ou suspensos na água. Os rastros impedem que agentes sólidos atravessem os filamentos branquiais, causando-lhes danos. Todavia, se os agentes encontrarem-se dissolvidos na água, inevitavelmente entrarão em contato com os filamentos branquiais e com as lamelas respiratórias e, em altas concentrações, poderão alterar a morfologia das brânquias, além de alterar as atividades enzimáticas, proteicas e estruturais (Partridge & Lymbery, 2009; Wang *et al.*, 2015).

Sabe-se que a atividade das enzimas GPx e CAT é modulada sob condições indutoras de estresse oxidativo associada à exposição a metais. A GPx é uma peroxidase com importante função de neutralizar a ação do peróxido de hidrogênio e atua, diferentemente da CAT, principalmente quando as concentrações de peróxido de hidrogênio são mais baixas (Ahmad *et al.*, 2006). No presente estudo foi observado o aumento da atividade da GPx nas brânquias em 96 h de exposição e diminuição da mesma no fígado, que se recuperam logo em seguida. Essa variação de GPx é decorrente das pressões dos metais com o próprio metabolismo, influenciando esta atividade, em que em situações de pouco estresse acarreta na diminuição da produção da GPx (Almeida *et al.*, 2002). Este dado demonstra que o aumento na atividade da GPx na brânquia foi suficiente para que os danos oxidativos não interferissem na atividade da mesma no fígado, corroborando com os dados de Ahmad *et al.*, (2006) com peixes expostos ao efluentes.

Além do aumento da GPx, a GSH também apresentou um aumento em 24 h de exposição nas brânquias, o que também pode ter contribuído para que os níveis da proteína se mantivessem basais no fígado. Esta indução da GSH também foi consequência do aumento da atividade da GR nas brânquias, visto que esta é responsável pela redução da glutatona oxidada pela GPx, através da oxidação do NADPH em NADP⁺, mantendo as concentrações de GSH em seu estado reduzido (Figura 15) (Van der Oost *et al.*, 2003; Hermes-Lima, 2004). A utilização da GSH como

biomarcador do estresse oxidativo por consequência da ação de metais tem sido relatada por vários trabalhos, visto que esta proteína pode auxiliar nas defesas, bem como para compreender as enzimas GR e GST que a utilizam como substrato (Atli *et al.*, 2006). A GST é uma enzima de desintoxicação que auxilia na eliminação de compostos reativos formando conjugados com a GSH e eliminando-os na forma de ácido mercaptúrico, protegendo as células de danos induzidos pelas EROS. Observa-se que o aumento destas enzimas nas brânquias e fígado, em relação aos níveis basais, decorre, em sua maioria, na exposição com compostos organoclorados (Simonato *et al.*, 2010). Isso explica sobre a atividade da GST não ter variação em relação aos animais do grupo controle tanto nas brânquias como fígado nos diferentes tratamentos.

Apesar de as defesas terem sido intensificadas no período agudo da exposição de Al+Mn, estas não foram eficazes para que o período de recuperação não apresentasse alterações. A atividade da CAT branquial não apresentou variação quando os animais foram expostos aos dois metais combinados, no entanto, no período de recuperação em 24 h houve aumento da atividade desta enzima, que retorna aos níveis do controle 96 h. Além disso, houve o aumento da MT em 24h do período de recuperação no fígado. O aumento na concentração de MT é uma das principais respostas decorrentes da exposição a metais, no entanto existem poucos estudos que mostram uma correlação entre a exposição ao Al e Mn, isolados ou combinados, com a produção MT em peixes (Giguère *et al.*, 2006; Leonard *et al.*, 2014). A metaloteoneína é uma proteína induzida pela exposição a metais e sua função é se ligar a estes elementos e assim, impedir os efeitos tóxicos que eles causariam. Muitos trabalhos buscam compreender o papel dos metais no estresse oxidativo, levando em consideração a ação dos antioxidantes e a relação da MT com estes processos. Giguère *et al.*, (2006) analisaram o padrão de bioacumulação dos metais cobre, zinco, níquel e cádmio, em *Perca flavescens* relatando o auxílio da MT na proteção contra os agentes oxidantes. Da mesma forma, Chowdhury *et al.*, (2005) observaram padrões diferenciados para acumulação de cádmio proveniente da água e alimentação em diferentes tecidos de *Oncorhynchus mykiss*, associado com a elevação da MT conforme as concentrações deste metal eram maiores. A exposição somente ao Mn resultou na ocorrência de altas concentrações de MT no intestino, fígado e rim de *Oncorhynchus mykiss* (Filipovi & Raspor, 2003; Amiard *et al.*, 2006; De Boeck *et al.*, 2010). No entanto, apesar da tentativa de proteção dos parâmetros avaliados, os animais expostos ao Al+Mn apresentaram aumento da LPO no período de recuperação, não sendo suficiente o período de 96 h para retornar aos níveis do controle.

Alterações pelos metais nas concentrações de EROs, como das enzimas antioxidantes, associadas à alterações metabólicas (Brodeur *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2013), podem afetar o sucesso do período reprodutivo de várias espécies (Alonso-Alvarez *et al.*, 2004; Aras *et al.*, 2009). Estudos comprovam que uma das causas do estresse oxidativo na reprodução em machos e fêmeas é a alteração das concentrações hormonais, como em fêmeas de *Oreochromis niloticus* expostas ao Al, que resultou na alteração dos níveis de gonadotropinas, inibindo a resposta das células esteroidogênicas (Correia *et al.*, 2010), sugerindo prejuízos no processo reprodutivo.

A exposição ao Al+Mn nestes mesmos animais analisados neste trabalho, não apresentaram alterações no nível de cortisol, sugerindo que não houve alteração na demanda metabólica dos animais. No entanto, a produção dos hormônios que modulam o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas foi alterada, como no caso do hormônio responsável pela reprodução em machos, a 11-ceto-testosterona, influenciando no padrão de reprodução de *A. altiparanae* (Kida, 2014). Em resumo, os processos endógenos e extrínsecos contribuem para a variação nos níveis de estresse oxidativo vivenciada pelos indivíduos durante a reprodução (Aras *et al.*, 2009). No entanto, estudos que revelam os efeitos do estresse oxidativo na reprodução de teleósteos machos ainda são escassos.

Concluimos que o Al e o Mn, isoladamente ou combinados, independente da acidez na água são capazes de induzir o estresse oxidativo em machos de *A. altiparanae* no período reprodutivo, principalmente aumentando a atividade das enzimas antioxidantes e não antixodiantes das brânquias, além de causar lipoperoxidação no fígado, mesmo que tardia, possivelmente alterando o sistema fisiológico. No entanto, 24 h em água limpa é um período suficiente para a recuperação dos efeitos da maioria das enzimas. Estes dados sugerem que o ambiente impactado prejudica de alguma forma o metabolismo e a fisiologia da reprodução desta espécie.

6. Conclusões

- Os metais Al e Mn, de forma isolada, além do pH ácido, foram capazes de atuar como estressores oxidativos, permitindo um ajuste do animal às novas condições expostas;
- As brânquias possuem funções antioxidantes eficientes, diminuindo os efeitos no fígado;
- A combinação dos metais Al e Mn se mostrou mais prejudicial, causando alterações significativas nas enzimas antioxidantes e não oxidantes, que não impediram a lipoperoxidação no fígado.
- Estas alterações enzimáticas podem influenciar no sucesso reprodutivo dos animais, alterando o padrão reprodutivo de machos de *A. altiparanae*.

7. Considerações Finais Gerais

- As brânquias apresentaram um padrão diferenciado em relação a sua função. Apesar do fígado ser o órgão detoxificador, as brânquias, mesmo com baixos valores de atividade enzimática, apresentaram uma importante linha de defesa no estresse oxidativo.
- Apesar do pH ácido não ter alterado efetivamente as atividades enzimáticas, esta variável apresentou efeitos potenciais em relação as concentrações de hormônios reprodutivos (Kida, 2014).
- Os metais, além de influenciarem no estresse oxidativo, também são responsáveis por alterações no padrão reprodutivo dos animais. No caso dos animais expostos ao Mn, não foram recrutadas defesas antioxidantes para minimizar os efeitos, em contrapartida estes mesmos animais aumentaram a concentração do hormônio testosterona no período agudo (Kida, 2014), sugerindo que a prioridade naquele momento era finalizar o ciclo reprodutivo. No entanto, os metais Al e Mn combinados não alteraram os níveis hormonais de testosterona, dessa forma, as alterações enzimáticas foram muito mais presentes em relação aos metais isolados.

- Variações comportamentais também foram observadas ao longo do experimento. Animais expostos ao Al apresentaram um padrão diferente em relação aos animais do grupo controle, com natação lenta e diminuição dos movimentos operculares. Já os animais expostos ao Mn, apresentavam um padrão de comportamento agressivo, com natação rápida. Estudos envolvendo análise comportamental com estes animais complementariam as análises efetuadas.
-

8. Referências Bibliográficas

- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1523, 37–48.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A. 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere* 65, 952–962.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Garcia, C.C.M., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Brochini, C.B., Martins, A.M.G., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 146, 588–600.
- Almeida, J.A.; Diniz, Y.S.; Marques, S.F.G.; Faine, L.A.; Ribas, B.O.; Burneiko, R.C.; Novelli, E.L.B. 2002. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* 27, 673–679.
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Forlin, L. 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 73, 171–180.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Gaillard, M., Prost, J., Faivre, B. and Sorci, G. 2004. An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *Am. Nat.* 164, 651–659.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.
- Amorim, L.C.A. 2003. O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. *Rev. Bras. Med. Trab.* Belo Horizonte, 124–132.

- Aragão, M. A. & Araújo, R.P.A. 2006. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. Cap. 6, p.117 – 152. In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E. 2006. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. São Carlos: Rima.
- Aras M. A.; Hara H.; Hartnett K. A.; Kandler K.; Aizenman E. 2009. Protein kinase C regulation of neuronal zinc signaling mediates survival during preconditioning. *J. Neurochem.* 110, 106–117.
- Archibald, F.S.; Tyree, C. 1987. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 638–650.
- Asagba, S.O., Eriyamremu, G.E., Igberaese, M.E. 2008. Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.* 34, 61–69.
- Atli, G., Alptekin, O., Tukel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag, Cd, Cr, Cu and Zn in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 218–224.
- Bainy, A.C.D.; Medeiros, I.D.; Mezzari, M.P.; Ventura, E.; Muller, I.C.; Marques, M. R. F. 1998. Análise de biomarcadores bioquímicos de contaminação aquática em peixes coletados no litoral do Rio de Janeiro. In: I Simpósio de monitoramento do ambiente marinho, Arraial do Cabo. *Resumo do I Simpósio de monitoramento do ambiente marinho*.
- Baker, R.C.; Kramer, R.E. 1999. Cytotoxicity of short-chain alcohols. *Annu. Rev. Pharmac. Toxicol.* 39, 127-150.
- Bertoletti, E. 2000. Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces: Cyprinidae). 117p. *Tese (Doutorado em Saúde Ambiental)* - Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.
- Bertoletti, E. 1990. Toxicidade e Concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. *Rev. Ciênc. Cult.* 43 (3/4): p.271-277.
- Beutler, E., 1975. Catalase. In E. Beutler (Ed.), *Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton. p. 89-90.
- Beutler, E.; Duron, O.; Kelly, B.M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882–890.
- Biney, C.; Amuzu, A.T.; Calamari, D.; Kaba, N.; Mbome, I.L.; Naeve, H.; Ochumba, P.B.O.; Osibanjo, O.; Radegonde, V.; Saad, M.A.H. 1994. Review of heavy metals in the African aquatic environment. *Ecotox. Environ. Safety.* 28, 134-159.

- Bondy, S.C., Cambell, A., 2001. Oxidative and inflammatory properties of aluminium: possible relevance in Alzheimer's disease. In: Exley, C. (Ed.), *Aluminium and Alzheimer's Disease. The Science that Describes the Link*, Elsevier, Amsterdam, 311–321.
- Bouraoui, Z. 2008. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.* 72, 248-254.
- 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. *Aquat. Toxicol.* 31, 203-216.
- Campbell, P. G. C. Cooper, S., Bonneris, E., Michaud, A., Pinel-Alloul, B. et. 2013. Influence of a step-change in metal exposure (Cd, Cu, Zn) on metal accumulation and subcellular partitioning in a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: A long-term transplantation experiment between lakes with contrasting ambient metal levels. *Aquat. Toxicol.*, 132-133; 73-83.
- Cao, L., Huang, W., Shan, X., Ye, Z., Dou, S., 2012. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 16–25.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- CETESB – Companhia De Tecnologia De Saneamento Ambiental. 2013. *Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo*. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente.
- Cho, Y. S. 2006. Differential expression of Cu/Zn superoxide dismutase mRNA during exposures to heavy metals in rockbream (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture*. 253, 667-679.
- Chowdhury, M.J.; Baldisserotto, B.; Wood, C.M. 2005. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. *Archi. Env. Con. Tox.* 48,381-390.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. *Resolução nº 357/05*. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Brasília, SEMA.

- Correia, T. G., Narcizo, A. M., Bianchini, A., Moreira, R. G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 151, 61–66.
- Dautremepuits C., Paris-Palacios S., Betoulle S., Vernet G. 2004. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 137,325–333.
- De Boeck, G., Eyckmans, M., Lardon, I., Bobbaers, R., Sinha, A.K., Blust, R. 2010. Metal accumulation and metallothionein induction in the spotted dog fish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 155, 503–508.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Taylor and Francis, London.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S. 1989. Biochemical responses in aquatic animal: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103–1123.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, 8, 12-18.
- Farrel, A. P.; Joseph, C. J.; Richards, J. G.; Stevens, E. D. 2011. Encyclopedia of fish physiology from genome to environment. *Elsevier*, 3, 2061-2083.
- Fernandes, M.N.; Mazon, A.F. 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L.; Kappor, B.G. *Fish Adaptations*, Science Publishers, Inc. Enfiel, USA,p.23-31.
- Fernandez, M. L.; Oliva, L. M. G.; Martinez, M. G. 2012. Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (*Cyprinidae—Ctenopharingodon idella*) *Ecotox. Environ. Safe.*, 76, 87-92.
- Filipovi, V., Raspor, B., 2003. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. *Water Res.* 37, 3253–3262.
- Fish, J.T., 2009. Groundwater water treatment for iron and manganese reduction and fish rearing studies applied to the design of the Ruth Burnett Sport Fish Hatchery, Fairbanks, Alaska. *Aquacult. Eng.* 41, 97–108.

- Fridovich, I. ; Getzoff, E. D.; Tainer, J. A.; Stempien, M. M.; Bell, G. I. Hallewell; R. A. 1989. Superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 264p.
- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 77, 178–189.
- Girotti, A.W. Serial Review: Regulatory and Cytoprotective Aspects of Lipid Hydroperoxide Metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 154-172, 2002.
- Girotti, A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529–1542.
- Gul, M.; Kutay, F. Z.; Temocin, S.; Haanninen, O. 2000. Cellular and Clinical implications of glutathione. *Ind. J. Exp. Biol.* 38: 625-634.
- Gunter T., Pfeiffer D. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium *Am. J. Physiol.*, 258, 755-786.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine* 2. ed. Clarendon Press, Oxford, 936p.
- Hansen, B.H. 2007. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere*, 67, 2241-2249.
- Heath, A.G. 1995. *Water pollution and fish physiology*. 2.ed. CRC Press, Lewis publishers, 342p.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB (ed) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken, 319-368.
- Hesthagen, T., Hansen, L.P. 1991. Estimates of the annual loss of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway due to acidification. *Aquac. Fish. Managem.* 22, 85-91.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.* 25, 563–575.
- Huet, M. 1974. *Tratado de Piscicultura*. Madrid: Mundiprensa.
- Jobling, S.; Sumpter J.P. 1995. Male sexual development in "a sea of oestrogen". *Lancet.* 342, 124–125.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.

- Kida, B. 2014. Influência do pH ácido, alumínio e manganês na fisiologia reprodutiva em machos de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae). *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2014. 71p.
- Leonard, E.M., Banerjee, U., D'Silva, J.J., Wood, C.M., 2014. Chronic nickel bioaccumulation and sub-cellular fractionation in two freshwater teleosts, the round goby and the rainbow trout, exposed simultaneously to waterborne and diet borne nickel. *Aquat. Toxicol.* 154, 141–153.
- Lichtenfels, A.J.F.C.; Lorenzi-Filho, G.; Guimarães, E.T.; Macchione, M.; Saldiva, P.H.N. 1996. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. *J. Comp. Pathol.* 115, 47-60.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mahdi A., Tripathi S., Neerja J., Mahdi H. 2006. Aluminium mediated oxidative stress: possible relationship to cognitive impairment of Alzheimers type. *Ann Neurosci.*, 13-4,p.687-699.
- Manoj, K., Padhy, P.K., 2013. Oxidative stress and heavy metals: an appraisal with reference to environmental biology. *Int. J. Biol. Sci.* 2, 91–101.
- Martinez, C.B.R. 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. Phar.* 21, 61-69.
- Mason, C.F. 1996. Biology of freshwater pollution. 3.ed. Londres: *Longman*. 175p.
- McCord, J.E., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Qu, R.; Qin, W. Feng, M. 2014. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat. Toxicol.* 150,9-16.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781-787.

- Monette, M.T., McCormick, S. D. 2008. Impacts of short-term acid and aluminum exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) physiology: A direct comparison of parr and smolts. *Aquat. Toxicol.* 86, 216-226.
- Moore, M., Lawrence, A.J., Arukwe, A., Sayer, M., Thain, J. 2008. Molecular/cellular Processes and the physiological Response to Pollution. In: Lawrence, A. J., Hemingway, K. L. Effects of pollution on fish: Molecular effects and population Responses. Oxford: *Blackwell Publishing*. 83-133.
- Nayak, P., 2002. Aluminum: Impacts and disease. *Environ. Res.* 89, 101–115.
- Nilsen, T. O., Ebbenson, L. O. E., Handeland, S. O., Kroglund, F., Finstad, B., Angotzi, A. R., Stefansson, S. O. 2013. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts require more than two weeks to recover from acidic water and aluminum exposure. *Aquat. Toxicol.* 142-143, 33-44.
- Nyberg P., Andersson P., Degerman E., Borg H., Olofsson E. 1995. Labile inorganic manganese—an overlooked reason for fish mortality in acidified streams? *Water Air Soil Pollut.*, 85, 333–340.
- Oakes, K.D., Van der Kraak, G.J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447–463
- Oropesa, A.L., Garcia-Camero, J.P., Soler, F., 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 30-38.
- Paris-Palácios, S.; Biagianti-Risbourg, S.; Vernet, G. 2000. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of cooper sulfate. *Aquat. Toxicol.* 50, 109-124.
- 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, 311-316.
- Paulino, M.G.; Souza, N.E.; Fernandes, M.N. 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotox. Environ. Saf.* 80, 6-13.
- Pavanelli, C.S. Caramaschi, E.P. 1997. Composition of ichthyofauna of two small tributaries of the Paraná river. Porto Roci, Paraná State, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 8, 23-31.

- Pereira, P., Pablo, H.D., Vale, C., Pacheco, M., 2010. Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metalcontaminated coastal system—gills reflect environmental contamination. *Mar. Environ. Res.* 69, 53–62.
- Plaa, G.L. 1982. Present status: toxic substance in the environmental. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 1010-1016.
- Poléo, A. B. S., Oxvenad, S. A., Ostbye, K., Andersen, R. A., Oughton, D. H.; Vsllestad, L. A. 1995. Survival of crucian carp, *Carassius carassius*, exposed to a high low molecular weight inorganic aluminium challenge. *Aquat. Toxicol.* 45, 78-90.
- Prestifilippo, J. P., Fernández-Solari, J., Mohn, C., Laurentiis, A., Mccann, S. M., Dees, W. L., Rettori, V. 2007. Effect of manganese on Luteinizing Hormone–Releasing Hormone secretion in adult male rats. *Toxicol. Sci.* 97(1), 75-80.
- Qu, R.; Wang, L. Q. 2015. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat.Toxicol.*,150, 9-16.
- Quintero-Hunter, I., Grier, H.J., Muscato, M. 1991. Enhancement of histological detail using yellow as countersatin in period acid Schiff’s hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotech. and Histochem.* 66, 169-172.
- Ribeiro, S.M.R., Queiroz, J.H., Pelúzo, M.C.G., Costa,N.M.B., Matta, S.L.P., Queiroz, M.E.L.R., 2005. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci. J.*, 21, 133-149.
- Ross D. 1988. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmac. Ther.* 37, 231 –249.
- Ruyet, J. P. L.; Galland, R.; Roux, A. L.; Chartois, H. 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154, 155-71.
- Sampaio, W. M. S.; Almeida, F. B. 2009. *Lambari (Astyanax bimaculatus)*. Bicho da vez, Museu de Zoologia João Moojen, Universidade de Viçosa 10, 1-3.
- Satoh, K., 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* 90, 37–43.
- Sies, H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*. (Sies, H. ed.), *Acad. Press. London*, 1-8.

- Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R. 2010. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotox. Environ. Safe.* 69, 112-120.
- Sinha, S., Mallick, S., Misra, R.K., Singh, S., Basant, A., Gupta, A.K., 2007. Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludgeamended and contaminated soils: effect on lipid peroxidation, morphoanatomical changes and antioxidants. *Chemosphere* 67, 176–187.
- Stambler, J.S.; Slikva, A. 1996. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr. Rev.* 54,1-30.
- Stegeman J.J.; Brower M.; Di Giulio R.T.; Fórlin L.; Fowler, B.A.; Sanders B.M.; Van Veld P. A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.P. Jr., Bergman, H.L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, *Chelsea*, 235-335.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Suji, G.; Sivakami, S. 2008. Malondialdehyde, a lipid-derived aldehyde alters the reactivity of Cys and the esterase activity of serum albumin. *Toxicol. in Vitro* 22, 618–624.
- Traverso, T.; Menini, S.; Maineri, E.P.; Patriarca, S.; Odetti, P.; Cottalasso, D.; Marinari, U.M.; Pronzato, M.A. 2004. Malondialdehyde, a lipoperoxidationderived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *J. Gerontol. A Biol.* 59 (9), 890–895.
- Uz-Zaman, M., Sarker, S.R., Hossain, S., 2008. The effects of industrial effluent discharge on lipid peroxide levels of punti fish (*Puntius sophore*) tissue in comparison with those of freshwater fish. *J. Food Lipids* 15, 198–208.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology.* 5, 217-225.

- Velma, V., Tchounwou, P.B., 2010. Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. *Mutat. Res.* 698, 43–51.
- Viarengo, A.; Ponzano, E; Dondero, F.; Fabbri R. 1997. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69-84.
- Vieira, V. A. R. O., Correia, T. G., Moreira, R. G. 2013. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. *Comp. Biochem. and Physiol. C* 157, 1-8.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1361–1371.
- Walker, C.R.; Hopkin, S.P.; Sidly, R.M.; Peakall, D.B. 1996. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, 321p.
- Wang, Z.; Yang, S.; Liu, H.; Sun, P.; Liu, H. 2015. Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to four benzophenone UV filters. *Ecotoxicol. Environ. Safe*, 119, 116-122.
- Winston, G.W.; Di Giulio, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
- Witters H.; Van Puymbroeck S.; Stouthart A.; Bonga S. 1996. Physicochemical changes of aluminium in mixing zones: Mortality and physiological disturbances in brown trout (*Salmo trutta L.*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 986–996.
- Zagatto, A. P., Bertolotti, E. (Eds) 2006. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima, 464p.
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4- dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* 55, 167–174.