Universidade de São Paulo

Vanessa Aparecida Rocha Oliveira Vieira

Avaliação da toxicidade de metais no metabolismo de
fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* (Teleostei:
Characidae)

“Toxicity evaluation of metals in the metabolism of *Astyanax*
bimaculatus (Teleostei: Characidae) vitellogenic females”

São Paulo
2012

Universidade de São Paulo

Vanessa Aparecida Rocha Oliveira Vieira

Versão corrigida conforme a resolução CoPGr 5890
Original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo

Avaliação da toxicidade de metais no metabolismo de
fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* (Teleostei:
Characidae)

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de
São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências na
área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa.Dra. Renata Guimarães Moreira

São Paulo
2012

Vieira, Vanessa Ap. R. O.

Avaliação da toxicidade de metais no metabolismo de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae). São Paulo, 2012

143p.

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

1. Peixe neotropical; 2. Ecotoxicidade; 3. Alumínio;
4. Manganês; 5. Brânquias; 6. Substratos metabólicos.

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira
Orientadora

(autor desconhecido)

Lembro da sua voz doce, cantando cantigas de ninar,
me fazendo dormir e sonhar;

um sonho sereno, tranquilo... sabendo que você estaria
ali para me proteger;

Tantas vezes sem conta, o meu pranto de criança
enxugou;

acalentou-me docemente num colo macio e acolhedor;

me ensinou a ser mulher, mas continuar com meus
sonhos de criança;

me ensinou o que é o amor incondicional...

Amor a você minha vizinha "Nena" a qual dedico todo
o esforço que fiz para chegar até aqui...

você é minha luz!

"Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
acreditar no sonho que se tem,
Ou que seus planos nunca vão dar certo,
Ou que você nunca vai ser alguém...
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!"

(Renato Russo)

“Hoje em dia, o ser humano apenas tem ante si três
grandes problemas que foram ironicamente
provocados por ele próprio: a **super povoação**, o
desaparecimento dos recursos naturais e a
destruição do meio ambiente. Triunfar sobre estes
problemas, vistos sermos nós a sua causa, deveria ser
a nossa mais profunda motivação.”

Jacques Yves Cousteau (1910-1997)

Agradecimentos

“Posso ter defeitos, viver ansiosa e ficar irritada algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo, e que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise, é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. É não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo, é ter coragem para ouvir um “não” e segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta” (Augusto Cury).

É perceber que nesta vida você não consegue nada sozinho e saber reconhecer que cada pessoa não é colocada por acaso na sua vida, tudo isso representa a concretização de anos de esforço e dedicação, por isso agradeço a cada um que esteve presente na minha vida e me ajudou a subir mais esse degrau em busca de, quem sabe um dia, encontrar meu lugar e retribuir à vida o que ela tem me dado até hoje!!!

Agradeço:

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Biociências, ao Departamento de Fisiologia e a Capes pela oportunidade e bolsa para realização do curso de doutorado.

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

Ao Danilo Canepelle e a CESP de Paraibuna pela disponibilização dos animais deste trabalho.

À querida Dra. Renata Guimarães Moreira pela orientação, paciência, competência, confiança e dedicação. Obrigada por respeitar e tentar compreender, na medida do possível, a “cabecinha” de cada um e por confiar em mim e me fazer acreditar que seria possível!

À grande família LAMEROA Aline Dal’Olio, Amanda Narcizo, Andreone Medrado, Bianca Kida, Bruno Araújo, Carlos Eduardo Tolussi, Carlos Eduardo Garcia,

Carolina Pozzebon, Cristiéle Ribeiro, Gabriela Brambila, Jandyr Rodrigues Filho, Juliana Dumont, Juliane Amaral, Larissa Amaral, Paulo Mello, Raísa Abdalla, Renato Honji, Tiago Correia, Walquíria Pedra obrigada pelo auxílio nas coletas, pela convivência no laboratório, congressos e auxílios nos experimentos. E em especial ao Vagner Alberto pela grande ajuda e paciência nos experimentos e com as vidrarias (resultado dos experimentos...rs...). Depois de muitos anos juntos, aos poucos nos separamos, e cada um segue o rumo em busca do seu lugar...

Um agradecimento em especial a Cristiéle Ribeiro por me fazer acordar e mostrar que eu podia muito mais nessa vida!...e ao Tiago Gabriel Correia por me inserir na área de Ecotoxicologia e por me acompanhar nesta jornada com suas brilhantes ideias, boas conversas, boa companhia...

Aos *out* LAMEROA: à amiga Marina Granado Sá pela deliciosa amizade, risadas, conversas, companhia e por compartilhar as angústias e os acontecimentos destes 4 anos e ao Leonardo Crisóstomo pela companhia e risadas

Ao pessoal do Instituto de Biociências e do Departamento de Fisiologia que auxiliaram para que este processo fosse possível desde o exame de ingresso, disciplinas, monitorias, congressos, qualificação e defesa, em especial para Roseli Santos, Gisele Ortolí, José Guilherme Chauí-Berlink, Gilberto Fernando Xavier, José Eduardo Bicudo, pessoal da secretaria, da tesouraria e professores.

A Dra Fabiana Lo Nostro da Universidade de Buenos Aires pela oportunidade de estágio em seu Laboratório e pelos “Helps” virtuais da técnica de imunohistoquímica e ao Dr. Rodrigo da Cuña pelo auxílio no laboratório.

A Dra. Maria Inês Borella e ao Ms. Lázaro Wender do Instituto de Ciências Biológicas da USP pelo auxílio nas técnicas de Imunohistoquímica.

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes e ao Ms. Marcelo Paulino da Universidade Federal de São Carlos pelo auxílio nas técnicas de Imunohistoquímica e Glicogênio e pela paciência nas trocas de email.

Ao pessoal do LEFA-UEL em especial a Dra. Cláudia Martinez, a Dra Juliana Simonato pela prontidão em responder aos emails com diversas dúvidas sobre as técnicas enzimáticas e por ter fornecido alguns protocolos utilizados neste estudo e a Dra. Dalita Calvacante pela hospedagem durante o curso na Universidade Estadual de Londrina.

Não menos importante, e eu diria imprescindível, à aqueles que acompanharam de longe todo esse trajeto, não compreendendo a loucura deste etapa da minha vida:

Ao meu grande amor Guilherme Nonato o qual me deu suporte e sempre acreditou em mim, até nos momentos em que nem eu acreditava. Obrigada pelo incentivo de sempre seguir em frente e lutar para que tudo acontecesse, pela paciência em me esperar e estar ao meu lado nos muitos momentos em que não pude retribuí-lo, por suportar meus mau-humores, por compartilhar nossa maior alegria nessa época e por me ajudar a me tornar a pessoa que sou hoje.

A minha querida tia Cleomar Azevedo sem a qual não teria chego até aqui. Obrigada pelo “financiamento” e por acreditar que eu não te decepcionaria, você é minha maior inspiradora por toda sua história de vida e por mostrar que tudo é possível desde que a gente queira e corra atrás.

A minha amada Vozinha (D. Nena) pela vontade de viver para estar ao nosso lado e acompanhar mais essa vitória! Você é a minha força, o meu amor, a minha luz! Desculpe por causar tantas aflições ao me ver aflita e obrigada pelas orações, elas deram certo!

A minha família: mãe, irmãos, sobrinhos, cunhados, tios, primos, sogros, pela companhia, conversas..., em especial aos primos Juliano Rocha e Juliana Cardoso pela hospedagem na minha vinda para SP e ao priminho Leandro Rocha por dividir seu quartinho comigo.

E a todos que acreditaram em mim.

Índice

Resumo.....	X
Abstract.....	XII
Capítulo I - Introdução Geral e Objetivos	
Introdução geral.....	2
Objetivo geral.....	13
Objetivos específicos.....	13
Referências Bibliográficas.....	14
Capítulo II - Alterações nas brânquias causadas por exposição a alumínio e manganês em fêmeas vitelogênicas de <i>Astyanax bimaculatus</i> (Teleostei: Characidae)	
Resumo.....	24
Introdução.....	25
Materiais e métodos.....	27
Resultados.....	31
Discussão.....	41
Referências Bibliográficas.....	46
Anexos.....	54
Capítulo III - Efeitos do alumínio nos substratos energéticos de fêmeas do peixe neotropical dulcícola <i>Astyanax bimaculatus</i> (Teleostei: Characidae)	
Resumo.....	57
Abstract.....	57
Introdução.....	58
Materiais e métodos.....	59
Resultados.....	63
Discussão.....	72
Referências Bibliográficas.....	77
Anexos.....	84
Capítulo IV - Efeitos do manganês, e em associação com o alumínio, nos substratos energéticos de fêmeas vitelogênicas de <i>Astyanax bimaculatus</i> (Teleostei: Characidae)	
Resumo.....	100
Introdução.....	101
Materiais e métodos.....	102
Resultados.....	106
Discussão.....	116
Referências Bibliográficas.....	119
Anexos.....	126
Capítulo V- Discussão Geral e Conclusões	
Discussão geral.....	134
Conclusões.....	138
Referências Bibliográficas.....	140

Resumo

O impacto dos metais na fisiologia de peixes tem sido considerado preocupante, pois são contaminantes críticos nos ecossistemas aquáticos devido ao seu alto potencial de entrar no organismo, acumular-se e ser transferido na cadeia trófica. Muitos estudos têm demonstrado os efeitos dos metais sobre várias funções fisiológicas. Muitos rios, como o Paraíba do Sul, por exemplo, vem apresentando concentrações de alumínio (Al) e manganês (Mn) acima dos valores permitidos pela legislação Brasileira e, além disso, fatores abióticos tais como o pH, podem contribuir para alteração do potencial de toxicidade, podendo acarretar em danos à biota aquática. As respostas desencadeadas nos animais a estas mudanças ambientais podem levá-los a um estado de estresse, que é altamente energético devido à realocação de substratos inicialmente destinados às atividades de elevada demanda energética, como crescimento e reprodução, em direção às atividades que requerem intensificação para restaurar a homeostase. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos metais Al e Mn em pH ácido, isoladamente e em combinação, após 96 horas (teste agudo) nas brânquias e nos substratos energéticos de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* e, adicionalmente após um período de 96 horas em água limpa, verificar a habilidade dos animais em se recuperar na ausência destes metais. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais: CTR em pH neutro; pH ácido; Al; Mn; e Mn+Al (todos em pH ácido). Os dados mostram que quando expostos a estes metais isoladamente, a atividade Na^+/K^+ ATPase e a quantidade de células de cloreto foram diminuídas, no entanto quando combinados, estes efeitos não foram observados. O Al isolado e em associação com o Mn promoveu peroxidação de fosfolipídios de membrana. Além disso nos animais expostos aos dois metais juntos, houve um aumento de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e saturados (STA) acompanhado pela diminuição dos ácidos graxos polinsaturados (PUFA) o que pode ter evitado alterações na atividade de bomba e na quantidade de células de cloreto na combinação destes metais. Considerando-se os substratos metabólicos, a exposição ao Al diminuiu a concentração de proteínas nos ovários e no plasma, glicogênio muscular, além de alterar as porcentagens de MUFA e PUFA no fígado, e PUFA nos ovários. O Al também promoveu lipoperoxidação hepática, e no período de recuperação houve diminuição da concentração de lipídios em vários tecidos analisados. A exposição ao Mn promoveu diminuição das concentrações de proteínas totais em todos os tecidos analisados, seja no período de exposição agudo

ou de recuperação, não havendo a recuperação deste substrato no fígado e nos ovários; o Mn promoveu lipoperoxidação nos fosfolipídios das membranas do fígado e, em associação com o Al, pareceu interferir na dinâmica dos PUFA das membranas dos ovários. Várias interações foram observadas entre o Al e Mn, demonstrando casos de antagonismo, potenciação e até mesmo de sinergismo entre estes metais, dependendo da variável fisiológica analisada, evidenciando que a exposição de fêmeas vitelogênicas a estes metais pode ser prejudicial ao processo reprodutivo principalmente devido à ação observada, inclusive nos ovários.

Abstract

The impact of metals in fish physiology has been considered worrying due to their high potential of entering in the organism, to accumulate and be transferred through the food chain and many studies have shown the effects on several functions in animals, when exposed to these metals. Many rivers, as Paraíba do Sul, showed aluminum (Al) and manganese (Mn) concentrations above the values allowed by the Brazilian law and moreover abiotic factors, such as acidic water, can contribute to changing the toxicity potential and can result in damage to aquatic biota. The answers triggered by the animals to these environmental changes can lead to a stress state which has a high energetic cost due to the substrate reallocation, initially designated to activities with high energetic demand, as growth and reproduction, to activities that need to be intensified, to reestablish the homeostasis. The main goals of this study were to evaluate the effects of the metals Al and Mn in acidic pH, alone and in combination, during 96 hours (acute test) in the gills and in metabolic substrates in *Astyanax bimaculatus* vitelogenic females and, additionally, verify the ability of the animals to recover in the absence of the metals after the 96 hours in clear water. The animals were divided in 5 groups : CTR in neutral pH; acidic pH; Al; Mn; and Mn+Al in acidic pH. The results showed that when the animals were exposed to the isolate metals, there was a decrease in the Na^+/K^+ ATPase pump activity and in the amount of chloride cells, however when combined, these effects were not observed. Al, isolated or in association with Mn, promoted phospholipids peroxidation in gill membranes. Furthermore, in the animals exposed to both metals together, there were an increase in monounsaturated fatty acids (MUFA) and saturated fatty acids (STA) and decrease in polyunsaturated fatty acids (PUFA) which may have avoided alterations in pump activity and in the amount of chloride cells. In the metabolic substrates, Al exposition decreased plasma and ovaries protein concentration, muscle glycogen, and altered the percentage of MUFA and PUFA in the liver, and PUFA in the ovaries. Al also promoted liver lipoperoxidation, and in the recovery period lipid content decreased in most tissues analyzed. Mn exposition promoted a decrease in total protein content in all tissue analyzed, both in the acute and recovery periods, and there was no recovery of this substrate in liver and ovaries; Mn promoted lipoperoxidation in liver phospholipids and, in association with Al, interfered in the PUFA dynamic in ovaries membranes. Many interactions were observed between Al and Mn, evidencing antagonism, potentiation and also synergism,

depending on the physiologic variables analyzed, showing that the exposition of vitellogenic females to these metals can be harmful to reproductive process due to the observed actions, including in ovaries.

Capítulo 1

Introdução geral e objetivos

Introdução Geral

1. Poluição das águas

A água possui grande capacidade para dissolver quase todos os elementos e compostos químicos, sejam estes de origem natural do solo ou atmosfera, ou substâncias lançadas de forma inadequada pelo homem. Os corpos d'água recebem todos os tipos de despejos e efluentes oriundos de diversas fontes como a agricultura, indústria, esgoto doméstico e lixo urbanos. Devido a esses processos, a água contém várias substâncias dissolvidas, e dependendo da concentração destes compostos, estes podem ou não ser nocivos e comprometer sua utilização, além de causar problemas para os organismos nela residentes.

A poluição vem contribuindo para a alteração dos ecossistemas aquáticos. Toda a biota, inclusive a ictiofauna, é prejudicada pelo efeito danoso causado pelo lançamento de resíduos industriais e domésticos nos corpos d'água que, além de alterarem as características físicas, químicas e biológicas da água, acarretam em problemas de eutrofização, com efeitos negativos sobre os peixes e sobre a própria qualidade da água (Valentini, 1972; Machado, 1975; David et al., 2006). No Brasil, o Ministério da Saúde e o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) estabeleceram na portaria federal 518 (de 25 de março de 2004) e nas resoluções 357 (de 17 de março de 2005) e 430 (de 13 de maio de 2011) os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade de acordo com seu uso preponderante, prevê a utilização de indicadores biológicos e as condições e os padrões de lançamento de efluentes que assegurem e preservem a vida aquática.

Devido ao fato de muitos efluentes serem extremamente complexos em sua estrutura e sua interação com outros compostos presentes na água, se faz necessária uma caracterização adequada para o controle destes efluentes utilizando-se estudos integrados em análises físicas, químicas e ecotoxicológicas a fim de avaliar e prever os riscos ambientais que possam ocorrer (Bertoletti, 1990; Costan et al., 1993).

Embora muitos estudos venham sendo realizados para detectar a toxicidade em organismos aquáticos, com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas, muitos deles estabelecem os efeitos dos agentes tóxicos

isoladamente, não sendo consideradas as interações que cada substância pode sofrer com outros compostos presentes na água, potencializando ou reduzindo os efeitos nos organismos (Bertoletti et al., 1989).

Alguns dos fatores abióticos que podem interferir na ação de um contaminante são: pH, oxigênio dissolvido e temperatura. O pH influencia a dissociação dos compostos, em alguns casos as formas não dissociadas são as mais tóxicas, ao contrário dos metais que apresentam maior toxicidade em suas formas iônicas livres (Bradley e Sprague, 1985). Na natureza, uma questão importante em relação ao pH do meio, e que vem se agravando nos últimos anos, é a acidificação das águas, que constitui um problema ecológico em várias regiões do planeta, principalmente onde se encontram grandes aglomerações urbanas ou centros industriais. A chuva é considerada ácida quando apresenta pH inferior a 5,6 sendo seu caráter ácido associado a poluição atmosférica resultante da produção e emissão de gases, principalmente o dióxido de carbono e óxidos de nitrogênio, que são lançados por ações antrópicas e que sofrem as mais variadas reações em contato com a água (Jesus, 1996).

A diversidade e complexidade dos poluentes resultam em diversos efeitos biológicos que estão relacionados com a composição química de cada um, e ainda, considerando que há mais de um contaminante presente na água, além dos fatores abióticos envolvidos, pode haver interação entre eles com possíveis efeitos sinérgicos, antagônicos, de potenciação ou adição (Mozeto e Zagatto, 2006).

1.1 Metais

Os metais são considerados contaminantes críticos nos ecossistemas aquáticos devido ao seu alto potencial de entrar no organismo, acumular-se e ser transferido na cadeia trófica. Os níveis acumulados podem ser muito maiores do que aqueles encontrados no ambiente e pouco se sabe sobre os mecanismos de entrada, distribuição e seus efeitos exatos nos organismos aquáticos (Olojo et al., 2005; Erdogrul e Erbilir, 2007).

Os metais são elementos dependentes de outros fatores para determinar sua disponibilidade no ambiente e hoje, é bem conhecido que agentes complexantes são fundamentais para determinar a biodisponibilidade e toxicidade dos metais (Campbell, 1995). No ambiente aquático os metais podem se complexar a substâncias inorgânicas (cloretos, bicarbonatos, fosfatos), orgânicas (aminoácidos, lipídios) e complexos orgânicos tais como ácidos húmicos ou fúlvicos. Considera-se que estes ligantes possam

reduzir a biodisponibilidade dos metais por reduzir as concentrações de íons livres de metal, mas alguns estudos demonstram que tais ligantes podem facilitar o transporte através da membrana celular (Campbell, 1995).

1.1.1. Alumínio

O alumínio (Al) é o metal mais abundante representando 8% da crosta terrestre e o terceiro elemento mais abundante após o oxigênio e o silício. O Al é complexado em rochas e minerais, tais como silicatos e feldspatos e apesar de sua abundância, as concentrações de Al em águas doces são notavelmente baixas, no entanto, o Al é muito tóxico para os peixes. A complexidade química do Al na água doce tem sido um grande problema para compreender sua toxicidade em estudos de laboratório e de campo (Wilson, 2011).

O Al pode formar complexos com vários compostos orgânicos, como proteínas, lipídios, açúcares, ácidos húmicos e fúlvicos representados frequentemente por matéria orgânica dissolvida. Adicionalmente as espécies de Al inorgânico, tais como Al^{3+} , AlOH^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, em pH ácidos, são as mais tóxicas para os organismos (Gensemer e Playle, 1999). Na água este metal é pouco solúvel, mas a associação com outros compostos como, por exemplo, fluoretos, OH^- , H_2O , sulfatos, fosfatos e silicato, (Lydersen, 1990; Lydersen et al., 1990) pode promover a sua biodisponibilidade e caracterizar sua toxicidade.

A distribuição das várias formas de Al é dependente de temperatura e principalmente pH. Segundo Teien et al., (2006) o pH tem uma forte influência na especiação de metais podendo determinar a hidrólise, agregação, precipitação e competição de prótons por locais de ligação disponíveis. Concentrações significantes de Al dissolvido, bem como sua toxicidade, podem ser altamente limitadas a valores de pH menores que 6 ou maiores que 8. Sua insolubilidade em pH neutro não acarreta em problemas ecotoxicológicos na maioria dos ambientes aquáticos, no entanto, um aumento exponencial do Al em pH abaixo de 6 acarreta em potencial toxicidade à biota e é acentuado por ações antropogênicas como acidificação da água por exemplo, que acarreta não só nas situações de chuvas ácidas, mas também na aceleração da mobilização de metais dos minerais do solo e das rochas para a água (Wilson, 2011).

1.1.2 Manganês

O manganês (Mn) compreende cerca de 0,1% da crosta terrestre, e é um elemento que ocorre naturalmente em rochas, no solo e na água. Rochas da crosta terrestre são a principal fonte de Mn, além de incêndios florestais e atividade vulcânica. Grande parte do Mn dissolvido é oriundo de partículas de óxidos de Mn em ambientes anaeróbicos, lixiviação de matéria orgânica animal e vegetal e desgaste natural de Mn (II) dos minerais em ambiente ácido. A maior fonte antropogênica de Mn são as emissões de águas residuais municipais de esgoto, mineração, emissões de liga de aço, produção de ferro e combustão de combustíveis fósseis (Howe et al., 2004).

O Mn está presente no ambiente aquático principalmente nas espécies de Mn^{+2} e Mn^{+4} e a distribuição entre estas formas ocorre através de reações de oxidação e redução que podem ser mediados por ações bacterianas ou por fatores abióticos. Seu comportamento químico é fortemente regulado por pH e condições redox (Howe et al., 2004).

É um metal considerado essencial em muitas funções biológicas, sendo que, a forma divalente (Mn^{+2}), é a mais relevante nas funções biológicas. Nesta forma, este metal é transportado nas células e oxidado intracelularmente por reação com superóxidos a um estado trivalente (Mn^{+3}), estado que tem sido associado a citotoxicidade, especialmente para células dopaminérgicas (Archibald e Tyree, 1987). Além disso, já foram demonstrados os efeitos do Mn nas mitocôndrias, onde este metal parece inibir o complexo I, alterando a fosforilação oxidativa (Ali et al., 1995; Chen, et al., 2001).

Este metal tem papel fundamental em vários processos biológicos como no metabolismo de aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos, além disso, há muitas enzimas que são manganês-dependente incluindo as oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Alguns autores citam a participação deste metal na função das metaloenzimas como arginase, glutamina sintetase, fosfoenolpiruvato descarboxilase e manganês superóxido dismutase (Howe et al., 2004).

Além desta importante função como co-fator enzimático o Mn também está envolvido na função do sistema imune, regulação de glicose no sangue e energia celular, reprodução, digestão e mecanismos de defesa contra radicais livres (Freeland-Graves e Llanes, 1994; Keen et al., 1999). O Mn pode ser significativamente bioacumulado pela biota aquática e sua toxicidade dependerá da fase de vida e da espécie a ser afetada, além da dinâmica química da água (Howe et al., 2004).

2. Ecotoxicologia e Biomarcadores

Diante deste contexto, da importância de se interligar a composição de cada substância presente na água aos efeitos por ela causado, surgiu a necessidade de associar outras disciplinas à toxicologia que pudessem identificar os reais efeitos desta combinação, e na década de 70 os testes toxicológicos começaram a integrar conceitos de Ecologia no que se diz respeito à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas. E em 1977 o termo Ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez e definido como: *“ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticas, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado”* (Truhaut, 1977).

A Ecotoxicologia, como na maioria das outras ciências, suporta aspectos de outras disciplinas e um vasto campo de aplicação, como por exemplo, a Fisiologia que tem sido uma ferramenta bastante utilizada para avaliar, quantificar e prever os efeitos biológicos e determinar a probabilidade de ocorrência e o nível de contaminação dos poluentes sob diferentes condições ambientais (Rand, 1995).

Um dos desafios da Ecotoxicologia é identificar os efeitos dos poluentes em respostas biológicas, antecipadamente, nos primeiros níveis de organização biológica (molecular e celular), a fim de prever os efeitos quando ainda são reversíveis facilitando a conservação do ecossistema (Mozeto e Zagatto, 2006). Os efeitos deletérios na população são difíceis de detectar, pois muitos dos efeitos tendem a se manifestar somente após longos períodos de tempo e, quando finalmente torna-se claro, o processo de intoxicação pode ter ido além do ponto de reversão por ações de remediação ou redução de risco (Bayne et al., 1985). Para tanto, existem ferramentas denominadas biomarcadores, definidos como: *“qualquer tipo de interação entre um sistema biológico e algum agente físico, químico ou biológico que possa provocar algum grau de toxicidade”*, que podem auxiliar os estudos e antecipar as respostas (WHO, 1993).

Nenhum corpo d'água pode ser considerado em condições satisfatórias se nele não viverem e proliferarem organismos aquáticos (Heath, 1995). Dentro deste contexto os peixes são um modelo muito importante para se avaliar o real estado de conservação do ambiente aquático (Rand, 1995), pois estão em todos os tipos de ambientes aquáticos

e têm um papel ecológico fundamental por serem carreadores de energia no sentido ascendente na cadeia trófica (Beyer, 1996).

Os peixes podem ser bioindicadores de várias etapas do processo de avaliação dos riscos: efeito, exposição, caracterização ou classificação do risco e acompanhamento da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos e ainda os biomarcadores, se bem caracterizados, podem ser utilizados como ferramentas para a avaliação da biodisponibilidade dos contaminantes e a extensão dos danos causados pela exposição (McCarthy, 1990). O impacto dos poluentes no crescimento, sobrevivência e fertilidade de peixes tem causado preocupação, já que alguns estudos têm demonstrado os efeitos sobre o metabolismo intermediário e crescimento em peixes expostos a metais por longos períodos (Hontela, 1997; Sherwood et al., 2000).

3. Fisiologia e Estresse

A presença de compostos químicos no ambiente aquático pode desencadear diversas respostas fisiológicas. Em peixes, as primeiras alterações se dão principalmente nas brânquias, que são o sítio primário de ação dos metais, devido a sua grande superfície de contato e permeabilidade tornando-a altamente suscetível às variações ambientais (Wendelaar Bonga, 1997). As brânquias possuem diversas funções nos peixes. Além de ser o principal órgão responsável pelas trocas gasosas e excreção de compostos nitrogenados atuam na regulação do equilíbrio ácido básico, na regulação iônica e osmótica (Mayer-Gostan et al., 1987; Poleksic e Mitrovic- Tutundzic, 1994; Heath, 1995; Goss et al., 1998; Hwang e Lee, 2007).

A efetividade das trocas gasosas depende inteiramente da integridade do tecido branquial, que inclui a espessura da barreira de difusão água-sangue, a constante de ventilação, fluxo sanguíneo e a integridade da membrana celular e seus constituintes (Sakuragui et al., 2003). Muitos agentes estressores afetam a estrutura branquial e, direta ou indiretamente, as trocas gasosas e o balanço hidromineral, responsáveis pela vulnerabilidade destes animais em águas poluídas (Schwaiger et al., 1997; Wendelaar Bonga, 1997). Uma das funções afetadas diretamente é a osmorregulação, que é essencial para a sobrevivência de peixes dulcícolas, uma vez que o ambiente em que vivem proporciona um alto gradiente iônico, favorecendo as perdas de íons acarretando em distúrbios no balanço iônico (Wendelaar Bonga e Lock, 2008).

Distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica podem ser indicadores de estresse em peixes. Estas alterações podem ser desencadeadas juntamente com outras ao

serem expostos a uma condição desfavorável. A este conjunto se dá o nome de estresse, que segundo Wendelaar Bonga (1997) pode ser definido como: *“uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo, ou homeostase, é ameaçado ou perturbado em decorrência da ação de estímulos intrínsecos denominados estressores”*. A ação dos estressores é dupla, além de produzirem efeitos que ameaçam ou perturbam o equilíbrio homeostático, promovem um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas a fim de desencadear ações compensatórias.

Essas respostas representam a percepção de um estado alterado o qual gera respostas neuroendócrinas que desencadeiam uma série de reações. A princípio ocorre uma rápida liberação de hormônios na circulação: as catecolaminas que são liberadas a partir do tecido cromafim localizado no rim cefálico (anterior) e também das terminações dos nervos adrenérgicos (Iwama et al., 2006), e o cortisol que é liberado a partir do tecido interrenal, localizado também no rim anterior em resposta a vários hormônios hipofisários, principalmente o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Em um segundo momento a ação destes hormônios promove vários ajustes bioquímicos e fisiológicos resultando em alterações hematológicas, osmoiônicas e metabólicas (Wendelaar Bonga, 1997; Iwama et al., 2006).

A resposta ao estresse é um processo que requer muita energia do organismo e seu aspecto central é a realocação de substratos para longe de atividades de alta demanda energética, como crescimento e reprodução, e em direção a atividades que requerem intensificação para restaurar a homeostase, tais como respiração, locomoção, balanço hidromineral e reparação de tecidos. Toda esta dinâmica pode reduzir consideravelmente a capacidade de desempenho do animal, crescimento e reprodução e dependendo da duração do estressor as respostas fisiológicas podem perder seu valor compensatório e tornar-se disfuncional acarretando em danos permanentes à integridade do animal (Mommensen et al., 1999).

Umas das fases do ciclo de vida do animal que requer uma alta demanda energética é a reprodução. O período reprodutivo pode ser considerado como uma fase muito delicada, devido aos inúmeros processos fisiológicos envolvidos e em qualquer momento, pode sofrer influências de estressores, sejam eles, físico, químico ou biológico. Além disso, os estressores podem produzir respostas diferentes em distintos estágios de maturação, afetando negativamente a qualidade dos gametas e podendo influenciar inclusive a prole, ou em outros casos, acelerando ou retardando o processo reprodutivo (Schreck et al., 2000).

A reprodução em peixes é regulada por um eixo neuroendócrino composto pelo hipotálamo – hipófise – gônadas modulado por estímulos externos, tais como: chuvas, temperatura, substâncias químicas presentes na água, dentre outros. Estes estímulos são percebidos por órgãos sensoriais e convertidos em sinais eletroquímicos, transmitidos via neurônios sensoriais até o hipotálamo. O hipotálamo sintetiza e secreta um neurohormônio, o GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas), que estimula as células gonadotrópicas, na hipófise, a iniciar a síntese e liberação do FSH (hormônio folículo estimulante) na corrente sanguínea. O FSH chega às células foliculares e células da teca dos oócitos em desenvolvimento, convertendo o colesterol em testosterona (T), que transportada às células da granulosa, é aromatizada pela enzima aromatase, ao estrógeno 17β -estradiol (E_2) (Nagahama et al., 1991).

O E_2 age no fígado (via corrente sanguínea), estimulando a síntese de vitelogenina (glicolipofosfoproteína) que será “incorporada” pelo oócito por meio de micropinocitose, promovendo assim o crescimento do oócito e a incorporação do vitelo. (Lubzens et al., 2010). Após o crescimento do oócito, a hipófise passa a sintetizar e liberar o LH (hormônio luteinizante) e, após sua ligação ao seu receptor nas células foliculares, o folículo ovariano irá iniciar o processo de amadurecimento final, que atuará na maturação final e ovulação destes oócitos (Nagahama et al., 1991).

Entre os efeitos dos poluentes metálicos sobre este eixo endócrino, os desajustes hormonais e metabólicos acarretam em sérias perturbações sobre a reprodução, podendo-se destacar diminuição de progestágenos plasmáticos (Correia et al., 2010) e gonadotropinas hipofisárias (Narcizo, 2009). Em *Oncorhynchus mykiss* houve elevação e/ou diminuição dos níveis de esteróides fora do período reprodutivo e inibição da síntese de gonadotropinas, com simultâneo bloqueio sobre as gônadas de responderem à ação destes hormônios (Cooney, 1995). Outro ponto importante na reprodução de peixes teleósteos é a síntese hepática de vitelogenina, responsável pela maturação do ovo e nutrição do embrião e que pode ser afetada por metais (Mugiya e Tanahashi, 1998).

A Fisiologia da conservação busca entender os mecanismos e os limites pelos quais se atinge a estabilidade nos organismos, e as vias utilizadas para ajustar as respostas e diminuir o estresse, levando à sobrevivência e, se possível, a reprodução dentro de um ambiente desfavorável (Wikelski e Cooke, 2006). Avaliar o custo energético associado a estes ajustes, possibilita estabelecer a causa e o efeito dos agentes estressores e as respostas do organismo nos diferentes níveis de organização

biológica, pois observar as mudanças antecipadamente reflete mais fielmente a complexidade da ação do contaminante no ambiente (Clements, 2000; Carlisle, 2000).

4. Modelo experimental e a problemática ambiental

4.1 *Astyanax bimaculatus*

O *A. bimaculatus*, popularmente conhecido como lambari do rabo amarelo (Linnaeus, 1758) (Figura 01) é uma espécie de pequeno porte que atinge de 10 a 15 cm de comprimento, podendo chegar a 60 gramas de massa corpórea; seu crescimento é rápido, chegando à maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade (Porto-Foresti et al., 2001). Pertence a família Characidae, a qual engloba a maior parte dos peixes de água doce, com cerca de 30 subfamília e aproximadamente 250 gêneros na América do Sul.

Figura 01. Lambari do rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*).

Esta espécie é importante componente da ictiofauna devido a sua posição no início da cadeia trófica (Pavanelli e Caramaschi, 1997). É uma espécie onívora e considerada oportunista devido a sua capacidade de colonizar diferentes habitats. Possui desova do tipo total entre os meses de novembro e fevereiro (Agostinho, 1995) e seu sucesso reprodutivo em ambiente natural, é atribuído à plasticidade nas estratégias reprodutivas, variando as táticas de acordo com as condições do ambiente. Características como estas citadas acima, consideram *A. bimaculatus* como uma espécie resistente à variações na qualidade ambiental (Bailly et al., 2005.)

Astyanax bimaculatus é considerado “um complexo” que compreende 21 espécies e subespécies que devido a sua ampla distribuição geográfica e a semelhança morfológica entre elas, promove uma dificuldade entre os pesquisadores de compreender o grau de parentesco entre estas espécies. Por conta disso, a classificação taxonômica *A. bimaculatus* vem sendo questionado em algumas revisões filogenéticas

como não correspondendo a apenas uma espécie (Melo, 2001). Garutti e Britski (2000) denominaram a espécie do gênero *Astyanax* ocorrente no rio Tiête e seus afluentes como *A. altiparanae* porém, muita discussão ainda cerca este assunto devido a escassez de trabalhos filogenéticos que comprovem a diferenciação genética, em diferentes regiões em que esta espécie ocorre, dentre elas no rio Paraíba do Sul. E ainda sim, trabalhos recentes têm sido publicados com esta espécie mostrando que, talvez, espécies diferentes podem estar sendo citadas com o mesmo nome (Melo, 2001). Diante da falta de dados que comprovem tais nomenclaturas, neste trabalho será mantida a classificação *A. bimaculatus*.

4.2 A problemática ambiental

Levantamentos ictiológicos no Rio Paraíba do Sul registraram cerca de 160 espécies de água doce, dentre estas, muitas são endêmicas (só vivem nesta região). A maioria das espécies pertence à ordem dos Siluriformes, como bagre-guri (*Genidens genidens*), mandi (*Pimelodella eigenmanni*) e surubim-do-paraíba (*Steindachneridion parahybae*). O segundo grupo em espécies é o dos Characiformes, como lambari (*Astyanax sp.*), traíra (*Hoplias malabaricus*), piabanha (*Brycon insignis*), curimatã (*Prochilodus lineatus*) dentre outros (Hilsdorf e Petrere, 2002).

A piscicultura mantida pela CESP de Paraiuna, com a finalidade de apoiar a pesquisa e realizar o repovoamento de espécies em risco do Paraíba do Sul, produz anualmente cerca de 530.000 alevinos de seis espécies de peixes, incluindo o lambari (*Astyanax sp.*) (CESP, 2012). Os animais utilizados neste estudo foram doados por esta piscicultura, sendo que as matrizes são originadas do rio Paraíba do Sul.

A Bacia do Rio Paraíba do Sul possui uma área total de 56500km² e é considerada, em superfície, uma das três maiores bacias hidrográficas secundárias do Brasil. O Rio Paraíba do Sul é um rio de jurisdição federal, pois se estende por três estados da Federação: São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro percorrendo um total de 1.120Km. Nessa condição, desde a década de 80, a gestão ambiental do rio Paraíba do Sul é feita pelo Comitê Executivo de Estudos Integrados da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul - CEIVAP (Decreto nº 87.561/82), tendo sido revitalizada, posteriormente, com a aprovação da Lei nº 9433/97, da Política Nacional de Recursos Hídricos (CEIVAP, 2012).

A considerável expansão demográfica e o intenso desenvolvimento industrial nestas regiões refletiram diretamente na qualidade das águas do rio Paraíba do sul, além

de ser a única fonte de abastecimento público de água de muitas regiões, é utilizado para produção de energia elétrica. Tais atividades são suportadas pelas diversas represas presentes ao longo do rio, dentre elas, e uma das maiores, é a de Paraibuna/SP mantida pela CESP (Companhia Energética de São Paulo) que mantém uma piscicultura para trabalhos de repovoamento de espécies comprometidas e até ameaçadas de extinção devido as atividades já citadas.

A ocorrência de desmatamentos nas margens da bacia é o principal responsável pelo assoreamento e ao mesmo tempo, esta bacia é susceptível a receptação de poluição devido a concentração de indústrias de grande potencial poluidor que, hoje compreende cerca de 5200 unidades lançando efluentes no rio e muitas vezes sem o devido tratamento. Além disso, a sua localização, próxima a grandes rodovias como a Presidente Dutra facilita a instalação tanto de indústrias quanto de populações (INEA, 2012).

Desde os últimos anos, este rio vem apresentando concentrações de Al e Mn não compatíveis com os valores permitidos pela legislação Brasileira (CONAMA, Resolução 357/2005) de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para Alumínio dissolvido e manganês total (CETESB, 2008, 2009, 2010). O último relatório publicado pela Companhia Ambiental de São Paulo (CETESB, 2011) mostra que dos 20 pontos analisados ao longo deste rio no Estado de São Paulo, 18 pontos apresentam alterações nos valores considerados ideais para a sobrevivência da vida aquática, valores estes que variam de 0.16 a 1.22 mg.L^{-1} para o Al dissolvido e 0.11 a 2.7 mg.L^{-1} para o Mn total.

Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos dos metais (Al e Mn) isolados, ou associados, nas funções das brânquias e nos substratos energéticos de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characiformes), assim como a sua capacidade de recuperação de possíveis efeitos adversos destes metais.

Objetivos específicos

- 1) Verificar se a exposição ao Al e/ou Mn, isoladamente ou combinados, promove alterações funcionais nas brânquias de fêmeas vitelogênicas de *A. bimaculatus*, avaliando atividade da Na^+K^+ ATPase e anidrase carbônica, quantidade de células de cloreto e composição de ácidos graxos das membranas celulares branquiais;
- 2) Avaliar o efeito do Al e do Mn, isoladamente ou combinados, na concentração de proteínas, carboidratos e lipídios nos principais tecidos de armazenamento de substratos energéticos;
- 3) Avaliar a capacidade de recuperação quando mantidos em condições ideais, ou seja, na ausência dos metais depois de um período de exposição;
- 4) Avaliar se a exposição de fêmeas vitelogênicas ao Al e ao Mn individualmente, provoca efeitos semelhantes ou não, aos efeitos causados pela exposição aos dois metais combinados.

Referências Bibliográficas

- Agostinho, C.A., Molinari, S.L., Agostinho, A.A., Verani, J.R., 1984. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L.) (Osteichthyes-Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. Rev. Brasil. Biol. 44(1), 31-36.
- Ali, S.F., Duhart, H.M., Newport, G.D., Lipe, G.W., Slikker, W., Jr. 1995. Manganese-induced reactive oxygen species: Comparison between Mn^{+2} and Mn^{+3} . Neurodegeneration 4(3), 329– 334.
- Archibald, F.S., and Tyree, C. 1987. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. Arch.Biochem. Biophys. 256(2), 638–650.
- Bailly, D., Agostinho, A. A., Suzuki, H. I., Luiz, E. A. 2005. Características reprodutivas de espécies de *Astyanax* e sucesso com a colonização de reservatórios do rio Iguaçu, PR. In: Rodrigues, L.; Thomaz, S. M.; Agostinho, A. A.; Gomes, L. C. (Org.). Biocenoses em reservatórios: padrões espaciais e temporais. São Carlos: Rima Editora, 2005, p. 243-252.
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.A., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., R. Widdings, J. 1985. The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals. Praeger, New York, USA.
- Bertoletti, E., Gherard Goldestein, E., Nipper, M.G. 1989. Toxicidade de efluentes industriais na grande São Paulo. Revista DAE 49 (155), 63-70.
- Bertoletti, E. 1990. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais na grande São Paulo. Ciência e Cultura 42 (3/4), 271-277.
- Beyer, J. 1996. Fish biomarkers in marine pollution monitoring; evaluation and validation in laboratory and field studies. Academic thesis, University of Bergen, Norway.

- Bradley, R.W. and Sprague, J.B. 1985. The Influence of pH, Water Hardness, and Alkalinity on the Acute Lethality of Zinc to Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquatic Sci. 42(4), 731-736.
- Brasil DECRETO N° 87.561, de 13 de setembro de 1982. Dispõe sobre as medidas de recuperação e proteção ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, e dá outras providências. Disponível em: http://omnia.aggile.net/arquivos/legislacao/arquivo/DECRETO%20N%2087_8027.561-13%20_8027.09_8027.1982_8027.PDF. Acesso em 15/09/2012.
- Brasil. LEI N° 9.433, de 8 de Janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1° da Lei n° 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei n° 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/19433.htm. Acesso em 15/09/2012.
- Brasil. PORTARIA N° 518/GM de 25 de março de 2004. Dispõe sobre os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>. Acesso em 18/08/2012.
- Campbell, P.G.C. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the Free-Ion Activity Model. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley and Sons, UK, Chichester, pp. 45–102.
- Carlisle, D.M. 2000. Bioenergetic food webs as a means of linking toxicological effects across scales of ecological organisation. J. Aquat. Ecos. Stress Rec.. 7, 155-165.

CEIVAP (Comitê de Integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul). Plano da Bacia do Rio Paraíba do Sul. Disponível em: http://www.ceivap.org.br/gestao_2.php. Acesso em 05/08/2012.

CESP Companhia Energética São Paulo. Disponível em: http://www.cesp.com.br/portalCesp/portal.nsf/V03.02/MeioAmbiente_PesqueiroTexto?OpenDocument. Acesso em:09/08/2012.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 2008 + anexos (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103) Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>. Acesso em: 25/03/2009.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 2009 + anexos (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103) Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>. Acesso em:05/04/2010.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 2010 + anexos (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103) Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>. Acesso em:10/08/2011.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 2011 + anexos (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103) Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>. Acesso em:16/06/2012.

Chen, J.Y., Tsao, G.C., Zhao, Q., Zheng, W. 2001. Differential cytotoxicity of Mn(II) and Mn(III): Special reference to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 175(2),160–168.

Clements, W.H. 2000. Integrating effects of contaminants across level of biological organization: an overview. J. Aquatic Ecos. Stress Rec. 7, 113-116.

- CONAMA, 2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> acesso em:16/06/2012.
- CONAMA, 2011. Resolução número 430, de 13 de maio de 2011. Ministério do Meio Ambiente. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646> Acesso em:11/04/2012.
- Cooney, J. D. 1995. Fresh water tests. In: Rand, G. M. (Ed). Fundamentals of Aquatic Toxicology, Pp. 1125.
- 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. 151 C, 461-466.
- Costan, G., Berminchan, N., Blaise, G., Ferard, J.F. 1993. Potential ecotoxic effects probe (PEEP): a novel index to asses and compare the toxic potential of industrial effluents. Environmental Toxicology and Water Quality: an International Journal 8, 115-140.
- David, G.S., Carvalho, E.D., Novaes, J.L.C., Biondi, G.F. 2006. A tilápia do rio Tietê- Desafios e contradições da pesca artesanal de tilápias nos reservatórios hipereutróficos do médio rio Tietê. Revista Panorama da Aquicultura, 16(97).
- Erdoğan, Ö., Erbilir, F. 2007. Heavy metal and trace elements in various fish samples from Sir Dam Lake, Kahramanmaraş, Turkey. Environ. Monit. Assess. 130, 373–379.
- Freeland-Graves, J.H., and Llanes, C. 1994. Models to study manganese deficiency, in Manganese in Health and Disease, KLIMIS-TAVANTZIS, D.J., ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 59–86.
- Garutti, V. e Britski, H.A. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies

do gênero na bacia. Comunicações do Museu Ciência e Tecnologia, Série Zoologia 13, 65-88.

Gensemer, R.W. and Playle, R.C. 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 29, 315–450.

Goss, G., Perry, S., Fryer, J., Laurent, P. 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 119 A, 107–115.

Heath, A. G. 1995. Water pollution and fish physiology. Boca Raton; CRC Press, 359p.

Hilsdorf, A.W.S., Petrere, M.J. 2002. Conservação de peixes na Bacia do Rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje* 30, 62-64.

Hontela, A. 1997. Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroids hormones. *Rev. Toxicol.* 1,1-46.

Howe, P., Malcolm, H., Dobson, S., 2004. Manganese and its compounds: Environmental aspects. World Health Organization. Geneva, 2004. p. 63.

Hwang, P.P. and Lee, T.H. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 148A, 479–497.

INEA (Instituto Estadual do Ambiente). Disponível em <http://www.inea.rj.gov.br/fma/bacia-rio-paraiba-sul.asp>. Acesso em: 16/07/2012.

Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M., 2006. Stress in fish. In: AquaNet Workshop on Fish Welfare, Campbell River, B.C., Canada, September 27, pp. 1–9.

Jesus, E.F. 1996. A importância do estudo das chuvas ácidas no contexto da abordagem climatológica. *Sitientibus*, Feira de Santana, 14, 143-153.

- Keen, C.L., Ensunsa, J.L., Watson, M.H., Baly, D.L., Donovan, S.M., Monaco, M.H., Clegg, M.S. 1999. Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology* 20 (2–3), 213–223.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J. 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 367-389.
- Lydersen, E. 1990. The solubility and hydrolysis of aqueous aluminium hydroxides in dilute fresh waters at different temperatures. *Nord. Hydrol.* 21, 195-204.
- Lydersen, E.B., Salbu Pole, A.B.S., Muniz, I.P. 1990a. The influence of temperature on aqueous aluminium chemistry. *Water Air Soil Pollution* 5 (I), 203- 215.
- Machado, C.E.M. 1975. Grandes barragens e meio ambiente; dois aspectos importantes. São Paulo, CESP, 50p.
- Mayer-Gostan, N. Wendelaar Bonga, S.E., Balm, P.H.M., 1987. Mechanisms of hormone actions on gill transport. *Vertebrate Endocrinology Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press. 527p.
- McCarthy, J.F. 1990. Implementation of a biomarker-based environmental monitoring program. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R.(Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 429-440.
- Melo, F.A.G. 2001. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854), (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos. *Arquivos do Museu Nacional*, 59: 1-46.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268.
- Mozeto, A. A. e Zagatto, P. A. 2006. Introdução de Agentes químicos no ambiente. In: Zagatto, P.A. e Bertoletti, E. (Eds.) *Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, 15 – 38p.

- Mugiya, Y. and Tanahashi, A. 1998. Inhibitory Effects of Aluminium on Vitellogenin Induction by Estradiol-17 β in the Primary Culture of Hepatocytes in the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 109, 37-43.
- Nagahama Y., Kanamori A., Yoshinuki, N. 1991. Developmental changes in steroidogenic responses of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 72, 13–24.
- Nagahama. Y. 1997. 17 α , 20 β , dihydroxy – 4 – pregnen – 3 – one, a maturation inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. Steroids, 62, 190- 196.
- Narcizo, A.M. 2009. Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.82p.
- Olojo, E.A.A., Olurin, K.B., Mbaka, G., Oluwemimo, A.D. 2005. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. Afr. J.Biotechnol. 4 (1), 117–122.
- Pavanelli, C.S. and Caramaschi, E.P. 1997. Composition of the ichthyofauna of two small tributaries of the Paraná river, Porto Roci, Paraná State, Brazil. Ichthyol. Explor. Freshw. 8(1), 23-31.
- Poleksic, V.; Mitrovic-Tutundzic, V. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, p. 339-352.
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Foresti, F., Castilho-Almeida, R.B. 2001.Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. Panorama da Aqüicultura, 11(67), 15-19.

- Rand, G.M. 1995. Fundaments of aquatic toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment. Taylor & Francis, Washington, DC. 912p.
- Sakuragui, M. M., Sanches, J. R., Fernandes, M. N. 2003. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. J. Comp. Physiol. 173 B, 309-317.
- Schreck, C.B., 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: Moberg, G.P., Mench (Eds.), The biology of animal stress. CAB International, Wallingford, pp. 147–158.
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebshorn, R.. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. J. Aquat. Ecosys. Stress and Recovery 6, 75-86.
- Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., Rowan, D.J., Brodeur, J., Hontela, A. 2000. Bionergetic costs of heavy metal exposure in yellow perca (*Perca flavescens*) in situ estimates with a radiotracer. (137Cs) technique. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 441-450.
- Teien, H.C., Kroglund, F., Salbu, B., Rosseland, B.O., 2006. Gill reactivity of aluminium species following liming. Sci. Total Environ. 358, 206–220.
- Truhaut, R. 1977, "Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives", Ecotoxicology and Environmental Safety 1(2), 151–173.
- Valentini, H. 1972. Considerações sobre a pesca no estado de São Paulo. Biol. Inst. Pesca série de Divulgação, São Paulo 1, 1-28.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77, 591–625.

- Wendelaar Bonga, S.E. and Lock, R.A.C. 2008. The osmoregulatory system. In: Di Giulio, R.T. e Hilton, D.E. (Eds). *The Toxicology of Fishes*. New York, CRC Press. 8, 401-415.
- Wikelski M. and Cooke, S.J. 2006. Conservation Physiology. *Trends Ecol.Evol.* 21, 38-46.
- Wilson, R.W. 2011. Aluminum. In: Wood, C., Farrel, A.P., Brauner, C.J (Eds.). *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*, Volume 31B. Academic Press 1 edition.528p.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS) .1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.

Capítulo 2

*Alterações nas brânquias causadas por exposição a alumínio
e manganês em fêmeas vitelogênicas de *Astyanax
bimaculatus* (Teleostei: Characidae)*

Resumo

Os distúrbios causados pela exposição aos metais em peixes neotropicais são pouco estudados. O alumínio (Al) e o manganês (Mn) têm sido descritos como perturbadores respiratórios, osmorregulatórios e endócrinos, acarretando em problemas fisiológicos inclusive na reprodução de fêmeas de peixes. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar algumas variáveis branquiais de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* expostas ao Al, Mn e adicionalmente aos dois metais em combinação em experimento agudo após 96 horas, seguidos de um período de recuperação em água limpa por mais 96 horas. Os dados mostram que quando expostos a estes metais isoladamente, a atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase e a quantidade de células de cloreto foram reduzidas e o Al isolado e em associação com o Mn promove peroxidação de fosfolípidios de membranas. Os ácidos graxos não se alteraram nas brânquias dos animais dos grupos expostos ao Al e ao Mn, enquanto que nos animais expostos aos dois metais juntos, houve um aumento nos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e saturados (SAT) acompanhado pela diminuição nos polinsaturados (PUFA) durante o teste agudo não sendo observado alterações na atividade de bomba e na quantidade de células de cloreto, no entanto houve lipoperoxidação causado pela presença do Al no meio. No período de recuperação, enquanto nos animais de todos os grupos, incluindo o controle, as membranas apresentaram menor quantidade de PUFA, os animais do grupo Al+Mn mostraram maior porcentagem destes ácidos graxos. Sugere-se que os metais são tóxicos para as brânquias podendo comprometer as funções branquiais e quando os animais são expostos aos metais em combinação parece haver um efeito antagônico que possibilita manter a atividade da bomba e a quantidade de células de cloreto com o rearranjo da composição da membrana.

1. Introdução

O estresse é uma condição na qual o equilíbrio dinâmico do organismo é ameaçado ou prejudicado como resultado da exposição a agentes estressores. Perturbações no equilíbrio hídrico e na homeostase iônica são características de estresse em peixes, isso devido à estreita relação de contato entre as brânquias e o ambiente aquático (Wendelaar Bonga, 1997). Nos peixes de água doce, as brânquias são os órgãos principais de absorção de íons, além de serem responsáveis pela respiração, equilíbrio ácido básico e excreção de compostos nitrogenados. A manutenção da concentração iônica interna é essencial para as funções celulares e requer regulação ativa das taxas de fluxo de água e íons (Martinez e Cólus, 2002).

Em peixes teleósteos as brânquias são compostas por oito arcos branquiais (quatro a quatro lateralmente) no interior da cavidade orofaríngea protegida do meio externo pelo opérculo. Em cada arco branquial se estendem prolongamentos denominados filamentos branquiais ou lamelas primárias e, em cada filamento, tanto acima quanto abaixo de seu eixo longitudinal, há lamelas transversais ou secundárias onde ocorrem as trocas gasosas; o fluxo sanguíneo se dá por contracorrente ao fluxo de água por entre estas estruturas (Evans et al., 2005).

Os tipos celulares que compõem o epitélio branquial estão distribuídos pelo tecido de acordo com sua função. Dentre eles estão as células indiferenciadas, neuroepiteliais, células mucosas, células pavimentosas e as células de cloreto; estas últimas são células ricas em mitocôndrias, em bombas de Na^+K^+ ATPase, Ca^{+2} ATPase e H^+ ATPase, além de possuir canais de Ca^{+2} e Na^+ e trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+ que estão presentes principalmente nos filamentos, mas em algumas situações, podem ser encontrados nas lamelas e são considerados os principais locais de absorção ativa de íons sódio (Na^+), cloreto (Cl^-) e cálcio (Ca^{+2}) em peixes de água doce, desempenhando um papel essencial na manutenção do equilíbrio iônico (Bindon et al., 1994; Evans et al., 2005).

Todas estas atividades são, de alguma forma, moduladas pela estrutura das membranas celulares, e estas são estudadas em diversos contextos biológicos (Hazel e Williams, 1990). As longas cadeias de ácidos graxos polinsaturados presentes nas membranas plasmáticas desempenham um papel significativo na bioquímica das membranas e têm um impacto direto sobre processos mediados por estas, tais como osmorregulação, transporte (Ratnayake e Ackman, 1979; Hulbert e Else, 1999),

modulação da atividade de vários canais iônicos, além de serem precursores de eicosanóides (Bell et al. 1986, Agaba et al., 2005).

Alterações nas características físicas e químicas da água resultam em mudanças nas células do epitélio branquial e podem resultar em interrupção de suas funções (Exley et al., 1991; Gensemer e Playle, 1999), enquanto que a inibição da absorção de íons resulta em danos ou alterações das células de cloreto (Jagoe e Haines, 1997) e comprometimento da atividade da Na^+/K^+ ATPase (NKA) (Staurnes et al., 1993, 1996; Kroglund e Staurnes, 1999). Este órgão representa a barreira entre o meio externo e interno e é altamente suscetível às mudanças ambientais, sendo considerado órgão-alvo para os efeitos imediatos dos produtos químicos diluídos na água (Wendelaar Bonga e Lock, 2008).

Os compostos químicos encontrados nos ambientes aquáticos pertencem a inúmeras classes, dentre elas os metais, e se comportam de diferentes maneiras, dependendo do tipo de ambiente (água doce, marinho ou estuário). Além disso, o ambiente aquático contém mais de um contaminante e isso pode levar a interações que intensificam ou atenuam os efeitos toxicológicos. Muitos metais são considerados essenciais para o organismo como o manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu), e outros são considerados como não essenciais e altamente tóxicos como o alumínio (Al) e o mercúrio (Hg), mas apesar desta distinção, todos eles são tóxicos em altas concentrações (Mozeto e Zagatto, 2006).

O Mn é um metal essencial para todos os organismos, incluindo os peixes, (Gatlin e Wilson, 1984; Maage et al., 2000) porque desempenha importantes funções fisiológicas como componente de várias metaloenzimas e como cofator de muitas enzimas (Underwood, 1977; Cossarini-Dunier et al., 1988). O excesso de Mn, no entanto, pode exercer efeitos negativos, incluindo a interrupção do balanço de sódio (Gonzalez et al., 1990), o comprometimento da absorção de cálcio (Reader et al., 1988) além de impactos sobre o metabolismo (Nath e Kumar, 1987; Barnhoorn et al., 1999).

Quanto ao Al, não há pesquisas que comprovem suas funções biológicas, devido a isso, alguns estudos têm sido desenvolvidos devido aos efeitos da chuva ácida na biodisponibilidade deste metal (Filipek et al., 1987). Estudos sobre a toxicidade do Al em peixes mostram sua maior solubilização em pH ácido devido às suas características físicas, tornando-o mais solúvel e potencialmente mais tóxico para a biota aquática (Gensemer e Playle, 1999).

Estudos realizados com diferentes espécies de peixes têm revelado que o Al pode induzir efeitos tóxicos por perturbar processos bioquímicos (Poleo e Hyttert, 2003), fertilidade (Keinanen et al., 2003), crescimento e reprodução (Vuorinen et al., 2003; Narcizo, 2009; Correia et al., 2010), além de causar efeitos no equilíbrio osmorregulatório, atribuídos a incapacidade dos peixes em manter o equilíbrio osmorregulatório e respiratório devido a precipitação do Al na mucosa branquial (IPCS, 1997; Camargo et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi verificar se a exposição ao (1) Al e ao Mn isoladamente ou (2) em combinação, promove alterações funcionais nas brânquias de fêmeas vitelogênicas de *A. bimaculatus*, avaliando a atividade de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase e Anidrase carbônica, composição de ácidos graxos de membrana e quantidade de células de cloreto.

2. Materiais e métodos

2.1 Modelo e desenho experimental

Os ensaios toxicológicos foram realizados em condições artificiais em laboratório, sendo assim, a água utilizada nestes ensaios foi previamente analisada para determinação dos parâmetros necessários para um estudo ecotoxicológico. Além disso, a água foi filtrada com filtros de celulose (IMPAC® – CEP 10, São Paulo, SP, Brasil e Acqualimp® FICZ –10, Valinhos, SP, Brazil) contendo carvão ativado (5 μm) para remoção de partículas sólidas e redução de materiais orgânicos e algum contaminante que pudesse interferir nos resultados.

O teste foi do tipo semi-estático, com renovação parcial (80%) de água a cada 24 horas, as variáveis tais como: temperatura, oxigênio dissolvido, amônia e nitrito foram monitorados e, se necessário, ajustados; o pH foi ajustados para pH 5.5 (com HCl ou NaOH (0,1N) Synth, Brasil) para o grupo em pH ácido, Al, Mn e Al+Mn, e pH 7.0 para o grupo controle em pH neutro. A concentração de metal foi medida antes e depois da troca de água por análise em espectrofotômetro de absorção atômica (GBC, AAS 932 Avanta-Plus, IL, USA) pela empresa Nova Ambi (São Paulo- Brasil). A metodologia utilizada foi de responsabilidade da empresa.

A espécie utilizada no presente estudo foi *Astyanax bimaculatus*, uma espécie de teleosteo importante na fauna íctica tropical e na cadeia trófica (Arcifa e Meschiatti, 1993) e está presente na América do Sul incluindo a região Sudeste do Brasil onde se localiza a Bacia do Rio Paraíba do Sul (Pavanelli e Caramaschi, 1997), onde

concentrações de Al e Mn estão acima (CETESB, 2011) das concentrações recomendadas pelas legislações brasileiras (CONAMA, 2005). Fêmeas vitelogênicas de *A. bimaculatus* (n = 100) com massa corpórea de 49.31 ± 4.56 g e comprimento total de 14.09 ± 0.31 cm foram distribuídas em 10 aquários ($10 \text{ peixes.aquário}^{-1}$) com 140 litros ($40 \times 50 \times 70$ cm) e mantidas sob processo de aclimação por um período de 15 dias sob condições controladas com fotoperíodo de 12:12h e alimentadas com ração comercial.

Os peixes foram separados em cinco grupos: controle em pH neutro, pH ácido (5.5), Alumínio, Manganês e Al+Mn em pH ácido (5.5). A concentração nominal dos metais foi 0.5 mg Al.L^{-1} e 0.5 mg Mn.L^{-1} , concentrações que representam uma média dos valores observados ao longo do Rio Paraíba do Sul pela CETESB (2009, 2010 e 2011). As soluções foram obtidas utilizando sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Germany) para a preparação de uma solução estoque utilizando água Milli-Q acidificada (pH 2.5) com HNO_3 65% (Suprapur, Merck).

Os testes de toxicidade foram conduzidos durante 96 horas para caracterizar os efeitos dos metais a curto prazo (agudo) sem oferecer alimentos aos animais. Depois de 96 horas de exposição, cinco animais de cada aquário foram retirados para as análises e cinco animais permaneceram e foram mantidos em água limpa (sem a presença dos metais e com pH 7 em todos os aquários) por mais um período de 96 horas, com a finalidade de verificar a habilidade do peixe em se recuperar na ausência do poluente. Durante o período de recuperação os animais voltaram a ser alimentados diariamente.

2.2 Amostras de brânquias

Após a exposição aos metais, os animais foram eutanasiados por secção medular de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (protocolo 101/2009). Amostras de brânquias foram removidas e o segundo arco branquial foi transferido para tubos plásticos contendo tampão SEI (sucrose 0.3 M, Na_2EDTA 0.1mM, imidazol 0.03 M, β -mercaptoethanol 10mM, pH7.4), outra parte foi fixada em Bouin acético por 24horas e depois transferida para álcool 70%, sendo o restante congelado a -80°C .

2.3 Determinação de fosfolípidios das membranas celulares

Os lipídios totais foram extraídos pelo método de Folch et al., (1957) adaptado por Parrish (1999) para amostras de organismos aquáticos. Os fosfolipídios foram separados por cromatografia de coluna (Yang, 1995) e em seguida metilados (para a formação de grupamentos metil ésteres) seguindo o método descrito por Christie (2003). O perfil dos ácidos graxos das amostras foi determinado por cromatografia gasosa (GC) (VARIAN GC 3900) utilizando-se autoinjeter e aparelho acoplado a um ionizador de chama (FID) com coluna CP Wax 52 CB (0.25 μ m de espessura, diâmetro interno de 0.25 mm e 30 m de comprimento) e hidrogênio como gás de arraste a uma velocidade linear de 22 cm.s^{-1} . A temperatura programada foi de 170⁰ C por 1 min seguido por subida de 25⁰C.min⁻¹ para 240⁰C, e tempo de espera final de 5 min. No injetor e detector (FID) as temperaturas foram de 250 e 260⁰ C, respectivamente. O perfil de ácidos graxos foi obtido com o cálculo de tempo de retenção, utilizando-se padrões de ácidos graxos com tempo de retenção conhecido (Supelco, 37 *standard* e Qualmix PUFA fish M, Indofine Chemical) e representados por porcentagem.

2.4 Determinação da atividade da Na⁺ K⁺ ATPase (NKA)

Os filamentos branquiais foram homogeneizados com tampão SEI (Sacarose 300 mM; EDTA 0,1 mM; Imidazol 30 mM; β -mercaptoetanol 0,035 %; pH 7,4) 10x (p.v^{-1}) e centrifugados (7800 g, 15 min, 4^o C). O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da enzima NKA segundo método descrito por Quabius et al., (1997). O ensaio consiste em determinar a liberação de fosfato pelas amostras incubadas em tampão (NaCl 100 mM; MgCl₂ 8 mM; Imidazol 30 mM; EDTA 0,1 mM; ATP 3 mM; pH 7,6) contendo KCl (13 mM) ou ouabaína (2,5 mM). Uma solução de fosfato de 0,65 mM (Sigma) foi usada como padrão e as amostras foram analisadas em triplicatas a 620 nm em uma leitora de microplacas. A concentração de proteína foi determinada segundo método descrito por Lowry et al., (1951) tendo como padrão albumina de soro bovino (BSA- SIGMA). A atividade da NKA foi expressa como $\mu\text{mol Pi. mg.proteína}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

2.5 Determinação da atividade da enzima Anidrase carbônica

Após descongelamento, as brânquias foram homogeneizadas (10x volume) em tampão fosfato frio (25 mM, pH 7.4) e centrifugadas a 2000g, 4^oC por 10 minutos. Para determinar a atividade da enzima, segundo método descrito por Vitale et al., (1999), aos 0.05 mL do sobrenadante foi acrescentado 7.5 mL de meio de reação (225mM manitol, 75 mM de sacarose, 10mM de Tris-fosfato, pH 7.4) e 1 mL de água destilada a 2.5^oC

saturada com CO₂. A variação do pH foi medida durante 20 segundos usando um pHmetro. A atividade da anidrase carbônica foi determinada pela razão entre as inclinações das regressões lineares da reação catalisada e não catalisada e foi expressa por mg de proteína, (CA atividade = (catalisada/não catalisada).mg proteína total⁻¹), a qual foi determinada pelo método descrito por Lowry et al., (1951) tendo como padrão albumina de Soro Bovina (BSA- SIGMA).

2.6 Imunohistoquímica para identificação de Células de Cloreto

As células de cloreto foram identificadas segundo metodologia modificada de Dang et al., (2000). Os arcos branquiais foram fixados em solução de Bouin acético por 24 horas e fixados em álcool 70% até o momento da análise. As amostras foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. As lâminas histológicas foram desparafinadas e rehidratadas em série decrescente de etanol e lavadas em tampão fosfato (PBS). Os cortes foram pré-incubados com peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos, lavados com PBS (2x 5 minutos) e em seguida incubados com leite desnatado 5% para bloquear sítios de ligação não específicos por 30 minutos. Posteriormente, foram incubados durante 20 horas em câmara úmida a temperatura ambiente, com o anticorpo monoclonal de camundongo contra Na⁺/K⁺-ATPase (IgGa5, *Development Studies Hydrioma Bank, University of Iowa, USA*) diluído 1:300. Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com o segundo anticorpo universal (GAM, Sigma) por 40 minutos. Posteriormente os cortes foram lavados com PBS e incubados com o amplificador peroxidase anti-peroxidase (PAP/mouse, Sigma) por 40 minutos e, então, lavados em tampão PBS. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado após coloração com DAB (3,3'- diaminobenzidina, Sigma). Os controles negativos para o primeiro e o segundo anticorpo foram obtidos suprimindo-se a aplicação do primeiro anticorpo em uma lâmina e o segundo em outra. Os cortes foram desidratados, as lâminas foram montadas e após secagem, foram observadas em microscópio de luz Leica DM1000 com câmera fotográfica Leica DFC 295 e programa de análise de imagens Leica Application Suite Professional, LAS V3.6. As células-cloreto foram quantificadas em relação ao comprimento do filamento (mm) de acordo com sua localização: no filamento e na lamela. Para cada animal, o filamento foi medido (mm²) e 20 campos aleatórios de cada filamento tiveram as CC quantificadas. Os resultados foram expressos como número CC.mm⁻² de epitélio do filamento e da lamela.

2.7 Determinação de Lipoperoxidação

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada pelo método FOX (*Ferrous Oxidation in Xylenol Orange*) modificado de acordo com Hermes-Lima et al., (1995). Amostras de filamentos branquiais foram homogeneizadas em metanol e centrifugadas a $1.000 \times g$ por 5 minutos e na sequência foram adicionados os seguintes reagentes: 1 mM FeSO₄, 0.25 M H₂SO₄, 1 mM laranja de xilenol e água MilliQ em um volume total de 0.9 mL. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 h e a absorbância lida em espectrofotômetro a 580 nm. Em seguida, foi adicionado hidroperóxido de cumeno (CHP) (5×10^{-3} mM) e a absorbância lida novamente a 580 nm. A oxidação de íons de ferro na presença de laranja de xilenol foi determinada e expressa em equivalente de CHP nmol·g⁻¹ peso úmido.

2.8 Análise estatística

Para verificar a correlação entre a concentração dos metais e o pH foi realizado o teste de Correlação de Pearson. Os dados biológicos foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM), os valores médios de cada grupo foram comparados entre os tratamentos usando teste de Análise de Variância (*One way ANOVA*) seguido do teste de Tukey para dados paramétricos e pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. A comparação entre os tratamentos (agudo e seu respectivo grupo de recuperação) de cada grupo foi realizada pelo teste t para dados paramétricos e Mann-Whitney para não paramétrico. Para todas as análises foram considerados como estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram o valor de $P < 0.05$. Foi utilizado o programa BioStat versão 2009 para Windows (AnalystSoft Inc.).

3. Resultados

3.1 Água

Os parâmetros físicos e químicos da água foram analisados e descritos a seguir: Ca²⁺ 8.88 mg.L⁻¹; Fe 0.09 mg.L⁻¹; SO₄ 12 mg.L⁻¹; N 0.4 mg.L⁻¹; PO₄ 0.46 mg.L⁻¹; alcalinidade 15 mgCaCO₃. L⁻¹; matéria orgânica 19%; cloreto 4.9 mg.L⁻¹; carbono orgânico 1.3 mgC.L⁻¹; carbono inorgânico 1.2 mgC.L⁻¹; condutividade elétrica (25° C) 65.5 uS.cm⁻¹; dureza total 26 mg.L⁻¹; turbidez 1 NTU). Alguns parâmetros foram

monitorados diariamente, os valores expressos foram medidos (antes da troca diária de água) e ajustados (após a troca de água) a fim de manter os valores esperados para o ensaio (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água monitorados diariamente antes (medido) e após (ajustado) a renovação de água durante o teste agudo (96 horas) para todos os grupos experimentais (média $\pm$ EPM).

Grupos	pH medido	pH ajustado	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	Temperatura °C	Amônia mg.L ⁻¹	Nitrato mg.L ⁻¹
CTR pH neutro	7.10 $\pm$ 0.02	7.10 $\pm$ 0.03	7.16 $\pm$ 0.17	25.19 $\pm$ 0.33	0.014	0
pH ácido	6.19 $\pm$ 0.12	5.50 $\pm$ 0.07	7.18 $\pm$ 0.18	24.59 $\pm$ 0.21	0.014	0
Alumínio	6.02 $\pm$ 0.04	5.30 $\pm$ 0.04	7.15 $\pm$ 0.16	24.64 $\pm$ 0.16	0.007	0
Manganês	6.04 $\pm$ 0.04	5.40 $\pm$ 0.06	7.25 $\pm$ 0.15	24.39 $\pm$ 0.28	0.007	0
Al+Mn	5.85 $\pm$ 0.12	5.31 $\pm$ 0.05	7.34 $\pm$ 0.16	24.37 $\pm$ 0.30	0.007	0

As médias das concentrações dos metais, em mg.L⁻¹, de todos os grupos experimentais, estão descritas na tabela 2. Os valores expressos foram coletados e enviados para análise, antes e após a troca diária de água, sendo mantidos dentro do esperado durante o experimento.

Tabela 2. Concentrações dos metais durante o teste agudo (96 horas) nos diferentes grupos experimentais (média $\pm$ EPM). O valor total representa a concentração total determinada na água e dissolvido representa a concentração disponível na água para assimilação pelos animais (ND- não detectado).

Concentração de metais na água (mg.L ⁻¹)								
Grupos	Alumínio total		Alumínio dissolvido		Manganês total		Manganês dissolvido	
	antes	após	antes	após	antes	após	antes	após
CTR pH neutro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pH ácido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Alumínio	0.52 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.04	ND	ND	ND	ND
Manganês	ND	ND	ND	ND	0.51 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.01
Al+Mn	0.47 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.02	0.53 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.02

Durante todo o período do experimento, após o decorrer de 24 horas, o pH apresentou-se aumentado em relação ao valor que era ajustado, e essas alterações foram o suficiente para alterar as concentrações dos metais dissolvidos na água apresentando correlação negativa (Al ρ -0.92, Mn ρ -0.31, Al (Mn+Al) ρ -0.93 e Mn (Mn+Al) ρ -0.54) como pode ser observado na figura 1. Nas primeiras horas após a renovação da água foi possível manter o pH em torno de 5.5 em todos os grupos experimentais, mas ao final das 24 horas o pH se elevava para próximo a 6.0.

Figura 1. Correlação negativa entre a concentração dos metais e o pH para os animais do grupo exposto ao Al (A) (alumínio dissolvido), grupo exposto ao manganês (B) (manganês dissolvido), grupo exposto aos dois metais em combinação (C) (Al dissolvido) e (D) (Mn dissolvido). O número com ' representa o momento após a renovação de água.

Ácidos graxos

A tabela com as porcentagens detalhadas dos ácidos graxos está em anexo (1), sendo apresentado na forma de figuras os resultados das principais classes de ácidos graxos. Ao avaliar a composição de ácidos graxos das membranas branquiais (Figura 2), observou-se que nos animais dos grupos expostos aos metais isoladamente não foram alteradas as porcentagens das classes de ácidos graxos, enquanto que nos animais do grupo exposto aos dois metais juntos houve um aumento na porcentagem dos ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA) (principalmente de 18:1n9-Anexo 1) comparados aos outros grupos experimentais, acompanhado por uma diminuição nos ácidos graxos polinsaturados (PUFA), abrangendo as principais classes, dos omega 3 (principalmente 22:5n3 [Ácido Docosapentanóico-DPA] e 22:6n3 [Ácido Docosahexanóico- DHA]) e dos omega 6 (20:4n6 [Ácido Araquidônico –AA] e 22:5n6 [Ácido Decosapentanóico – DPA]). Essas alterações evidenciaram uma redução na somatória dos ácidos graxos PUFA n3 e n6 nos animais expostos aos dois metais associados (Anexo 1).

No período de recuperação também notou-se um padrão diferente no grupo de animais expostos aos dois metais juntos, em relação aos outros grupos. Enquanto nos dois grupos com os metais isolados (Al e Mn) incluindo os controles, os animais modificaram a composição das membranas com o aumento das porcentagens de SAT e MUFA e uma diminuição de PUFA após as 96 horas de recuperação, o grupo com os dois metais juntos apresentaram maiores porcentagens de PUFA (omega 3 e 6) e menores de MUFA mostrando que, este período foi o suficiente para estes ácidos graxos retornarem aos padrões iniciais.

Figura 2. Porcentagem de ácidos graxos das membranas das brânquias de *Astyanax bimaculatus* separados por classes. Ácidos Graxos Saturados (STA), Ácidos graxos Monoinsaturados (MUFA) e Ácidos Graxos Polinsaturados (PUFA) dos grupos experimentais (Al, Mn e Al+Mn) e tratamentos (agudo e recuperação). ^{ab} Letras diferentes significam diferenças entre os grupos. Barras com símbolo (*) significam diferenças entre agudo e recuperação. CTRL- grupo controle, Al+Mn – grupo com os dois metais juntos.

3.2 Lipoperoxidação

Notando-se alterações nas porcentagens de ácidos graxos de membrana, a análise de lipoperoxidação (Figura 3) torna-se importante para avaliar o grau de estabilidade em que estes ácidos graxos se encontravam. Nos resultados das análises de lipoperoxidação pode-se observar que houve um aumento na peroxidação dos fosfolípidos das membranas branquiais dos animais expostos ao Al e aos dois metais juntos. No entanto, após o período de recuperação não houve um restabelecimento das condições iniciais sendo que os mesmos danos apresentados anteriormente foram mantidos para os animais do grupo Al. Para os dois metais juntos parece ter havido uma leve recuperação, apesar de não ser diferente do seu respectivo grupo no agudo, é igual estatisticamente ao controle.

Figura 3. Peroxidação lipídica nos fosfolípidos de membranas das brânquias de *Astyanax bimaculatus* durante os teste agudo e de recuperação. Letras diferentes significam diferença entre os grupos do tratamento agudo (ab) e recuperação (ab') . CTRL- grupo controle, Al+Mn – grupo com os dois metais juntos.

3.3 Atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase

Os animais submetidos ao Al e ao Mn separadamente, mostraram uma diminuição na atividade da bomba após o período de exposição (96 horas). No entanto não foram observadas alterações no grupo no qual os animais foram expostos aos dois metais juntos (Figura 4).

Ao retornarem para água limpa, sem a presença dos metais, foi observado que os animais do grupo Al e Mn demonstraram uma recuperação na atividade da bomba, mas com valores muito acima daqueles observados nos animais do grupo controle, fato não observado nos animais dos demais grupos.

Figura 4. Atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase nas brânquias de *Astyanax bimaculatus* durante os teste agudos e de recuperação. Letras diferentes significam diferenças entre os grupos do tratamento agudo (ab) e recuperação (ab'). Barras com símbolo (*) representam diferenças entre o grupo agudo e recuperação. CTRL- grupo controle, Al+Mn – grupo com os dois metais juntos.

3.4 Atividade enzimática da Anidrase Carbônica

Não foram observadas diferenças na atividade da enzima anidrase carbônica nos grupos e tratamentos testados (Figura 5).

Figura 5. Atividade da anidrase carbônica nas brânquias de *Astyanax bimaculatus* durante os teste agudos e de recuperação CTRL- grupo controle, Al+Mn – grupo com os dois metais juntos.

3.5 Quantidade de células de cloreto

Ao observar a quantidade de células de cloreto (CC) nas brânquias durante a exposição aos metais não foram observadas diferenças nas CC dos filamentos branquiais. No entanto, tanto o Al quanto o Mn, em exposição isolada, causaram diminuição da quantidade de CC nas lamelas branquiais. No período de recuperação a quantidade de CC na lamelas permaneceu inalterada, porém houve um aumento da quantidade nos filamentos nos grupos tratados com Al, Mn e os dois metais juntos (Figura 6). As imagens da figura 7 mostram os locais de concentração da CC imunomarcadas, conforme dados dos gráficos, de cada grupo experimental, após os testes agudo e recuperação. Notou-se que os animais expostos aos metais (principalmente ao Al) apresentavam diminuição da quantidade de CC nas lamelas (Figuras 7C).

Figura 6. Quantidade de células de cloreto (CC) por mm^{-2} de epitélio nos filamentos (A) e nas lamelas (B) nas brânquias de *Astyanax bimaculatus* expostos aos metais após os testes agudo (96 horas) e recuperação (96 horas). Letras diferentes significam diferenças entre os grupos do tratamento agudo (ab) e recuperação (ab'). Barras com símbolo (*) representam diferenças entre o grupo agudo e recuperação. CTRL- grupo controle, Al+Mn – grupo com os dois metais juntos.

Figura 7. Imunomarcção de bombas de $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ em células de cloreto nas brânquias de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* expostas aos metais após o teste agudo (96 horas). Grupo CTR pH neutro (A) e grupo pH ácido (B) setas indicam filamento e com * lamela (A); grupo Al (C)- as setas indicam ausência de CC nas lamelas. Barra: $70\mu\text{m}$.

4. Discussão

Foi possível perceber claramente que durante um período de 24 horas houve uma mudança na dinâmica entre pH e metal, sugerindo dois motivos para essa mudança: 1) a concentração dos metais dissolvidos diminuiu em decorrência do aumento do pH, demonstrando que as concentrações destes metais são pH dependentes, e alguns fatores tais como alcalinidade e dureza funcionam como “tampões” de sistemas naturais e podem de alguma maneira afetar as concentrações de H^+ na água (Neal, 2001) e consequentemente na biodisponibilidade do metal. A água utilizada neste experimento apresentou valores de alcalinidade que a classifica com capacidade intermediária de tamponamento e a dureza como “mole”, o que pode ter refletido nas oscilações de pH observadas, mostrando a necessidade da monitoramento durante o experimento; e 2) pode ser que estes metais estejam sendo absorvidos pelos animais, o que foi observado por Correia (2012) que analisou as concentrações destes metais acumulados em vários tecidos desta mesma espécie.

Os resultados encontrados por Correia (2012) mostraram que as brânquias são os principais órgãos que acumulam metais durante a exposição ($83.83 \text{ mg Al.g}^{-1}$ e $5.68 \text{ mg Mn.g}^{-1}$ expostos isoladamente; 189 mg Al.g^{-1} e $1.69 \text{ mg Mn.g}^{-1}$ expostos em combinação), o que pode ser explicado pelo fato deste tecido representar o primeiro órgão de contato com os contaminantes presentes na água. Esta é a principal via de entrada de poluentes e pela sua grande superfície de contato e permeabilidade pode desencadear respostas fisiológicas e levar o animal ao estado de estresse (Wendelaar Bonga, 1997). Ao retornarem para a água limpa há uma diminuição de 89% (Al) e 82% (Mn) da concentração dos metais (Correia, 2012), condição esta que pode ser atribuída não só ao fato do tecido se auto recuperar na ausência do poluente mas, também, nos danos morfológicos causados pelo metal e consequentemente na função do órgão como foi relatado no presente estudo.

As alterações no epitélio branquial podem resultar em desequilíbrio em todo o organismo, pois muitos agentes estressores afetam a estrutura branquial alterando as funções de troca gasosa e o balanço hidromineral, sendo estes fatores as principais razões para a vulnerabilidade destes animais em água poluídas (Schwaiger et al., 1997; Wendelaar Bonga, 1997). Estas primeiras respostas representam um estado de homeostase alterado desencadeando respostas neuroendócrinas que promoveram a liberação de substâncias que atuarão nas células alvo responsáveis pelo

restabelecimento da ordem (respostas primárias) (Iwama et al., 2006). Os hormônios promoverão ajustes bioquímicos e fisiológicos que requerem muita energia, como alterações nas concentrações de glicose plasmática, proteínas e glicogênio, que ocorrem para que o organismo possa atender a demanda energética (respostas secundárias) (Wendelaar Bonga, 1997; Iwama et al., 2006).

Este aumento no metabolismo relatado acima pode promover a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em tecidos metabolicamente mais ativos (Halliwell e Gutteridge, 2000). Quando o sistema de defesa antioxidante é insuficiente ou inativado podem ocorrer danos oxidativos como a peroxidação lipídica, o que foi promovido pela exposição ao Al isolado, ou em combinação com o Mn, e este evento pode ser responsável por alterar a permeabilidade de membranas podendo causar danos ou até morte celular (Hermes-Lima, 2004).

Notou-se que a composição de classes de ácidos graxos das membranas dos animais expostos aos metais (isoladamente) e nos grupos controle e pH ácido, durante o teste agudo, apresentaram uma maior quantidade de PUFA, o que pode ser uma condição normal das membranas celulares das brânquias desta espécie. Sabe-se que PUFA nas membranas são mais suscetíveis a ação de ROS, os MUFAs são mais resistentes a oxidação e isso se deve a diferença química estrutural entre eles. A composição de ácidos graxos de membrana influencia diretamente a velocidade de processos associados e consequentemente a taxa metabólica celular. Além disso, quanto mais polinsaturada for a membrana mais fluída ela será e acredita-se que isso aumente a atividade de bombas associadas a esta membrana (Couture e Hulbert, 1995; Hulbert e Else, 1999).

A ação do Al nas brânquias não foi capaz de promover alterações na porcentagem de PUFA nas membranas, mas provavelmente, por estes representarem cerca de 50% nestas membranas, houve um aumento de lipoperoxidação nos animais expostos a este metal, assim como nos animais expostos aos dois metais juntos, pois a concentração de Al no tecido branquial é muito maior que a de Mn (Correia, 2012). Já os animais expostos ao Mn isoladamente não apresentaram alterações na porcentagem de PUFA nos fosfolípidios das membranas das células branquiais, assim como não sofreram ação dos hidroperóxidos. Ao retornarem para água limpa as porcentagens de PUFA diminuíam nas membranas celulares branquiais dos animais de todos os grupos, exceto nos animais expostos aos dois metais simultaneamente, o que pode contribuir para a redução na fluidez destas membranas.

A exposição aos dois metais combinados promoveu alterações nas membranas celulares que não foram observadas nos animais dos outros dois grupos. A diminuição de PUFA observada pode ser uma alternativa em desviar os ácidos graxos com 20 ou 22 carbonos, principalmente o ácido araquidônico (C20:4n6) e o ácido docosahexanóico (22:6n3) para outros sistemas transformando-os em produtos biologicamente ativos, como os eicosanóides por exemplo (Nelson e Cox, 2005), que participam ativamente de cascatas inflamatórias e respostas ao estresse. Este processo pode ter auxiliado na diminuição da fluidez e aumento da seletividade das membranas, assim como na diminuição de danos às brânquias como a manutenção da atividade de NKA e da quantidade de células de cloreto. Além disso, houve um aumento de 18:2n6 e 18:3n3, que são precursores PUFA de cadeias maiores, mas apresentam uma capacidade limitada de manutenção de fluidez quando comparados a C20:4n6 e C22:6n3 (Hazel e Williams, 1990).

É conhecido que o Al causa alterações nos epitélios branquiais podendo levar a distúrbios respiratórios (Camargo et al., 2009), mas o conhecimento dos efeitos do Mn ainda é escasso nesta área. No presente trabalho observou-se que o Al e o Mn foram capazes de promover uma diminuição na atividade da bomba de Na^+/K^+ ATPase o que pode afetar diretamente os mecanismos osmorregulatórios dos animais, uma vez que, a função desta bomba é colocar 3 Na^+ para fora e 2 K^+ para dentro da célula através da energia gerada pela hidrólise do ATP mantendo o gradiente iônico equilibrado e está presente em altas concentrações nas células de cloreto nas brânquias de teleósteos. A NKA é importante não somente para manter a homeostase intracelular como também auxilia outros sistemas de transporte dentro das brânquias (Hwang e Lee, 2007).

Camargo et al., (2009) também observaram uma menor atividade de Na^+/K^+ ATPase nas brânquias de peixes expostos ao Al juntamente com a diminuição destes íons (Na e K) no plasma e relacionaram este evento a uma menor atividade desta enzima nas células de cloreto (CC) que se mostraram em quantidades diminuídas nos filamentos podendo ser devido a morte destas células por apoptose ou necrose. Estes dados corroboram o trabalho de Monette e McCormick (2008) que observaram resultados similares em juvenis de salmões depois da exposição aguda ao Al em pH ácido. No entanto, neste trabalho, o Al promoveu uma diminuição de CC nas lamelas, assim como o Mn durante a exposição mas, ao passar para água limpa houve um aumento, só que nos filamentos, não sendo possível observar recuperação nas lamelas neste período.

Na exposição aos dois metais juntos não foram observadas alterações nas CC em ambos os locais, filamentos e lamelas de fêmeas de *A. bimaculatus*. Segundo Monette e McCornink (2008) as CC são os principais sítios para acumulação do Al, e pelos dados obtidos neste trabalho, e em alguns outros, para o Mn também (Nyberg et al., 1995; Partridge e Lymbery, 2012) o que conseqüentemente levaria à morte destas células a fim de facilitar a eliminação do metal do organismo, o que corrobora nossos achados pelo fato do não restabelecimento das quantidades de CC nas lamelas e pela diminuição da concentração de metais neste tecido, conforme observado por Correia (2012).

Mesmo os metais promovendo diferentes respostas nas brânquias, a ação do estressor pode levar a diferentes conseqüências no organismo, pois segundo Exley (1996) a precipitação de metais nas brânquias resulta em efeitos deletérios respiratórios nos peixes pois, pequenos polímeros podem infiltrar na camada de muco que recobre as brânquias formando agregados que auxiliam na resistência a difusão de O₂ e CO₂. Apesar dos vários efeitos observados pela ação dos metais, a atividade da enzima anidrase carbônica não se mostrou alterada no período de 96 horas mostrando que talvez, este tempo não foi o suficiente para alterar a atividade desta enzima que além de acelerar a excreção de CO₂, contribui para o sistema de tamponamento no sangue, possibilitando o equilíbrio na concentração de íons H⁺ pois, qualquer desequilíbrio que tendesse a diminuir o pH interno poderia acentuar os efeitos deletérios de toxicidade dos metais nos tecidos (Randall et al., 2000).

Com os resultados apresentados é possível perceber que o Al e o Mn isoladamente causam distúrbios funcionais pela interferência na quantidade de CC, na atividade da bomba de Na⁺K⁺ ATPase e por promover lipoperoxidação (neste caso só o Al) de fosfolipídios de membrana, mas causando alterações fisiológicas diferentes quando estes dois metais estão em combinação. Alguns estudos mostram que quando em combinação uma substância pode exercer efeitos antagônicos sobre a outra (Xu et al., 2011, Correia, 2012) pela competição de locais de ligação, o que pode ter ocorrido com estes dois metais em alguns parâmetros avaliados, como na atividade da bomba de Na⁺K⁺ ATPase e número de CC nas lamelas, parâmetros diretamente relacionados. Por outro lado, a capacidade destes metais em alterar o perfil de AG das membranas branquiais foi demonstrada apenas quando ambos estavam combinados, enquanto que a capacidade do Al em promover lipoperoxidação ficou evidenciada mesmo na presença do Mn. Este padrão sugere que apesar das alterações causadas pelo Al e Mn, quando isolados, quando estes metais estão combinados apresentam ação antagônica,

possibilitando manter a atividade da bomba de Na^+K^+ ATPase e a quantidade de CC, mas com rearranjo da composição de ácidos graxos das membranas celulares branquiais, o que não ocorre isoladamente.

O desequilíbrio funcional nas brânquias promovido pelos efeitos de contaminantes em geral, incluindo os metais, pode levar ao estado de estresse o qual requer uma demanda energética que é suprida pelo redirecionamento dos recursos energéticos, tais como, glicose, proteínas, lipídios e glicogênio (Iwama et al., 2006). Peixes na fase de reprodução, utilizam substratos para vários processos, mas principalmente para a vitelogênese, e o vitelo formado constitui quase que cerca de 79% de proteínas e o restante de lipídios, carboidratos e outros (Lubzens et al., 2010). Em situações de estresse, os animais podem desviar recursos de atividades que requerem alta demanda energética para manutenção ou restabelecimento da homeostase, desviando e/ou metabolizando, por exemplo, proteínas dos ovários para outros locais, em resposta a às mudanças físicas e/ou químicas que estejam comprometendo a sobrevivência do organismo (Wendelaar Bonga, 1997). Por este motivo, peixes nas fases reprodutivas são vulneráveis aos efeitos de estressores, principalmente durante os períodos de maturação e desova devido ao redirecionamento dos recursos energéticos associados à resposta ao estresse (Schreck e Li, 1991).

Diante deste quadro, fica claro que alterações causadas pelo Al e Mn nos parâmetros citados acima e, ainda na utilização de substratos energéticos que venham atender a demanda de energia requerida na manutenção destes processos, (Vieira et al., 2013) podem interferir diretamente no processo reprodutivo uma vez que este é muito custoso energeticamente para um animal que não está em um ambiente favorável.

5. Referências Bibliográficas

- Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A. J., 2005. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 142 B, 342-352.
- Arcifa, M.S. and Meschiatti, A.J., 1993. Distribution and feeding ecology of fishes in a Brazilian reservoir: Lake Monte Alegre. *Interciência* 18(6), 302-313.
- Barnhoorn, I., Van Vuren, J.H.J., du Preez, H.H., 1999. Sublethal effects of manganese on the carbohydrate metabolism of *Oreochromis mossambicus* after acute and chronic exposure. *S. Afr. J. Zool.* 34, 102-107.
- Bell, M. V., Henderson, R. J., Sargent, J. R., 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 83 B, 711-719.
- Bindon, S.D., Gilmor, K.M., Fenwick, J.C., Perry, S.F., 1994. The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 197, 47-63.
- Camargo, M.M., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40-46.
- CETESB, 2009. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios>. Acesso em 05/09/2012.
- CETESB, 2010. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios>. Acesso em 05/09/2012.

- CETESB, 2011. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios>. Acesso em 05/09/2012.
- Christie, W.W., 2003. Lipids Analysis. The Oily Press, Bridgwater. 307p.
- CONAMA, 2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em:16/06/2012.
- Correia, T.G.; Narcizo, A.M; Moreira, R.G., 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comp. Biochem. Physiol. 151 C (4), 461-466.
- Correia, T.G., 2012. Evidências de desregulação endócrina causada pela exposição aquática ao Alumínio e ao Manganês em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758). Tese em Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil. 140p.
- Cossarini-Dunier, M., Demael, A., Lepot, D., Guerin, V., 1988. Effect of manganese ions on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) against *Yersinia ruckeri*. Dev. Comp. Immunol. 12, 573–579.
- Couture P. and Hulbert, A.J., 1995. On the relationship between body mass, tissue metabolic rate and sodium pump activity in mammalian liver and kidney. Am J Physiol. 268, 641–650.
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na⁺K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. J. Exp. Biol. 203, 379-387.
- 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. 85, 97–177.

- Exley, C., Chappell, J. S., Birchall, J. D., 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *J. Theor. Biol.* 151, 417–428.
- Exley, C., 1996. Aluminium in the brain and heart of the rainbow trout. *J. Fish Biol.* 48, 706–713.
- Filipek, L.H., Nordstrom, D.K., Ficklin, W.H., 1987. Interaction of acid mine drainage with waters and sediments of West Squaw Creek in the West Shasta mining district, California. *Environ. Sci. Technol.* 21, 388-396.
- Folch, J., Less, M., Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-503.
- Gatlin, D.M., Wilson, R.P., 1984. Studies on the manganese requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 41, 85–92.
- Gensemer, R.W. and Playle, R.C., 1999. The bioavailability and toxicity of aluminium in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 29, 315-450.
- Gonzalez, R.J., Grippo, R.S., Dunson, W.A., 1990. The disruption of sodium balance in brook char, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), by manganese and iron. *J. Fish Biol.* 37, 765–774.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free radicals in biology and medicine*. 3^{ed}. UK: Oxford University Press, p.936.
- Hazel, J.R. and Williams, E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid. Res.* 29, 167–227.

- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 271–280.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken, pp. 319-368.
- Hulbert, A.J. and Else, P.L., 1999. Membranes as possible pacemarkers of metabolism. *J. Theor. Biol.* 199, 257-274.
- Hwang, P.P. and Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Physiol. (A)* 148, 479–497.
- IPCS., 1997. Environmental health criteria for aluminum. Geneva, UN Environmental Programme, International Labour Organization, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M., 2006. Stress in Fish. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. *The Physiology of Fishes*. 3 ed. New York: CRC Press. 9, 319-342.
- Jagoe, C.H. and Haines, T.A., 1997. Changes in gill morphology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. *Environ. Pollut.* 97, 137–146.
- Keinanen, M., Tigerstedt, C., Kalax. P., Vuorinen, P.J., 2003. Fertilization and embryonic development of whitefish (*Coregonus lavaretus lavaretus*) in acidic low-ionic-strength water with aluminum. *Ecotox. Environ. Saft.* 55(3), 314-29.
- Kroglund, F. and Staurnes, M., 1999. Water quality requirements of smolting Atlantic salmon (*Salmo salar*) in limed acid rivers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 2078–2086.

- 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.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J., 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 367-389.
- Maage, A., Lygren, B., El-Mowafi, A.F.A., 2000. Manganese requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Fish. Sci.* 66, 1–8.
- Martinez, C.B.R. e Cólus, I.M.S., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do Rio Tibagi. In: Medri, M.E. Bianchini, E. Shibata, O.A., Pimenta, J.A. (Eds.) *A Bacia do Rio Tibagi*, Londrina, Paraná, c29, p551-577.
- Monette, M.Y. and McCornink, 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.
- Mozeto, A. A. e Zagatto, P. A., 2006. Introdução de Agentes químicos no ambiente. In: P. A. Zagatto & E. Bertoletti (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, p. 15 – 38p.
- Narcizo, A. M., 2009. Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia. Dissertação de Mestrado. 92p.
- Nath, K. and Kumar, N., 1987. Toxicity of manganese and its impact on some aspects of Carbohydrate metabolism of a freshwater teleost, *Colisa fasciatus*. *Sci. Total Environ.* 67, 257–262.
- Neal, C., 2001. Alkalinity measurements within natural waters: towards a standardised approach. *Sci. Total Environ.* 265, 99 – 113.

- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Freeman, New York, EUA, 1119 p.
- 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.
- Parrish, C.C. 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts MT, Wainman BC (eds) *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer, New York, pp 4–20
- Partridge, G. J. and Lymbery, A. J., 2012. Effects of manganese on juvenile mullet (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity – implications for inland mariculture. *Aquaculture* 290, 3-4.
- Pavanelli, C.S. and Caramaschi, E.P., 1997. Composition of the ichthyofauna of two small tributaries of the Paraná river, Porto Roci, Paraná State, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 8(1), 23-31.
- Poleo, A. and Hytterød, S., 2003. The effect of aluminium in Atlantic salmon *Salmo salar* with special emphasis on alkaline water. *J. Inorg. Biochem.*, 97, 89–96.
- Quabius, E.S., Balm, S.E., Wendelaar-Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 472–482.
- Randall, D.J., Burggren, W., French, K., 2000. *Fisiologia animal: mecanismos e adaptações*. Guanabara Koogan, RJ p.489.
- Ratnayake, W.N. and Ackman, R.G., 1979. Fatty alcohols in capelin, herring and mackerel oils and muscle lipids: II. A comparison of fatty acids from wax esters with those of triglycerides. *Lipids* 14, 804–810

- Reader, J.P., Dalziel, T.R.K., Morris, R., 1988. Growth, mineral uptake and skeletal calcium deposition in brown trout, *Salmo trutta* L., yolk-sac fry exposed to aluminium and manganese in soft acid water. J. Fish Biol. 32, 607–624.
- Schreck, C.B. and Li, H.W., 1991. Performance capacity of fish: stress and water quality. In: Brune, D.E., Tomasso, J.R. (Eds.), Aquaculture and Water Quality, vol. 3. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Advances in World Aquaculture, pp. 21–29.
- Schwaiger J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Tribskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. J. Aquati. Ecosyst. Stress Recov. 6, 75-86.
- Staurnes, M., Blix, P., Reite, O.B., 1993. Effects of acid water and aluminum on parr-smolt transformation and seawater tolerance in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50, 1816–1827.
- Staurnes, M., Hansen, L.P., Fugelli, K., Haraldstad, O., 1996. Short-term exposure to acid water impairs osmoregulation, seawater tolerance, and subsequent marine survival of smelts of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 1695–1704.
- Underwood, E.J., 1977. Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, New York. 558 pp.
- 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. Physiol. 157 C, 1-8.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. (C) 122, 121–129.

- Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Peuranen, S., Tigerstedt, C., 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long-term exposure to acidity and aluminium. *Ecotox. Environ. Safe.* 54, 255-276.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Wendelaar Bonga, S.E. and Lock, R.A.C., 2008. The Osmoregulatory System. In: Di Giulio, R.T. e Hilton, D.E. (Eds). *The Toxicology of Fishes*. New York, CRC Press. 8, 401-415.
- Xu, X., Li, Y., Wang, Y., Wang, Y., 2011. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. *Toxicol. Vitro* 25, 294 – 300.
- Yang, Z., 1995. Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples. MSc Thesis. Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, 96 pp.

Anexo 1: Perfil de ácidos graxos de fosfolipídios de membranas branquiais em fêmeas maduras de *Astyanax bimaculatus* durante o teste agudo (96 horas) e recuperação (96 horas)

Fosfolipídios de membranas											
Ácido graxo (%)	Período Agudo					Período de Recuperação					
	CTR pH neutro	pH ácido	Alumínio	Manganês	Al+Mn	CTR pH neutro	pH ácido	Alumínio	Manganês	Al+Mn	
14:0	0.36 ±0.04 ^{a*}	0.42 ±0.06 ^a	0.51 ±0.07 ^a	0.53 ±0.02 ^a	0.79 ±0.04 ^b	0.65 ±0.10 [#]	0.57 ±0.05	0.55 ±0.06	0.39 ±0.04	0.48 ±0.06	
15:0	1.35 ±0.32	0.85 ±0.39	0.99 ±0.31	0.68 ±0.26 [*]	0.22 ±0.03 [*]	1.75 ±0.59	1.39 ±0.57	1.32 ±0.28	2.46 ±0.28 [#]	2.58 ±0.36 [#]	
16:0	11.0 ±1.56 ^a	8.55 ±0.41 ^{a*}	8.53 ±0.35 ^{a*}	10.4 ±0.97 ^{a*}	22.5 ±1.80 ^b	19.0 ±1.84	19.2 ±0.79 [#]	16.2 ±2.06 [#]	16.8 ±1.42 [#]	19.1 ±2.21	
17:0	0.73 ±0.09	0.55 ±0.04 [*]	0.61 ±0.06 [*]	0.74 ±0.05	0.44 ±0.19	0.98 ±0.09	1.55 ±0.18 [#]	1.62 ±0.28 [#]	0.41 ±0.19	0.17 ±0.01	
18:0 anteiso	1.15 ±0.47 [*]	1.85 ±0.61	4.46 ±2.11	2.20 ±0.41	0.70 ±0.29	7.64 ±5.77 [#]	1.98 ±0.54	2.71 ±0.57	1.16 ±0.33 [#]	ND	
18:0	17.7 ±0.47	18.5 ±0.61 [*]	13.3 ±0.93 [*]	14.3 ±0.35 [*]	12.4 ±2.24	18.1 ±2.39	24.8 ±1.02 [#]	21.4 ±1.01 [#]	20.5 ±1.32	19.2 ±1.67	
20:0	0.41 ±0.05	0.37 ±0.06	0.68 ±0.06	0.32 ±0.02	0.44 ±0.10	0.39 ±0.02	0.48 ±0.01	0.51 ±0.04	0.43 ±0.04	0.40 ±0.05	
21:0	0.25 ±0.03	0.18 ±0.01 [*]	0.20 ±0.01 [*]	0.22 ±0.01	0.19 ±0.08	0.44 ±0.06	0.69 ±0.05 [#]	0.66 ±0.10 [#]	0.21 ±0.03	0.25 ±0.02	
22:0	0.60 ±0.05	0.59 ±0.06	0.77 ±0.08	0.52 ±0.05	0.44 ±0.20	0.48 ±0.01	0.65 ±0.03	0.41 ±0.01	0.52 ±0.08	0.44 ±0.06	
24:0	0.40 ±0.03	0.39 ±0.03	0.47 ±0.05 [*]	0.43 ±0.05	0.25 ±0.11	0.38 ±0.06	0.47 ±0.05	0.25 ±0.01 [#]	0.59 ±0.16	0.37 ±0.06	
ΣSTA	33.8 ±3.66 ^{ab*}	29.2 ±1.34 ^{a*}	30.5 ±1.97 ^{a*}	30.1 ±0.73 ^{a*}	38.3 ±2.08 ^b	48.0 ±1.81 [#]	51.7 ±1.38 [#]	45.6 ±2.53 [#]	42.9 ±2.80 [#]	43.0 ±3.72	
16:1	0.68 ±0.10 ^{a*}	0.56 ±0.04 ^{a*}	0.53 ±0.01 ^{a*}	0.73 ±0.06 ^a	2.49 ±0.33 ^b	1.70 ±0.25 [#]	1.35 ±0.06 [#]	1.28 ±0.10 [#]	1.29 ±0.10	1.51 ±0.18	
17:1	1.22 ±0.30 ^a	0.63 ±0.32 ^{ab}	0.64 ±0.21 ^{ab}	0.60 ±0.25 ^{ab}	0.17 ±0.01 ^{b*}	1.36 ±0.42	1.34 ±0.48	0.84 ±0.16	1.29 ±0.22	1.39 ±0.12 [#]	
18:1n9	10.8 ±1.14 ^a	8.75 ±0.40 ^{a*}	8.40 ±1.70 ^{a*}	11.3 ±0.99 ^{a*}	37.2 ±3.90 ^{b*}	14.3 ±4.78	15.3 ±0.97 [#]	13.4 ±1.46 [#]	16.0 ±0.73 [#]	15.6 ±2.05 [#]	
18:1n7	1.55 ±0.17 ^a	1.34 ±0.02 ^a	1.65 ±0.30 ^{ab}	1.38 ±0.02 ^a	2.11 ±0.04 ^b	2.55 ±0.41	2.08 ±0.11	1.80 ±0.15	1.90 ±0.11	1.90 ±0.22	
20:1n9	0.54 ±0.03 ^a	0.50 ±0.06 ^a	1.11 ±0.13 ^b	0.54 ±0.04 ^a	0.85 ±0.10 ^{bc}	0.57 ±0.02	0.68 ±0.03	0.67 ±0.06	0.74 ±0.07	0.75 ±0.08	
24:1	1.02 ±0.07	1.06 ±0.11	1.11 ±0.06	1.03 ±0.05	0.63 ±0.20	0.92 ±0.04	1.22 ±0.09	0.68 ±0.03	1.28 ±0.23	1.48 ±0.18	
ΣMUFA	15.8 ±1.58 ^a	12.8 ±0.64 ^{a*}	13.5 ±1.31 ^{a*}	15.4 ±1.09 ^{a*}	43.5 ±3.94 ^{b*}	21.4 ±4.44	21.8 ±0.88 [#]	18.7 ±1.92 [#]	23.1 ±0.90 [#]	22.6 ±2.57 [#]	
18:3n3	0.19 ±0.02 ^a	0.14 ±0.01 ^{a*}	0.12 ±0.02 ^{a*}	0.11 ±0.02 ^a	0.38 ±0.05 ^b	0.29 ±0.05	0.47 ±0.08 [#]	0.42 ±0.09 [#]	0.35 ±0.04	0.31 ±0.06	
20:3n3	0.27 ±0.02	3.16 ±2.65	0.20 ±0.04	0.16 ±0.04	1.08 ±0.52	ND	ND	ND	ND	ND	
20:5n3	1.14 ±0.34	1.92 ±0.49	1.94 ±0.86	2.42 ±0.45	0.30 ±0.05	0.69 ±0.07	0.95 ±0.05	0.70 ±0.06	1.50 ±0.16	3.72 ±2.66	
22:4n3	0.82 ±0.44 [*]	0.91 ±0.39	0.98 ±0.53	1.24 ±0.32	0.15 ±0.05	0.21 ±0.05 [#]	0.50 ±0.09	0.23 ±0.01	0.90 ±0.20	0.92 ±0.38	
22:5n3	0.48 ±0.06 ^a	0.57 ±0.07 ^a	0.64 ±0.02 ^a	0.64 ±0.06 ^a	0.18 ±0.04 ^b	0.25 ±0.06	0.21 ±0.03	0.33 ±0.05	0.54 ±0.18	4.13 ±3.78	
22:6n3	16.7 ±2.40 ^{a*}	21.1 ±1.45 ^{a*}	18.5 ±0.44 ^{a*}	18.1 ±1.77 ^{a*}	0.98 ±0.56 ^{b*}	6.95 ±2.52 [#]	5.46 ±0.87 [#]	9.72 ±1.85 [#]	7.39 ±1.37 [#]	5.81 ±1.96 [#]	
ΣPUFA n3	19.2 ±2.29 ^{a*}	27.8 ±4.22 ^a	22.2 ±1.16 ^{a*}	22.6 ±1.40 ^{a*}	2.37 ±0.97 ^{b*}	8.26 ±2.61 [#]	7.40 ±1.00	11.2 ±1.96 [#]	10.3 ±1.34 [#]	14.2 ±6.15 [#]	
18:2n6c	3.05 ±0.23 ^a	2.64 ±0.10 ^a	2.39 ±0.41 ^{ab}	3.54 ±0.31 ^a	10.2 ±1.46 ^{b*}	3.54 ±1.20	3.47 ±0.21	3.77 ±0.28	3.75 ±0.49	3.12 ±0.30 [#]	
18:2n6t	0.42 ±0.19	0.66 ±0.19	0.92 ±0.60	1.13 ±0.39	0.20 ±0.03	0.33 ±0.17	0.39 ±0.08	0.22 ±0.02	0.48 ±0.01	0.84 ±0.44	

Ácido graxo (%)	Período agudo					Período de recuperação				
	CTR pH neutro	pH ácido	Alumínio	Manganês	Al+Mn	CTR pH neutro	pH ácido	Alumínio	Manganês	
18:3n6	0.29 ±0.03*	0.41 ±0.09	0.39 ±0.06	0.52 ±0.06	0.33 ±0.06	0.53 ±0.05 [#]	0.69 ±0.04	0.66 ±0.10	0.50 ±0.12	0.55 ±0.08
20:2n6	1.41 ±0.30	0.84 ±0.16	1.19 ±0.19*	1.04 ±0.14	1.31 ±0.85	1.09 ±0.45	0.60 ±0.03	0.54 ±0.03 [#]	0.68 ±0.08	0.50 ±0.04
20:3n6	1.78 ±0.17 ^a	1.98 ±0.11 ^a	2.25 ±0.11 ^a	1.94 ±0.04 ^a	0.67 ±0.16 ^b	1.42 ±0.99	1.41 ±0.08	1.48 ±0.05	1.89 ±0.08	1.25 ±0.18
20:4n6	16.3 ±1.91 ^a	17.7 ±0.28 ^{a*}	16.1 ±0.78 ^a	15.1 ±0.71 ^a	1.92 ±0.84 ^{b*}	12.1 ±3.10	8.67 ±0.51 [#]	12.6 ±1.55	11.3 ±1.49	9.15 ±1.94
22:2n6	0.85 ±0.42	1.18 ±0.44	1.17 ±0.71	1.66 ±0.44	0.35 ±0.06	0.49 ±0.07	0.87 ±0.11	0.54 ±0.06	1.16 ±0.19	1.53 ±0.45
22:4n6	2.98 ±0.41 ^a	3.21 ±0.16 ^{ac}	4.02 ±0.30 ^{c*}	2.80 ±0.06	0.50 ±0.25 ^{b*}	1.30 ±0.28	1.23 ±0.13	1.87 ±0.25 [#]	1.85 ±0.32	1.73 ±0.38 [#]
22:5n6	4.39 ±0.69 ^{a*}	4.97 ±0.21 ^a	5.34 ±0.21 ^{a*}	4.03 ±0.59 ^{a*}	0.47 ±0.19 ^b	1.58 ±0.57 [#]	1.65 ±0.25	2.75 ±0.52 [#]	2.02 ±0.29 [#]	1.99 ±0.53
ΣPUFA n6	31.2 ±2.99 ^{a*}	30.1 ±3.58 ^{a*}	33.7 ±1.17 ^{a*}	31.7 ±0.71 ^{a*}	15.7 ±1.60 ^b	22.4 ±2.77 [#]	19.0 ±0.77 [#]	24.4 ±2.12 [#]	23.5 ±2.00 [#]	20.0 ±2.59
ΣPUFA total	50.4 ±5.15 ^{a*}	57.9 ±1.48 ^{a*}	56.0 ±1.65 ^{a*}	54.4 ±1.52 ^{a*}	18.1 ±2.47 ^{b*}	30.6 ±4.06 [#]	26.4 ±1.71 [#]	35.6 ±4.07 [#]	33.9 ±2.92 [#]	34.3 ±6.13 [#]

^{ab} Letras diferentes significam diferenças entre os grupos do tratamento agudo. Símbolos (*[#]) representam diferenças entre o grupo agudo e recuperação. CTRL- grupo controle, Al+Mn – grupo com os dois metais juntos. ND- não detectado.

Capítulo 3

*Efeitos do alumínio nos substratos energéticos de fêmeas do
peixe neotropical dulcícola *Astyanax bimaculatus*
(Teleostei: Characidae)**

*Como este capítulo já foi publicado ele foi apresentado redigido na língua inglesa

Vieira, VARO; Correia, TG; Moreira, RG. 2013. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. *Comparative Biochemistry and Physiology* 157 C, 1-8 (appendix 8).

Resumo

Neste estudo, foram investigados os efeitos do pH ácido e do Alumínio (Al) durante exposição aguda nos substratos metabólicos de *Astyanax bimaculatus*, assim como a habilidade dos animais de se recuperarem em água limpa. Depois de um período de aclimação, fêmeas maduras de *A. bimaculatus* foram aleatoriamente divididas em seis aquários de vidro em três grupos experimentais: controle em pH neutro (7.0), pH ácido (5.5) e Al ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) em pH ácido (5.5). Após 96 horas de tratamento, 10 animais de cada grupo experimental foram amostrados e o restante transferido para água limpa em pH neutro, sem Al, para o período de recuperação de 96 horas. A exposição ao Al diminuiu a concentração de proteínas nos ovários e no plasma, glicogênio muscular, além de alterar as porcentagens de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) no fígado, e PUFA nos ovários e promover lipoperoxidação hepática. No período de recuperação houve diminuição da concentração de lipídios em vários tecidos, provavelmente para restabelecer as proteínas nos ovários e o glicogênio hepático. *A. bimaculatus* priorizou o uso dos recursos energéticos para aclimação ao Al ao invés de priorizar a reprodução, evitando assim a ovulação de oócitos debilitados.

Abstract

In this study, we investigated the effects of acidic pH and acute aluminum (Al) exposure on the metabolic substrates of *Astyanax bimaculatus*, as well as on the ability of these animals to recover in clean water. After an acclimation period, sexually mature *A. bimaculatus* females were sorted into six glass aquariums with three experimental groups: control in neutral pH (7.0), acidic pH (5.5), and Al ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) in acidic pH (5.5). After 96 h treatment, 10 animals from each experimental group were sampled and the rest were returned to clean water in neutral pH without Al for a recovery period of 96 h. Al exposure decreased ovary and plasma proteins, muscle glycogen contents, altered the percentage of hepatic MUFA and PUFA and PUFA in ovaries, and also hepatic lipids due to lipoperoxidation. In the recovery phase, lipids decreased in most tissues, probably to re-establish ovary protein and hepatic glycogen. *A. bimaculatus* prioritized the use of energetic resources during acclimatization to Al instead of prioritizing reproduction, thereby avoiding the ovulation of impaired eggs.

1. Introduction

Of the environmental impacts caused by humans, water pollution is often considered the most harmful (Araújo, 1998). Environmental water pollutants, such as metals, are very harmful to many aquatic organisms. Many studies have been undertaken in attempts to understand the effects of metals on animal physiology (Levesque et al., 2002; Barcarolli and Martinez, 2004; Garg et al., 2009), development (Couture and Pyle, 2012), reproduction (Correia et al., 2010), and behavior (Vieira et al., 2009). Metabolic dysfunctions caused by aquatic pollutants can occur from disruptions at many physiological levels. The storage and/or mobilization of energetic fuels, such as glucose, fatty acids, and amino acids, can be altered by exposure to several metals, including cadmium (Almeida et al., 2001; De Smet and Blust, 2001) and aluminum (Al) (Correia et al., 2010). The specific mechanisms by which these metals alter metabolic substrate metabolism are unclear; however, they may have toxic effects on the number and/or activity of metabolic enzymes (Soengas et al., 1996).

Al is an important metal found in the earth's crust that is used in multiple anthropogenic activities; however, its precise effects on biological systems are still unclear. The solubility of Al in water depends on the presence of several compounds (e.g., H^+ ions) that create multiple chemical forms of Al [Al^{3+} , $AlOH_2$, $Al(OH)_2^+$], thereby determining Al toxicity. Cations can react with many anions, resulting in numerous Al complexes. When no significant amounts of anions are available, Al forms hydroxides, and the relative stability of these hydroxides depends on pH and anionic concentration (Smith, 1996; Berthon, 2002). Studies on Al toxicity in fish show that Al is solubilized at an acidic pH, and due to the chemical characteristics of this metal, the percentage of inorganic Al, which is the most toxic form to fish, is higher than that of its organic form at an acidic pH (Gensemer and Playle, 1999). Additionally, the acidity itself can have several physiological effects on hematological (Carvalho and Fernandes, 2006; Camargo et al., 2009), metabolic (Miron et al., 2008), and endocrinological (Correia et al., 2012) parameters. When acidic pH and Al both occur in water, the deleterious effects on fish are most pronounced in their gills and result in many physiological alterations (Teien et al., 2006; Camargo et al., 2009).

Effective acclimatization, detoxification, and tolerance mechanisms are critical for the survival of a species in a polluted environment. At some point, however, environmental changes may surpass the mean allostatic capacity of individuals and

cause stress, disturbing both their homeostasis (Wendelaar Bonga, 1997; McEwen and Wingfield, 2003) and potential to reproduce (Kime, 1995). Most studies that evaluated the effects of Al on fish physiology restricted subjects to juveniles; therefore, endocrine and metabolic disturbances of Al on reproduction are poorly understood (Vuorinen and Vuorinen, 1991; Vuorinen et al., 2003; Hwang et al., 2000; Correia et al., 2010). Exposure of reproductively active animals to Al can cause physiological damage to parental (Correia et al., 2010) and offspring fish, depending on the period of exposure and the recovery capacity of the animals (Garg et al., 2009).

Considering the effects of Al on fish physiology, and the effects of pH on Al speciation, this study was designed to evaluate (1) the effects of acute exposure to Al in acidic pH and to acidic pH alone on the major energetic substrates in *Astyanax bimaculatus* females at their vitellogenic stage of reproduction; and (2) the ability of these animals to recover to baseline conditions after a recovery period of 96 h in clean water.

2. Materials and Methods

2.1 Water chemistry

The water used was filtered through two cellulose filters (IMPAC® – CEP 10, São Paulo, SP, Brazil and Acqualimp® FICZ –10, Valinhos, SP, Brazil) that contained an activated charcoal filter (5 µm) to remove solid particles and reduce both organic matter and any possible chemical contaminants. The physical and chemical parameters of the initial water were subsequently evaluated and described. The experimental media were continuously aerated, and water temperature (maintained at approximately 25°C with a heater) and dissolved oxygen (maintained at approximately 7 mg·L⁻¹ with aerators) were monitored daily with an oximeter (model 55; YSI, Yellow Springs, OH, USA), which measures both oxygen and water temperature. Al concentration was monitored before and after water renewal (Table 1) with an atomic absorption spectrophotometer (GBC, AAS 932 Avanta-Plus, IL, USA).

2.2 Experimental procedures

A. bimaculatus vitellogenic females were donated by the Hydrobiology and Aquaculture Unit of the Energetic Company of São Paulo State (CESP; Paraibuna City, São Paulo, Brazil). *A. bimaculatus* has a wide distribution in South America (Pavanelli

and Caramaschi, 1997), including southeastern Brazil, where Al accumulation is common in soil and consequently in river water (CETESB, 2009). *A. bimaculatus* is an important component of the ichthyofauna and is present in many basins of southeastern regions of Brazil (Pavanelli and Caramaschi, 1997).

The animals ($n = 60$), weighing 49.3 ± 4.56 g and measuring 14.0 ± 0.31 cm, were distributed into six 140-L, $40 \times 50 \times 70$ -cm glass tanks (126 L of water; 10 fish·tank⁻¹; (fish density = 3.9 g·L⁻¹) and maintained for an acclimation period of 15 days under controlled conditions with a 12:12-h photoperiod, partial (80%) and daily renewal of water, and daily commercial feed.

The nominal concentration of Al was 0.5 mg Al·L⁻¹, an average of the concentrations found along the Paraíba do Sul River Basin (i.e., the region of origin of the animals), which is above 0.1 mg Al·L⁻¹, the maximum allowed by Brazilian regulations (CONAMA, 2005). Additionally, similar concentration was found by Pantaleao et al. (2006), who studied *A. bimaculatus* in the Japaratuba River (northeast of Brazil). The Al solution was obtained using aluminum sulfate [Al₂(SO₄)₃; Merck, Darmstadt, Germany] from a stock solution prepared with Milli-Q water that was acidified to pH 2.5 with 65% HNO₃ (Suprapur; Merck).

The fish were sorted into six tanks: control in neutral pH (two tanks), acidic pH (two tanks), and Al + acidic pH (two tanks). Toxicity tests were conducted for 96 h to characterize the effects of this metal in the short term (acute) using animals fasted for 24 h. After 96 h of exposure, five animals from each tank were retained in the tanks, and the water was replaced with clean water (the same physicochemical parameters in all tanks, pH 7.0), for an additional duration of 96 h, to verify the ability of the fish to recover in the absence of the pollutant (i.e., the recovery group). During the recovery period, the animals were given food in order to provide the ideal conditions needed for a possible recovery. The remaining five fish from each tank (10 females per group) were sampled at the end of the 96 h experimental period (i.e., the acute test). The tests were semi-static with partial renewal of water every 24 h, and the parameters were adjusted (with either HCl or NaOH [0.1N]; Synth, Brazil) to pH 5.5 for the acidic pH and Al in acidic pH groups and to pH 7.0 for the neutral pH control group (Table 1).

2.3 Biological sample analyses

After the exposure period during the toxicity test, the fish were transferred to smaller containers and cryoanesthetized. Blood was collected by puncture of caudal

vasculature with heparinized syringes (Liquemine - Roche®). The blood was centrifuged for 5 min at $655 \times g$ to separate plasma, which was then divided into aliquots and stored at -80°C until use. The fish were killed by decapitation following animal care protocols approved by the Biosciences Institute (University of São Paulo) Ethics Committee (protocol 101/2009). Samples of liver, white muscle, and ovaries were collected and frozen at -80°C . The gonads were macroscopically evaluated (size, color, and maturation stage) and in addition to liver, weighed on an analytical balance to calculate the gonadosomatic index (GSI) and the hepatosomatic index (HSI). These indices express the percentage of gonads and liver in relation to the animal body. GSI is an effective indicator of the functional state of the ovaries. A thin slice of the ovaries was fixed in Bouin's solution and analyzed by routine histological techniques to confirm its maturation stage.

2.4 Tissue water content

The tissue water content was analyzed to determine if the alterations in the metabolic substrates were due to changes in water content because substrate data are expressed by wet weight.

The analysis of water content (%) was performed by weighing approximately 10 mg of each tissue and placing it in an oven (60°C) for approximately 24 h until it reached a constant weight. The tissue fragments were removed from the oven and cooled in a desiccator until reaching room temperature, at which time the final weights were determined. The difference between the initial and the final weight was expressed as a percentage of water content in each tissue (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.5 Energetic substrates

Following extraction of the total protein from the tissues with perchloric acid and solubilization of the protein with KOH according to the method of Milligan and Girard (1993), the protein content of both the tissues (white muscle, ovaries and liver) and the plasma were determined by the colorimetric method of Lowry et al. (1951). The protein concentration was calculated using a standard curve of bovine serum albumin (Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO, USA) measured at 660 nm and expressed in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ in tissues and $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in plasma.

Total lipids of the white muscle, ovaries and liver were extracted with a mixture of chloroform, methanol, and water (2:1:0.5) according to methods of Folch et al.

(1957) as adjusted by Parrish (1999) for aquatic organisms. Total lipid content in tissue and plasma was quantified by the enzyme-colorimetric method described by Frings et al. (1972) using cod liver oil (Sigma Diagnostics INS) to create a standard curve measured at 540 nm and expressed in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ in tissues and $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ in plasma.

For glycogen analysis, frozen samples of white muscle and liver were transferred to assay tubes that contained 1 mL of 6N KOH, extracted according to Bidinotto et al. (1997) and quantified according to the Dubois et al. (1956) hydrolytic method using D-glucose (Sigma Diagnostics INS) as a standard curve at 480 nm and expressed in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

2.6 Fatty acids

The lipid extracts (described above) of the animals tissues were separated into polar lipids (phospholipids) and neutral lipids (triglycerides) using an activated silica column (Yang, 1995). Methylation of each fraction was performed with acetyl chloride (5% HCl in methanol) (Christie, 2003), and fatty acid composition was determined as methyl esters using a Varian Model 3900 Gas Chromatograph (GC) coupled with flame ionisation detection (FID). Fatty acids were identified by comparing retention time, using a known standard of fatty acids methyl esters (FAME) (Supelco, 37 components; Sigma–Aldrich). The FAME was analysed on a capillary column (CP Wax 52 CB, 0.25 μm thickness, inside diameter 0.25 mm and 30 m length). Hydrogen was used as a carrier gas at a linear velocity of 22 cm/s. The temperature program was 170⁰ C for 1 min followed by a 25⁰C/min ramp up to 240⁰C, and a final hold time of 5 min. Injector and flame ionisation detector (FID) temperatures were 250 and 260⁰ C, respectively.

2.7 Hepatic lipoperoxidation

The determination of hepatic lipoperoxidation was performed by the Ferrous Oxidation in Xylenol orange (FOX) method, which was modified according to Hermes-Lima et al. (1995). Liver samples were homogenized with methanol and centrifuged at $1.000 \times g$ for 5 min, and the following reagents were added to the supernatant: 1 mM FeSO_4 , 0.25 M H_2SO_4 , 1 mM xylenol orange, and MilliQ water to a total volume of 0.9 mL. The samples were incubated for 1 h at room temperature, and their absorbance was measured in a spectrophotometer at 580 nm. Next, cumene hydroperoxide (5×10^{-3} mM) was added, and the absorbances of the samples were measured again at 580 nm. The

oxidation of ferrous ion, in the presence of xylenol orange, determined the hydroperoxidation of lipids. The results were expressed in CHP equivalents as $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight.

2.8 Statistical analysis

Data were expressed as means $\pm$ standard errors of the mean (SEMs). Mean values were compared among treatments (control, acidic pH and Al in acidic pH), using either a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for parametric data or a Kruskal–Wallis test followed by Dunn's pos hoc test for non-parametric data. Exposure periods (acute and their respective recovery group) were compared with either a t-test for parametric data or a Mann-Whitney Rank test for non-parametric data. For the fatty acids, firstly the total classes (Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids) were compared and if statistical differences were found among groups, the fatty acids were analyzed individually with the same tests already cited. For all analyses, differences were significant when $P < 0.05$. These analyses were performed using the statistical software, BioStat for Windows v2009 (AnalystSoft Inc.).

3 Results

3.1 Water chemistry

The water physical and chemical parameters (temperature, pH and dissolved oxygen) were monitored, and if necessary, adjusted to maintain the expected values (Table 1). Concentrations of nitrogenous compounds (NH_3 and NO_2) showed no significant differences (<0.015 ppm) that could interfere with the results. The total and dissolved Al concentrations were maintained within the expected range (Table 1). Major physical and chemical parameters were evaluated: $\text{Ca}^{2+} = 8.88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Fe} = 0.09 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{SO}_4 = 12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{PO}_4 = 0.46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, total nitrogenous compounds = $0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, alkalinity = $15 \text{ mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, organic matter = 19%, chloride = $4.90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, electrical conductivity (at 25°C) = $65.50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, organic carbon = $1.3 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$, inorganic carbon = $1.2 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$, total hardness = $26 \text{ mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, and turbidity = 1 NTV. All parameters were suitable and allowed a 100% survival rate during the experiment.

Table 1. Physical and chemical parameters of water controlled during the acute test (N=18).

Parameters	CTR in neutral pH	Acidic pH	Al in acidic pH
pH	7.1 $\pm$ 0.03	5.5 $\pm$ 0.07	5.3 $\pm$ 0.04
Dissolved oxygen (mg.L ⁻¹)	7.1 $\pm$ 0.17	7.1 $\pm$ 0.18	7.1 $\pm$ 0.16
Temperature (°C)	25.1 $\pm$ 0.33	24.5 $\pm$ 0.21	24.6 $\pm$ 0.16
Total Aluminum (mg.L ⁻¹)	n.d.	n.d.	0.6 $\pm$ 0.02
Dissolved Aluminum (mg.L ⁻¹)	n.d.	n.d.	0.4 $\pm$ 0.06

Values of pH, dissolved oxygen, temperature and aluminum are expressed as mean $\pm$ SEM. n.d. - not detected; CTR- control group.

3.2 Female maturation stages, GSI and HIS

Macroscopically, the ovaries occupied approximately two-thirds of the coelomic cavity. The ovaries were greenish, slightly vascularized, and full of vitellogenic oocytes. In the histological analyses, vitellogenic oocytes, full of yolk granules and with developed follicular layers, were predominant in the ovaries, whereas perinucleolar oocytes were less common (Figure 1), thereby confirming that females were in the mature stage of the reproductive cycle. GSI varied from 14.0% to 18.7%, and HSI varied from 0.64% to 1.02%, with no statistical differences among the experimental groups for either index (Figure 2).

Figure 1. Histological sections of *Astyanax bimaculatus* ovaries from the acute treatment (96 h) to confirm maturation stage. A) Many vitellogenic oocytes (Ovs) and only a few perinucleolar oocytes (Ops) (bar: 400 μ m). B) Vitellogenic oocytes (Ovs), with yolk granules and oocytes in the perinucleolar phase (Op) (bar: 75 μ m).

Figure 2. Gonadosomatic (A) and hepatosomatic (B) indices (%) in mature female *Astyanax bimaculatus*, during the acute Al test (96 h) and the recovery phase (96 h). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group.

3.3 Tissue water content

Because substrate data are expressed in wet weight, the tissue water content was analyzed to determine if alterations in metabolic substrates were due to changes in water content. In animals maintained in neutral pH, the values were: $82.3 \pm 2.00\%$ for liver, $59.1 \pm 1.65\%$ for ovaries, and $76.2 \pm 1.14\%$ for muscle during the acute test, and $80.9 \pm 2.59\%$ for liver, $58.9 \pm 1.51\%$ for ovaries, and $78.3 \pm 0.59\%$ for muscle during the recovery test. In the animals exposed to acidic pH, the values were: $80.3 \pm 2.20\%$ for liver, $57.2 \pm 0.86\%$ for ovaries, and $75.2 \pm 1.96\%$ for muscle during the acute test, and $80.1 \pm 2.21\%$ for liver, $57.2 \pm 0.21\%$ for ovaries, and $78.2 \pm 0.49\%$ for muscle during the recovery test. In the animals exposed to Al, the water content values were: $83.8 \pm 2.49\%$ for liver, $62.0 \pm 1.37\%$ for ovaries, and $77.9 \pm 1.33\%$ for liver during the acute test, and $82.9 \pm 2.68\%$ for liver, $61.1 \pm 1.93\%$ for ovaries, and $77.3 \pm 2.94\%$ for muscle during the recovery test. No differences in water content were found during the acute experiment or after the recovery period.

3.4 Energetic substrates

We analyzed the metabolic substrate data by comparing the results of tissue and plasma content among the different treatments. The acidic pH did not alter lipid mobilization. Al exposure, however, decreased hepatic lipid content compared to that in the control and acidic pH groups, whereas no alterations were found in other tissues or

plasma (Figure 3). After the recovery period, the lipid content decreased in all tissues with all treatments.

Figure 3. Total lipid concentration in liver (A), ovaries (B), muscle (C) and plasma (D), in mature female *Astyanax bimaculatus* during the acute Al test (96 h) and the recovery phase (96 h). The values are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group. ^{ab} Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among acute treatments (CTR with neutral pH, acidic pH and Al in acidic pH). * Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

Exposure to acidic pH did not alter protein content in either tissue or plasma. Conversely, Al exposure decreased protein content in the ovaries and plasma compared to exposure to the neutral pH CTR and acidic pH. After the recovery phase, protein content decreased in plasma and liver of both the control and acidic pH groups, but increased in the ovaries above the levels of the control groups. Although the experimental conditions did not change protein content in liver and muscle, exposure to clean water decreased hepatic protein in females from all groups and decreased muscle protein in animals exposed to Al (Figure 4).

Figure 4. Total protein concentration in the liver (A), ovaries (B), muscle (C) and plasma (D), in mature female *Astyanax bimaculatus* during the acute Al test (96 h) and the recovery phase (96 h). The values are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments (CTR with neutral pH, acidic pH and Al in acidic pH) in acute (ab) and recovery phase (a'b'). * Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

Exposure to acidic pH did not lead to altered hepatic and muscular glycogen, but exposure to Al resulted in decreased muscular glycogen compared to levels in animals maintained in neutral pH. Following the recovery period, the glycogen content continued to decrease in the white muscle of all groups, whereas glycogen content in the liver increased in animals previously exposed to Al (Figure 5).

Figure 5. Glycogen concentration in the liver (A) and the muscle (B) of mature female *Astyanax bimaculatus* during the acute AI test (96 h) and the recovery phase (96 h). The values are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group. ^{ab} Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among acute treatments (CTR with neutral pH, acidic pH and AI in acidic pH). * Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

3.5 Fatty acid profiles

During the acute period, there was an increase in hepatic total polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the neutral fraction (Figure 6). In polar fraction there was an increase in PUFA, mainly in PUFA n3, individually in the 20:3n3 and 22:6n3 (appendix 2) and a decrease in monounsaturated fatty acids (MUFA) (Figure 7). In ovaries there was an increase in PUFA, on both, polar (Figure 7) and neutral fraction (Figure 6) of the animals exposed to AI (Figure 6). In the recovery period there were alterations only in the ovaries, where the acidic pH group showed a decrease in MUFA and increase in PUFA content but the values were not different comparing with the respective acute group (Figure 7). When the acute and recovery periods were compared, animals from the control group showed differences in most tissues and fractions, but without a clear tendency (Figures 6, 7 and 8).

AI did not affect plasma fatty acids in the acute phase but, promote a decrease in total PUFA and an increase in SFA in the animals of recovery phase when compared with their respective acute group (Figure 8)

Figure 6. Fatty acids from the neutral fraction in *Astyanax bimaculatus* in liver (A), ovaries (B) and muscle (C) during acute and recovery phases. ^{ab}Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments (CTR with neutral pH, acidic pH and Al in acidic pH) in acute period. * Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

Figure 7. Fatty acids from the polar fraction in *Astyanax bimaculatus* in liver (A), ovaries (B) and muscle (C) during acute and recovery phases. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments (CTR with neutral pH, acidic pH and AI in acidic pH) in acute (ab) and recovery phase (a'b'). *Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

Figure 8. Fatty acids in *Astyanax bimaculatus* plasma in the experimental groups during acute and recovery treatment. *Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

3.6 Lipoperoxidation in the liver

The peroxidation of the hepatic phospholipids increased in animals upon exposure to AI during the acute test. After the recovery phase, the hepatic lipoperoxidation index returned to the level found in animals from the control groups (Figure 9).

Figure 9. Lipid peroxidation in the liver of mature female *Astyanax bimaculatus*, during the acute AI test (96 h) and the recovery phase (96 h). The values are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group. ^{ab}Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among acute treatments (CTR neutral pH, acidic pH and AI in acidic pH). *Bar with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

4. Discussion

The influences of acidic pH and Al on metabolic substrates were analyzed in an acute experiment on tropical *A. bimaculatus* vitellogenic female fish. The ability of *A. bimaculatus* females to recover from acidic pH and Al exposure was also evaluated. In general, we found that 96 h of exposure to Al in acidic pH was enough to alter protein metabolism, increase hepatic lipid peroxidation, hepatic PUFA and MUFA, PUFA in the ovaries and change carbohydrate mobilization patterns. Some alterations could be re-established after 96 h of maintenance in clean water, but others remained unchanged.

Some studies have shown that the effects of metals on the metabolism of an organism depend on several factors, including species type, exposure time and the presence of other substances that may interact with the compound and thereby change its mode of action in the body (Aragão and Araújo, 2006). Garg et al. (2009) observed different responses in metabolic substrates following exposure to cadmium, zinc, and arsenic. The data from this study showed reduced levels of carbohydrates and lipids in the gill, muscle and lipids of three different fish species (*Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, and *Catla catla*). The results of previous studies are not similar to those for *A. bimaculatus*, demonstrating that organisms respond in different ways depending on the type of pollutant, including metals. Applying this scenario to the natural environment, physiological fish responses may change even more as a result of an infinite range of variables in rivers (Mozetto and Zagatto, 2006).

Water pH is one of the main factors that influence the toxicity of substances present in water, including metals (Aragão and Araújo, 2006). Many studies have reported that acidic pH alone results in deleterious effects on many fish populations (Exley et al., 1991). Effects of acidic pH include high oxygen consumption and ionic regulatory dysfunctions, as well as endocrine and metabolic alterations (Tam et al., 1987). Each animal has a range of tolerance to pH variation: pH 5.5 is not lethal to *A. bimaculatus*, as this species tolerates pH variations from 5.5 to 7.5 (Planquette et al., 1996). This fact, together with the results obtained in this study, shows that most of the effects observed are likely due to Al exposure.

Toxicity tests performed in tropical fish in the presence of Al and acidic pH conditions showed that Al causes disturbances in hematological (Barcarolli and Martinez, 2004), endocrinological (Correia et al., 2010), ionoregulatory (Camargo et al., 2009) and hepatic metabolic parameters (Levesque et al., 2002). Altered functions in hepatic metabolism were also found in this study, in which a decrease in hepatic lipids

observed after exposure to Al could be due to excessive lipid peroxidation from damage to cell membranes and/or an enhanced activity of triacylglycerol lipase, the enzyme that hydrolyses triglyceride reserves (Levesque et al., 2002). The first option is more suitable considering that the lipids of this study were not mobilized to other tissues (at least not the ones analyzed) or to the plasma. Our data also showed that Al promoted lipid peroxidation in the liver.

Another evidence about hepatic peroxidation is the alteration observed in the percentage of fatty acids in membrane phospholipids when the animals were exposed to Al, with increased PUFA (mainly C22:6n3) and decreased MUFA which may indicate a membrane restructuring in stress situations. According Hulbert and Else (1999) PUFA are more susceptible to oxidative attack than MUFA due to chemical difference between them but, in the same time, the presence of a higher percentage of PUFA influences the speed of membrane-associated processes and consequently the cellular metabolic rate.

The liver is the main organ involved in metabolic processes during intoxication, and also the target organ for vitellogenin synthesis. Therefore, the effect of Al on this organ can negatively impact vitellogenesis and embryo endogenous feeding (Wahli et al., 1981). In *Oreochromis niloticus*, acute Al exposure also causes a decrease in hepatic lipids of vitellogenic females; however, this substrate is mobilized to the ovaries (Correia et al., 2010). Conversely, Al does not produce the same effects in *A. bimaculatus* females, emphasizing the ability of Al to promote lipid peroxidation in the liver (Norris et al., 2000) and not just an intense lipid mobilization to the vitellogenic oocytes, as proposed by Correia et al. (2010). Species studied by these authors (e.g., *Oreochromis niloticus*), however, have asynchronous oocyte development with multiple spawnings in 1 year and have less dependence on environmental conditions (Correia et al., 2010) than *A. bimaculatus*. This species can also have multiple spawnings, but spawning is restricted to a single period of the year, November to February (Agostinho et al., 1984), which can interfere with the metabolic strategy adopted by females facing adverse environmental conditions.

The reproduction can be affected by several factors and some investigations have been performed about the role of lipids and fatty acids in the membrane biochemistry with direct implications on reproduction (Borlongan and Benitez, 1992). The increase observed in PUFA of phospholipids and triglycerides in the ovaries of the animals exposed to Al, may indicate the membrane re-allocation due to altered metabolic conditions in this tissue, facilitating the transport across the membrane and/or

supplying substrates to produce prostaglandins, thromboxanes and/or leukotrienes, which play important role in fish reproduction (positive or negatively), and regulate the immune response (Bell et al., 1995; Bell and Sargent, 2003).

A disturbed environment without food can lead to the recruitment of non-carbohydrate sources, such as protein, for glucose production (Wendelaar Bonga, 1997). In vitellogenic *A. bimaculatus* females, the ovaries were considered to be important protein depots, with protein content that exceeded even that of muscle and liver. Changes in gonadal protein content during acute AI exposure may indicate a mobilization of this source to meet the required energy demand. Therefore, the results of this study suggest that in the face of AI intoxication, parts of proteins could be used for a reactive rheostatic response (Mrosovsky, 1990). During the recovery period, however, our values increased again, indicating that the exposure period in clean water (96 h) was sufficient for the animals to recover this important nutritional source for vitellogenesis and to replenish the oocyte growth process (Lubzens et al., 2010). At the same time, parallel analyses with the same females caused an increase in estradiol (Correia, 2012), the main steroid that modulates vitellogenesis through the synthesis of vitellogenin (Lubzens et al., 2010). The cost of reproduction is strongly influenced by the reproductive strategy of each species. In this study, AI exposure influenced synchronous group spawning in females during vitellogenesis, changing the mobilization pattern of substrates during a stage prior to final maturation.

AI is an endocrine disruptor because it causes alterations in progesterone production in *Oreochromis niloticus* (Correia et al., 2010). The impact on the endocrine system can affect an animal's metabolism because a decrease in hepatic lipids can impair the biosynthesis of steroid hormones. Additionally, a reduction in protein in the vitellogenic ovaries will ultimately produce eggs deficient in protein. In *A. bimaculatus*, however, the adverse condition does not seem to accelerate spawning, as is suggested for *O. niloticus* (Correia et al., 2010). *A. bimaculatus* likely prioritizes physiological adjustments when exposed to AI, and following the recovery period, females resume vitellogenesis, as supported by an increase in the protein content of ovaries.

We conducted metabolic analyses during the recovery period to evaluate whether 96 h in clean water is a sufficient time period for animals to recuperate the losses caused by exposure to AI and/or acidic pH. In many situations, however, some patterns of substrate content were observed, even in the control group, as decreased hepatic lipids, hepatic proteins, and muscle glycogen, together with increased ovary

protein. These results were common for most groups, independent of treatment, suggesting that the extension of 96 h in the tanks and/or the food supply were the determinants for the metabolic profiles, rather than the treatment.

A. bimaculatus prioritized the maintenance of glycogen levels in the liver during the recovery period, and these stocks were maintained with energy contribution from muscle glycogen, proteins and lipids. According to Bhattacharya (1998), the depletion of glycogen stocks may be an initial sign for regulation of intermediary metabolism, resulting in hepatocyte protection from xenobiotics. Additionally, according to Christiansen and Klungsoyer (1987), liver glycogen is considered the emergency energy supply, particularly in critical situations, while muscle glycogen is responsible for supplying energy during periods of exhaustion, hunting, and/or escape. Al causes respiratory disturbances (Poléo et al., 1997, Camargo et al., 2009) that result in hypoxia, and the most appropriate way to obtain glucose in this case is through glycolysis in muscle and liver. Furthermore, glucose can be used as a substrate for the synthesis of nucleic acids, while some studies show that Al is genotoxic (Galindo et al., 2010). Together, these data suggest that glycogen is an important energetic substrate used by animals in Al intoxication. Other metals such as nickel, cadmium, zinc, and copper act directly on carbohydrate metabolism by influencing mobilization and utilization of energy sources under stressful conditions (Levesque et al., 2002). Because *A. bimaculatus* displayed small deposition of this substrate in muscle and liver, the ovary protein was also used as a significant energy substrate during exposure to metal stress.

During the recovery period, even for the control groups, some alterations indicated that vitellogenic females were stressed by the toxicity tests. Animal responses to environmental changes, such as social disturbance and alteration in water quality, include adjustments that alter the “set point” of some physiological conditions (i.e., allostasis, which is the ability to achieve stability through changes; McEwen and Wingfield, 2003). This means that the “set point” of biological processes that are essential for life can change due to stress. Schreck (2000) noted that allostasis is very important in fish physiology. Indeed, this was clearly observed in our results, in which *A. bimaculatus* females were sensitive to changes in management. During the recovery period, the effect of the metal is likely not isolated but part of a set of stressor factors (i.e., the containment and maintenance location in the toxicity tests during the acute experiment).

Under constant stress, physiological responses can be intense, with energetic demand to establish homeostasis that re-allocates energy to growth and reproductive activities (Wendelaar-Bonga, 1997), all depending on the spawning strategy of the considered species. Jalabert (2008) reported that fish in the reproductive stage, mainly during maturation and spawning periods, are very vulnerable to stressors due to reallocation of energy resources associated with stress responses. In this study, animals prioritized the mobilization of energy substrates in order to acclimatize to the unfavorable environment. This negatively impacted reproduction and spawning, corroborating the findings of Vuorinen and Vuorinen (1991), who showed that *Coregonus wartmanni* females, when exposed to Al in acidic pH, are less likely to spawn. Their response involved a decrease in the number of oocytes and the amount of yolk they carried, all due to reallocation in energy resources.

In conclusion, we observed that 96 h of exposure to Al in an acidic pH environment is sufficient to alter the pattern of deposition and mobilization of energetic substrates, mainly in ovary proteins, hepatic lipids (including fatty acids) and muscle glycogen. Maintenance of animals for 96 h in clean water was not enough for recovery of most parameters, except for a partial re-establishment of ovary proteins. Mature *A. bimaculatus* females, even when exposed to a metal that acts as an endocrine disruptor, appear to prioritize the acclimatization process before proceeding with the perpetuation of their species, thus avoiding the release of metabolically impaired eggs.

Acknowledgments

The authors would like to thank CESP (Companhia Energética de São Paulo) for providing the animals and FAPESP (2008/57687-0) for financial support.

5. References

- Agostinho, C.A., Molinari, S.L., Agostinho, A.A., Verani, J.R., 1984. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L.) (Osteichthyes-Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. Rev. Brasil. Biol. 44(1), 31-36.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal Pai Silva, M., Alves Júnior, R., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Environ. Pollut. 114, 169–175.
- Aragão, M.A. and Araújo, P.A., 2006. Métodos de ensaio de Toxicidade de Organismos Aquáticos, in: Zagatto, A.P. and Bertoletti, E. (Eds), Ecotoxicologia Aquática-princípios e aplicações. Rima, São Carlos, p 117-147.
- Araújo, F.G., 1998. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o Rio Paraíba do Sul. Rev. Bras. Biol. 58, 547-558.
- Barcarolli, I.F. and Martinez, C.B.R., 2004. Effects of Aluminum in acid water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72, 639-646.
- Bhattacharya, S., 1998. Mechanisms of Signal Transduction in The Stress Response of Hepatocytes. Int. Ver. Cytol. 184,109-156.
- Bell, G. J., Castell, J. D., Tocher, D. R., MacDonald, F. M. & Sargent, J. R., 1995. Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish Physiol. Biochem. 14, 139–151.
- Bell, G. J. and Sargent, J. R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture 218, 491–499.

- Berthon, G., 2002. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coord. Chem. Rev.* 228, 319-341.
- Bidinotto, P.M., Moraes, G., Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *B. tec. CEPTA* 10, 53-60.
- Borlongan, I.G. and Benitez, L.V., 1992. Lipid and fatty acid composition of milk fish (*Charms chunos* Forskall) grown in freshwater and sea water. *Aquaculture* 104, 79-89.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40–46.
- Carvalho, C.S. and Fernandes, M.N., 2006. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture* 251, 109–117.
- Christiansen, D.C. and Klungsoyer, L., 1987. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 88, 701-711.
- Christie, W.W., 2003. *Lipids Analysis*. The Oily Press, Bridgwater. 307p.
- CETESB, 2009. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. Available at: <http://www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes.asp>. [02/02/2011].
- Correia, T.G., Narcizo, A.M., Moreira, R.G., 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 151(4), 461-466.
- Correia, T.G., 2012. Evidências de desregulação endócrina causada pela exposição aquática ao Alumínio e ao Manganês em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758).

PhD. thesis in Physiology. Bioscience Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

CONAMA, 2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> acesso em: 16/06/2012.

Couture, P. and Pyle, G., 2012. Field studies on metal accumulation and effects in fish, in: Woods, C., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals 31A. Academic Press, New York, pp.417-473.

De Smet, H. and Blust, R., 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotox. Environ. Saf.* 48, 255–262.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith F., 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and substances relates. *An. Chem.* 28, 350-358.

Exley, C., Chappell, C., Birchall, J.D., 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *J.Theor.Bio.*151, 417-428.

Folch, J., Less, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-503.

Frings, C.S., Fendly, T., Dunn, R.T., Quenn, C.A., 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clin. Chem.* 18, 673-674.

Galindo, B.A., Troilo, G., Cólus, I.M.S., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2010. Genotoxic Effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. *Water Air Soil Pollut.* 212, 419–428.

- Garg, S., Gupta, R.K., Jain, K.L., 2009. Sublethal effects of heavy metals on biochemical composition and their recovery in Indian major carps. *J. Hazard. Mater.* 163,1369–1384.
- Gensemer, R.W. and Playle, R.C., 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 29, 315–450.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19 (3), 271-280.
- Hulbert, A.J. and Else, P.L. 1999. Membrane as possible pacemaker of metabolism. *J. theor. Biol.* 199,257-274.
- Hwang, U.G., Kagawa, N., Mugyia, Y., 2000. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol – 17 β in the primary culture of hepatocytes in the Rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 69-76.
- Jalabert, B., 2008. An overview of 30 years of international research in some selected fields of the reproductive physiology of fish. *Cybium* 32, 7–13.
- Kime, D. E., 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 5, 52-96.
- Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 1985. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, third ed. IMESP, São Paulo.
- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquat. Toxicol.* 60, 257–267.
- 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.

- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J.. 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 367-389.
- McEwen, B.S. and Wingfield, J.C., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43, 2-15.
- Milligan, C.L., Girard, S.S., 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 180, 175-193.
- Miron, D.S., Moraes, B., Becker, A.G., Crestani, M., Spanello, R., Loro, V.L., Baldisserotto, B., 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture* 277 (3-4), 192-196.
- Mozetto, A.A. and Zagatto, P.A., 2006. Introdução de agentes químicos no ambiente, in: Zagatto, A.P. and Bertoletti, E. (Eds), *Ecotoxicologia Aquática - princípios e aplicações*. Rima, São Carlos, p 16-38.
- Mrosovsky, N., 1990. "Rheostasis – The Physiology of Change" – Oxford University Press, New York.
- Norris, D.O., Camp, M.C., Maldonado, A.C., Woodling, J.D., 2000. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. *Comp. Biochem. Physiol.* 127 C, 121-128.
- Pantaleao S. de M, Alcantara A.V, Alves J. do P., Spano M.A. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil. *Environ. Mol. Mutagen.* 47(3), 219-24.
- Parrish, C.C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples, in: Arts, M.T. and Wainman, B.C., (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer, Verlag, pp. 4-20.

- Pavanelli, C.S. and Caramaschi, E.P., 1997. Composition of the ichthyofauna of two small tributaries of the Paraná river, Porto Roci, Paraná State, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 8(1), 23-31.
- Planquette, P., Keith, P., Le Bail, P.Y., 1996. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 1). Collection du Patrimoine Naturel, vol.22. IEGB-Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, INRA, CSP, Min. Env., Paris. 429 p.
- Póleo, A.B.S., Ostybe, K., Oxnevad, S.A., Andersen, R.A., Heibo, E., Vollestad, L.A., 1997. Toxicity of acid aluminium – rich water to seven freshwater fish species. A comparative laboratory study. *Environ. Pollut.* 96, 129-139.
- Schreck, C.B., 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: Moberg, G.P., Manch, J.A., (Eds.), *The biology of animal stress*. CAB International, Wallingford, pp. 147–158.
- Smith, R.W., 1996. Kinetic aspects of aqueous aluminum chemistry: environmental implications. *Coord. Chem. Rev.* 149, 81-93.
- Soengas, J.L., Agra-Lago, M.J., Carballo, B., Andrés, M.D., Veira, J.A.R., 1996. Effect of an acute exposure to sublethal concentrations of cadmium on liver carbohydrate metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 625–631.
- Tam, W.H., Birket, L., Makaran, R., Payson, P., Whitney, D.K., Y.U., 1987. Modification of carbohydrate metabolism and liver vitellogenic function in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) by exposure to low pH. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 44, 360-635.
- Teien, H.C., Kroglund, F., Salbu, B., Rosseland, B.O., 2006. Gill reactivity of aluminium species following liming. *Sci. Total Environ.* 358, 206–220.

- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior. *Chemosphere* 76 (10), 1416-1427.
- Vuorinen, P.J. and Vuorinen, M., 1991. Effects of long term prespawning acid/aluminium exposure on whitefish (*Coregonus wartmanni*) reproduction and blood and plasma parameters. *Finn. Fish. Res.* 12, 125-133.
- Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Peuranen, S., Tigerstedt, C., 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long-term exposure to acidity and aluminum. *Ecotox. Environ. Safety* 54, 255–276.
- Wahli, H., Dawid, I.B., Ryffel, G.U., Weber, T., 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science* 212, 298-304.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.
- Yang, Z., 1995. Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples. MSc Thesis. Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, 96 pp.

Appendix 1. Percentage of fatty acids of the neutral fraction of *Astyanax bimaculatus* liver during the acute and recovery phases

Fatty acid (%)	Liver neutral fraction								
	Acute phase			Recovery phase					
	CTR neutral pH	acidic pH	Aluminum	CTR neutral pH	acidic pH	Aluminum	CTR neutral pH	acidic pH	Aluminum
14:0	0.29 ±0.02	0.66 ±0.10	0.94 ±0.09	0.57 ±0.13	0.96 ±0.20	0.65 ±0.11			
15:0	0.25 ±0.03	0.31 ±0.08	0.44 ±0.09	ND	ND	ND			
16:0	26.8 ±3.24	25.6 ±2.57	23.0 ±1.22	21.5 ±13.4	30.4 ±3.47	26.1 ±3.09			
17:0	0.65 ±0.07	0.80 ±0.17	1.12 ±0.06	1.73 ±0.06	0.35 ±0.17	0.31 ±0.17			
18:0	7.81 ±0.62	7.84 ±0.33	8.01 ±0.41	9.96 ±2.35	6.83 ±0.49	7.65 ±0.31			
20:0	0.31 ±0.04	0.25 ±0.04	0.41 ±0.04	ND	ND	ND			
ΣSFA	36.3 ±2.84	35.5 ±2.27	33.9 ±1.41	33.4 ±2.16	38.6 ±3.25	34.6 ±3.30			
16:1	2.52 ±0.29	2.45 ±0.13	2.31 ±0.09	2.63 ±0.33	4.55 ±1.51	2.75 ±0.28			
18:1n9	37.4 ±2.84	36.6 ±2.15	30.2 ±2.11	30.3 ±2.96	34.5 ±1.36	34.6 ±3.65			
18:1n7	2.50 ±0.17	2.31 ±0.06	2.33 ±0.09	2.50 ±0.19	2.41 ±0.07	2.21 ±0.16			
20:1n9	1.02 ±0.17	0.87 ±0.11	1.13 ±0.11	ND	0.66 ±0.12	0.66 ±0.13			
24:1	ND	ND	ND	0.43 ±0.13	0.78 ±0.20	0.22 ±0.04			
ΣMUFA	43.5 ±2.67*	42.2 ±2.17	36.0 ±2.24	35.8 ±3.15 [#]	42.7 ±1.74	40.4 ±3.77			
18:3n3	0.24 ±0.04	0.32 ±0.05	0.68 ±0.09	0.53 ±0.19	0.36 ±0.13	0.46 ±0.08			
20:3n3	0.47 ±0.05^a	1.59 ±0.68^{ab}	2.36 ±0.32^b	ND	ND	ND			
20:5n3	1.18 ±0.34	1.34 ±0.36	2.43 ±0.92	2.59 ±0.91	1.70 ±0.43	3.01 ±1.47			
22:4n3	0.85 ±0.55	0.42 ±0.13	1.06 ±0.41	ND	ND	ND			
22:6n3	1.18 ±0.23	1.40 ±0.20	1.75 ±0.19	2.89 ±1.21	1.16 ±0.59	1.50 ±0.57			
ΣPUFA n3	3.83 ±0.65	5.40 ±1.32	8.30 ±1.52	6.01 ±2.56	3.75 ±1.26	6.25 ±2.41			
18:2n6c	8.99 ±1.13	10.0 ±1.80	10.3 ±1.05	10.9 ±1.66	8.17 ±1.49	8.87 ±2.01			
18:2n6t	0.99 ±0.22	1.09 ±0.23	2.69 ±1.24	1.87 ±0.57	1.48 ±0.71	1.78 ±0.67			
18:3n6	0.46 ±0.07	0.40 ±0.06	0.51 ±0.06	0.38 ±0.03	0.31 ±0.07	0.54 ±0.14			
20:2n6	0.79 ±0.06	0.88 ±0.48	0.86 ±0.13	1.53 ±0.52	0.27 ±0.07	0.61 ±0.07			
20:3n6	1.29 ±0.13	0.82 ±0.07	1.19 ±0.19	2.12 ±0.34	0.78 ±0.16	1.26 ±0.24			
20:4n6	1.85 ±0.15	1.52 ±0.10	2.05 ±0.40	3.92 ±2.22	1.45 ±0.48	1.94 ±0.63			
22:2n6	0.89 ±0.38	0.93 ±0.29	1.67 ±0.63	1.94 ±0.16	1.51 ±0.37	3.11 ±1.44			
22:4n6	0.25 ±0.06	0.15 ±0.01	0.27 ±0.05	2.29 ±1.19	0.89 ±0.54	0.46 ±0.07			
22:5n6	0.47 ±0.15	0.51 ±0.11	0.66 ±0.09	1.50 ±0.14	ND	ND			
ΣPUFA n6	15.6 ±0.86	16.0 ±1.43	20.3 ±1.33	24.6 ±2.56	14.8 ±3.29	18.6 ±2.96			
ΣPUFA total	20.0 ±0.19^{a*}	22.2 ±1.46^{ab}	29.9 ±3.06^b	30.6 ±3.91 [#]	18.6 ±4.46	24.8 ±4.79			

CTR- control group, SFA- saturated fatty acids, MUFA-monounsaturated fatty acids, PUFA- polyunsaturated fatty acids, PUFA n3- polyunsaturated fatty acids omega 3, PUFA n6- polyunsaturated fatty acids omega 6. ^{ab} Different letters indicate statistical difference significant among groups (CTR, acidic pH and Al) (p<0.05). ^{*,#} Different symbols indicate statistical difference significant between phases (Acute and Recovery) in their respective groups (CTR-CTR, acidic pH-acidic pH, Al-Al). ND. Not detected.

Appendix 2. Percentage of fatty acids of the polar fraction of *Astyanax bimaculatus* liver during the acute and recovery phases

Fatty acid (%)	Liver polar fraction									
	Acute phase					Recovery phase				
	CTR neutral pH		acidic pH		Aluminum	CTR neutral pH		acidic pH		Aluminum
14:0	0.18	±0.01	0.23	±0.07	0.37 ±0.07	0.16	±0.01	0.22	±0.05	0.22 ±0.02
15:0	0.19	±0.02	0.14	±0.03	0.48 ±0.15	ND		ND		ND
16:0	9.41	±0.10	10.6	±0.73	7.69 ±0.14	12.9	±1.05	12.3	±0.99	11.8 ±0.55
17:0	0.49	±0.01	0.60	±0.03	0.74 ±0.07	0.20	±0.03	0.18	±0.01	0.21 ±0.01
18:0	19.0	±0.44	18.5	±1.77	20.5 ±0.58	19.5	±1.42	18.8	±1.19	16.6 ±2.18
20:0	0.14	±0.01	0.25	±0.05	0.37 ±0.04	ND		ND		ND
21:0	0.10	±0.01	0.17	±0.05	0.18 ±0.01	0.16	±0.01	0.13	±0.01	0.20 ±0.02
22:0	0.30	±0.03	0.65	±0.15	0.35 ±0.08	0.23	±0.02	0.16	±0.01	0.18 ±0.03
24:0	0.31	±0.02	0.31	±0.02	0.36 ±0.03	0.23	±0.02	0.22	±0.01	0.19 ±0.02
ΣSFA	29.8	±0.53*	31.1	±2.44	30.8 ±0.81	33.4	±1.81 [#]	32.1	±0.48	29.4 ±2.46
16:1	0.59	±0.02	0.73	±0.07	0.48 ±0.02	0.76	±0.04	1.18	±0.40	0.82 ±0.06
18:1n9	14.9	±0.39	15.8	±2.60	10.0 ±0.68	15.4	±0.44	15.4	±1.02	14.4 ±1.18
18:1n7	1.25	±0.04	1.44	±0.09	1.24 ±0.03	1.51	±0.09	1.31	±0.09	1.43 ±0.06
20:1n9	0.35	±0.04	0.40	±0.09	0.48 ±0.01	0.41	±0.05	0.35	±0.04	0.35 ±0.02
24:1	0.41	±0.04	0.58	±0.06	0.39 ±0.04	0.37	±0.07	0.29	±0.02	0.35 ±0.03
ΣMUFA	17.5	±0.43 ^a	18.9	±2.73 ^{ab}	12.6 ±0.68 ^{b*}	18.5	±0.48	18.5	±1.48	17.4 ±1.19 [#]
18:3n3	0.16	±0.04	0.14	±0.08	0.33 ±0.04	0.23	±0.03	0.13	±0.02	0.23 ±0.03
20:3n3	ND		0.18	±0.01 ^a	0.45 ±0.04 ^b	ND		ND		ND
20:5n3	0.91	±0.22	2.30	±0.55	0.98 ±0.20	1.38	±0.54	0.99	±0.37	1.06 ±0.27
22:4n3	0.58	±0.16	1.51	±0.46	0.29 ±0.12	ND		0.52	±0.29	0.55 ±0.28
22:5n3	0.41	±0.05	0.42	±0.05	0.66 ±0.08	0.77	±0.11	0.57	±0.10	0.78 ±0.12
22:6n3	13.6	±0.58 ^a	12.4	±2.44 ^a	20.4 ±0.42 ^b	16.0	±0.43	15.7	±0.72	17.4 ±1.28
ΣPUFA n3	15.6	±0.55 ^a	16.8	±2.18 ^a	23.1 ±0.33 ^b	18.4	±0.98	17.9	±1.18	19.9 ±1.47
18:2n6c	3.11	±0.14	4.22	±1.00	4.25 ±0.37	4.01	±0.39	3.85	±0.37	4.51 ±0.38
18:2n6t	0.33	±0.13	0.78	±0.21	0.31 ±0.10	0.29	±0.15	0.13	±0.02	0.24 ±0.12
18:3n6	0.33	±0.05	0.32	±0.03	0.47 ±0.04	0.29	±0.02	0.26	±0.03	0.26 ±0.03
20:2n6	0.99	±0.03	0.73	±0.08	1.34 ±0.13	0.14	±0.02	0.30	±0.16	0.23 ±0.07
20:3n6	3.46	±0.17	2.98	±0.42	2.98 ±0.34	2.97	±0.11	3.00	±0.30	3.15 ±0.26
20:4n6	18.8	±0.48	15.5	±1.42	15.7 ±0.35	15.5	±0.34	17.1	±1.91	17.2 ±0.69
22:2n6	0.67	±0.21	1.84	±0.56	0.58 ±0.20	0.54	±0.38	0.60	±0.34	1.05 ±0.45
22:4n6	3.21	±0.17	2.65	±0.46	2.51 ±0.13	2.41	±0.26	2.28	±0.48	2.36 ±0.12
22:5n6	3.26	±0.08	3.82	±0.64	5.77 ±0.23	3.40	±0.29	3.73	±0.47	4.05 ±0.35
ΣPUFA n6	34.3	±0.31	32.9	±1.81	33.3 ±0.88	29.5	±0.46	31.3	±2.24	33.1 ±0.51
ΣPUFA total	49.8	±0.47 ^a	49.9	±3.63 ^a	56.5 ±0.74 ^b	48.4	±1.42	49.6	±1.28	53.4 ±1.75

CTR- control group, SFA- saturated fatty acids, MUFA-monounsaturated fatty acids, PUFA- polyunsaturated fatty acids, PUFA n3- polyunsaturated fatty acids omega 3, PUFA n6- polyunsaturated fatty acids omega 6. ^{ab} Different letters indicate statistical difference significant among groups (CTR, acidic pH and Al) (p<0.05). ^{*#} Different symbols indicate statistical difference significant between phases (Acute and Recovery) in their respective group (CTR-CTR, acidic pH-acidic pH, Al-Al). ND. Not detected.

Appendix 3. Percentage of fatty acids of the neutral fraction of *Astyanax bimaculatus* ovaries during the acute and recovery phases

Fatty acid (%)	Ovaries neutral fraction									
	Acute phase					Recovery phase				
	CTR neutral pH		acidic pH		Aluminum	CTR neutral pH		acidic pH		Aluminum
14:0	0.77	±0.03	0.67	±0.04	0.79 ±0.15	1.03	±0.08	0.82	±0.04	1.29 ±0.06
15:0	0.21	±0.01	0.20	±0.01	0.22 ±0.01	0.26	±0.01	0.22	±0.01	0.29 ±0.01
16:0	35.5	±0.88	35.3	±0.82	35.3 ±1.82	37.2	±1.78	36.1	±1.04	35.7 ±1.79
17:0	0.36	±0.01	0.37	±0.01	0.38 ±0.02	0.32	±0.02	0.31	±0.01	0.33 ±0.01
18:0	4.19	±0.19	4.19	±0.10	4.50 ±0.32	4.57	±0.36	4.55	±0.17	4.18 ±0.20
ΣSFA	41.0	±0.83	40.7	±0.78	41.2 ±1.71	43.4	±1.83	42.0	±0.99	41.8 ±1.62
16:1	4.12	±0.18	4.01	±0.15	4.12 ±0.25	4.59	±0.32	4.29	±0.15	4.64 ±0.18
17:1	0.30	±0.01	0.31	±0.01	0.31 ±0.01	0.39	±0.11	0.17	±0.01	0.29 ±0.04
18:1n9	40.2	±0.96	40.6	±0.59	37.8 ±1.39	34.6	±1.19	38.1	±0.30	37.6 ±1.27
18:1n7	3.01	±0.07	2.69	±0.06	2.88 ±0.12	2.79	±0.07	2.62	±0.03	2.61 ±0.05
20:1n9	0.40	±0.04	0.33	±0.03	0.43 ±0.05	0.39	±0.02	0.41	±0.01	0.44 ±0.05
ΣMUFA	48.1	±0.86*	47.9	±0.46*	45.6 ±1.36	42.8	±1.45 [#]	45.6	±0.30 [#]	45.6 ±1.25
18:3n3	ND		0.19	±0.02	0.21 ±0.03	ND		0.26	±0.05	0.29 ±0.05
20:5n3	0.18	±0.04	0.15	±0.01	0.20 ±0.02	0.76	±0.27	0.21	±0.03	0.31 ±0.07
22:6n3	0.54	±0.05	0.59	±0.07	0.71 ±0.09	0.82	±0.12	0.83	±0.11	0.60 ±0.06
ΣPUFA n3	0.85	±0.09	0.91	±0.11	1.14 ±0.12	1.71	±0.27	1.26	±0.13	1.20 ±0.12
18:2n6c	6.86	±0.17	7.52	±0.53	8.29 ±0.59	7.76	±0.55	7.83	±0.79	8.46 ±0.83
18:2n6t	0.22	±0.05	ND		0.12 ±0.01	0.51	±0.13	0.25	±0.02	0.31 ±0.03
18:3n6	0.31	±0.04	0.32	±0.01	0.41 ±0.06	0.26	±0.02	0.31	±0.05	0.38 ±0.05
20:2n6	0.49	±0.09	0.54	±0.14	0.70 ±0.05	0.33	±0.02	0.36	±0.06	0.35 ±0.04
20:3n6	0.81	±0.04	0.75	±0.03	0.96 ±0.11	0.86	±0.07	0.82	±0.03	0.72 ±0.03
20:4n6	1.09	±0.15	0.83	±0.05	1.11 ±0.15	0.99	±0.10	1.06	±0.08	0.85 ±0.02
22:2n6	0.14	±0.02	0.25	±0.02	0.27 ±0.01	0.52	±0.32	0.50	±0.37	ND
22:4n6	ND		ND		0.15 ±0.03	0.64	±0.28	0.11	±0.01	0.12 ±0.01
22:5n6	0.17	±0.02	0.19	±0.01	0.23 ±0.02	0.58	±0.18	0.30	±0.04	0.34 ±0.08
ΣPUFA n6	9.97	±0.21	10.3	±0.58	12.0 ±0.59	11.9	±0.72	11.0	±0.89	11.5 ±0.87
ΣPUFA total	10.8	±0.29 ^{a*}	11.2	±0.67 ^{ab}	13.1 ±0.66 ^b	13.6	±0.70 [#]	12.3	±1.00	12.7 ±0.95

CTR- control group, SFA- saturated fatty acids, MUFA-monounsaturated fatty acids, PUFA- polyunsaturated fatty acids, PUFA n3- polyunsaturated fatty acids omega 3, PUFA n6- polyunsaturated fatty acids omega 6. ^{ab} Different letters indicate statistical difference significant among groups (CTR, acidic pH and Al) (p<0.05). [#] Different symbols indicate statistical difference significant between phases (Acute and Recovery) in their respective group (CTR-CTR, acidic pH-acidic pH, Al-Al). ND. Not detected

Appendix 4. Percentage of fatty acids of the polar fraction of *Astyanax bimaculatus* ovaries during the acute and recovery phases

Fatty acid (%)	Ovaries polar fraction									
	Acute phase					Recovery phase				
	CTR neutral pH		acidic pH		Aluminum	CTR neutral pH		acidic pH		Aluminum
14:0	0.14	±0.01	0.12	±0.01	0.18 ±0.03	0.27	±0.04	0.14	±0.01	0.17 ±0.01
15:0	ND		0.31	±0.08	ND	0.16	±0.01	0.10	±0.01	0.12 ±0.01
16:0	14.5	±0.30	12.5	±0.71	12.5 ±1.00	22.7	±2.21	15.8	±0.64	17.6 ±0.92
17:0	0.26	±0.01	0.25	±0.02	0.28 ±0.02	0.26	±0.03	0.17	±0.01	0.20 ±0.01
18:0	13.2	±0.56	13.2	±1.28	13.5 ±0.82	14.7	±1.43	11.5	±0.34	11.4 ±0.45
ΣSFA	28.2	±0.40*	26.3	±0.71	26.6 ±1.28	38.2	±3.56 [#]	27.8	±0.81	29.6 ±1.17
16:1	1.21	±0.04	0.95	±0.11	0.96 ±0.08	2.11	±0.22	1.24	±0.07	1.49 ±0.05
17:1	0.14	±0.01	0.32	±0.07	1.14 ±0.45	0.12	±0.01	ND		ND
18:1n9	21.2	±0.70	18.7	±1.32	17.7 ±1.04	28.9	±3.01	19.6	±1.11	23.0 ±0.56
18:1n7	1.50	±0.04	1.27	±0.02	1.36 ±0.07	1.91	±0.15	1.40	±0.06	1.46 ±0.07
20:1n9	0.40	±0.01	0.38	±0.03	0.41 ±0.03	0.43	±0.04	0.37	±0.04	0.43 ±0.01
24:1	0.18	±0.02	0.22	±0.06	0.20 ±0.01	0.21	±0.03	0.14	±0.01	0.17 ±0.01
ΣMUFA	24.6	±0.66*	21.8	±1.34	21.4 ±0.60*	33.7	±3.39 ^{a#}	22.8	±1.19 ^{b'}	26.5 ±0.70 ^{ab'#}
18:3n3	0.11	±0.01	0.14	±0.01	0.12 ±0.01	0.18	±0.04	0.14	±0.01	0.13 ±0.01
20:5n3	1.27	±0.19	0.98	±0.21	1.62 ±0.52	0.72	±0.21	0.82	±0.11	0.99 ±0.22
22:4n3	0.50	±0.16	0.53	±0.22	0.83 ±0.47	ND		ND		ND
22:5n3	0.49	±0.03	0.67	±0.06	0.60 ±0.02	0.50	±0.12	0.68	±0.04	0.55 ±0.02
22:6n3	14.5	±0.53	17.8	±1.01	15.9 ±0.80	7.60	±3.18	17.7	±1.97	15.1 ±1.66
ΣPUFA n3	16.7	±0.28	19.7	±0.94	18.4 ±0.55	8.89	±3.37	19.3	±1.82	16.8 ±1.89
18:2n6c	3.67	±0.14	3.45	±0.40	3.62 ±0.16	4.87	±0.91	4.11	±0.47	4.46 ±0.20
18:2n6t	0.41	±0.17	0.16	±0.02	1.28 ±0.85	ND		ND		ND
18:3n6	0.15	±0.02	0.13	±0.01	0.15 ±0.01	0.15	±0.01	0.12	±0.01	0.16 ±0.02
20:2n6	1.22	±0.16	1.29	±0.15	1.34 ±0.21	0.76	±0.04	1.11	±0.09	0.98 ±0.07
20:3n6	3.59	±0.10	3.65	±0.16	3.68 ±0.36	2.64	±0.37	4.16	±0.28	3.41 ±0.30
20:4n6	14.0	±0.28	15.3	±0.90	14.7 ±0.55	7.07	±1.94	12.9	±0.96	11.5 ±0.58
22:2n6	0.63	±0.24	0.31	±0.19	0.83 ±0.35	ND		ND		ND
22:4n6	2.92	±0.30	3.00	±0.15	3.17 ±0.39	1.83	±0.55	2.75	±0.45	2.38 ±0.27
22:5n6	3.83	±0.21	4.69	±0.29	5.05 ±0.67	1.89	±0.61	4.79	±0.32	3.88 ±0.26
ΣPUFA n6	30.3	±0.48	32.0	±0.67	33.4 ±1.19	19.1	±3.34	29.9	±1.34	26.8 ±1.14
ΣPUFA total	47.0	±0.53 ^{a*}	51.7	±0.78 ^{ab}	51.9 ±1.56 ^{b*}	28.0	±6.63 ^{a'#}	49.3	±1.82 ^{b'}	43.7 ±1.87 ^{ab'#}

CTR- control group, SFA- saturated fatty acids, MUFA-monounsaturated fatty acids, PUFA- polyunsaturated fatty acids, PUFA n3- polyunsaturated fatty acids omega 3, PUFA n6- polyunsaturated fatty acids omega 6. ^{ab} Different letters indicate statistical difference significant among groups (CTR, acidic pH and Al) (p<0.05). ^{*#} Different symbols indicate statistical difference significant between phases (Acute and Recovery) in their respective group (CTR-CTR, acidic pH-acidic pH, Al-Al). ND- not detected.

Appendix 5. Percentage of fatty acids of the neutral fraction of *Astyanax bimaculatus* muscle during the acute and recovery phases.

Fatty acid (%)	Muscle neutral fraction								
	Acute phase			Recovery phase					
	CTR neutral pH	acidic pH	Aluminum	CTR neutral pH	acidic pH	Aluminum	CTR neutral pH	acidic pH	Aluminum
14:0	0.36 ±0.01	0.43 ±0.03	0.36 ±0.04	0.62 ±0.08	0.48 ±0.06	0.56 ±0.03			
16:0	15.6 ±0.18	16.7 ±0.39	16.0 ±0.80	19.7 ±0.99	17.3 ±0.76	17.5 ±0.74			
17:0	0.27 ±0.01	0.27 ±0.01	0.29 ±0.01	0.27 ±0.06	0.28 ±0.03	0.20 ±0.01			
18:0	7.72 ±0.22	7.42 ±0.19	7.60 ±0.22	7.47 ±0.34	7.21 ±0.22	8.15 ±0.77			
20:0	0.27 ±0.02	0.24 ±0.01	0.28 ±0.01	0.47 ±0.09	0.20 ±0.02	0.25 ±0.01			
ΣSFA	24.2 ±0.18*	25.1 ±0.29	24.5 ±0.81	28.5 ±1.21 [#]	25.4 ±0.74	26.5 ±0.56			
16:1	2.39 ±0.06	2.61 ±0.09	2.48 ±0.12	2.95 ±0.13	2.74 ±0.19	2.74 ±0.20			
17:1	0.14 ±0.30	0.15 ±0.01	0.15 ±0.01	0.39 ±0.11	ND	0.64 ±0.13			
18:1n9	47.2 ±0.54	46.0 ±0.72	44.6 ±1.03	39.8 ±1.58	45.6 ±0.84	41.6 ±2.56			
18:1n7	2.18 ±0.04	2.11 ±0.04	2.17 ±0.08	2.11 ±0.14	2.07 ±0.05	2.05 ±0.05			
20:1n9	0.90 ±0.05	0.76 ±0.05	0.86 ±0.06	1.81 ±0.99	0.75 ±0.08	0.73 ±0.04			
ΣMUFA	52.9 ±0.48*	51.7 ±0.68	50.3 ±0.97	47.1 ±1.15 [#]	51.2 ±0.74	47.5 ±2.50			
18:3n3	0.61 ±0.03	0.65 ±0.04	0.67 ±0.05	0.56 ±0.09	0.72 ±0.08	0.54 ±0.04			
20:5n3	0.31 ±0.03	0.27 ±0.05	0.35 ±0.12	0.92 ±0.21	0.38 ±0.16	1.02 ±0.37			
22:5n3	0.13 ±0.01	0.27 ±0.05	0.54 ±0.04	0.32 ±0.08	ND	0.20 ±0.03			
22:6n3	0.44 ±0.06	0.53 ±0.13	0.63 ±0.14	1.12 ±0.36	0.54 ±0.11	2.54 ±1.64			
ΣPUFA n3	1.46 ±0.08	1.68 ±0.25	1.83 ±0.42	1.70 ±0.23	1.10 ±0.15	1.73 ±0.43			
18:2n6c	18.1 ±0.50	18.6 ±0.55	19.9 ±0.54	15.4 ±0.95	18.7 ±0.98	15.9 ±0.73			
18:2n6t	0.16 ±0.02	ND	0.19 ±0.03	0.57 ±0.21	ND	ND			
18:3n6	0.14 ±0.02	0.11 ±0.01	0.14 ±0.01	0.33 ±0.10	0.15 ±0.04	0.30 ±0.01			
20:2n6	0.68 ±0.08	0.56 ±0.03	0.68 ±0.03	0.86 ±0.32	0.53 ±0.05	0.58 ±0.06			
20:3n6	0.85 ±0.04	0.78 ±0.06	0.91 ±0.07	0.85 ±0.07	0.85 ±0.03	0.94 ±0.16			
20:4n6	1.13 ±0.06	1.09 ±0.09	1.03 ±0.13	1.37 ±0.25	1.08 ±0.05	2.08 ±0.92			
22:2n6	0.16 ±0.01	0.20 ±0.05	0.41 ±0.25	0.46 ±0.15	0.29 ±0.15	0.25 ±0.04			
22:5n6	0.17 ±0.01	0.18 ±0.02	0.23 ±0.05	2.19 ±1.20	0.19 ±0.01	1.49 ±0.47			
ΣPUFA n6	21.3 ±0.57	21.4 ±0.63	23.2 ±0.69	21.5 ±1.01	21.6 ±0.81	21.6 ±0.67			
ΣPUFA total	22.8 ±0.59	23.1 ±0.80	25.0 ±1.01	24.3 ±1.20	23.3 ±0.61	25.8 ±2.18			

CTR- control group, SFA- saturated fatty acids, MUFA-monounsaturated fatty acids, PUFA- polyunsaturated fatty acids, PUFA n3- polyunsaturated fatty acids omega 3, PUFA n6- polyunsaturated fatty acids omega 6. *[#] Different symbols indicate statistical difference significant between phases (Acute and Recovery) in their respective group (CTR-CTR, acidic pH-acidic pH, Al-Al).ND-not detected.

Appendix 6. Percentage of fatty acids of the polar fraction of *Astyanax bimaculatus* muscle during the acute and recovery phases

Fatty acid (%)	Muscle polar fraction										
	Acute phase					Recovery phase					
	CTR neutral pH		acidic pH		Aluminum	CTR neutral pH		acidic pH		Aluminum	
14:0	0.29 ±0.03		0.26 ±0.01		0.24 ±0.01	0.26 ±0.07		0.29 ±0.05		0.33 ±0.13	
15:0	0.28 ±0.05		ND		0.54 ±0.05	ND		ND		ND	
16:0	11.3 ±0.43		11.8 ±0.39		11.1 ±0.56	17.0 ±1.45		16.8 ±0.77		16.8 ±3.37	
17:0	0.59 ±0.03		0.50 ±0.04		0.58 ±0.04	ND		ND		ND	
18:0	14.0 ±0.48		13.0 ±0.47		13.4 ±0.48	12.6 ±1.03		12.2 ±0.84		10.9 ±0.77	
20:0	0.20 ±0.01		0.17 ±0.01		0.19 ±0.02	0.14 ±0.02		ND		0.23 ±0.05	
21:0	0.22 ±0.02		0.16 ±0.01		0.20 ±0.03	0.20 ±0.01		ND		ND	
22:0	0.29 ±0.02		0.30 ±0.07		0.33 ±0.08	ND		ND		ND	
24:0	0.34 ±0.04		0.37 ±0.04		0.51 ±0.03	ND		0.22 ±0.04		0.22 ±0.03	
ΣSFA	27.4 ±3.66		26.5 ±0.62		26.8 ±0.59	30.2 ±1.65		29.4 ±1.34		28.4 ±3.70	
16:1	0.62 ±0.06		0.60 ±0.05		0.52 ±0.04	0.87 ±0.13		1.13 ±0.19		1.42 ±0.35	
17:1	0.55 ±0.19		ND		0.83 ±0.18	1.29 ±0.23		1.30 ±0.21		0.91 ±0.08	
18:1n9	12.7 ±1.44		12.3 ±1.02		10.6 ±0.84	14.9 ±0.77		15.0 ±2.01		23.0 ±4.51	
18:1n7	1.67 ±0.07		1.63 ±0.08		1.42 ±0.03	1.87 ±0.15		1.89 ±0.16		1.91 ±0.13	
20:1n9	0.52 ±0.02		0.38 ±0.03		0.43 ±0.06	0.43 ±0.02		0.55 ±0.09		0.58 ±0.08	
24:1	0.46 ±0.01		0.45 ±0.04		0.55 ±0.04	0.29 ±0.03		0.30 ±0.01		0.49 ±0.09	
ΣMUFA	16.4 ±1.52		15.3 ±1.14*		14.2 ±0.93*	19.4 ±0.89		19.4 ±2.18 [#]		28.2 ±4.98 [#]	
18:3n3	0.22 ±0.01		0.21 ±0.01		0.19 ±0.02	0.23 ±0.02		0.39 ±0.05		0.36 ±0.07	
20:3n3	0.18 ±0.02		0.18 ±0.02		0.26 ±0.07	ND		ND		ND	
20:5n3	1.64 ±0.59		1.40 ±0.28		0.81 ±0.06	1.12 ±0.24		0.77 ±0.15		1.36 ±0.51	
22:4n3	1.10 ±0.05		0.73 ±0.18		0.31 ±0.05	ND		ND		ND	
22:5n3	0.54 ±0.01		0.49 ±0.02		0.54 ±0.02	0.48 ±0.08		0.73 ±0.16		0.66 ±0.03	
22:6n3	17.0 ±0.98		21.7 ±0.86		23.5 ±1.66	18.9 ±2.06		16.0 ±1.85		11.9 ±3.24	
ΣPUFA n3	20.1 ±1.06		24.6 ±0.94		25.4 ±1.69	20.7 ±2.06		17.8 ±1.72		14.3 ±3.75	
18:2n6c	8.33 ±0.38		7.50 ±0.52		6.81 ±0.61	10.2 ±0.47		10.2 ±1.52		10.7 ±1.29	
18:2n6t	0.54 ±0.26		0.38 ±0.12		0.19 ±0.03	ND		ND		ND	
18:3n6	0.47 ±0.05		0.47 ±0.08		0.33 ±0.02	0.33 ±0.01		0.28 ±0.02		0.39 ±0.11	
20:2n6	1.02 ±0.08		0.88 ±0.04		0.96 ±0.10	0.91 ±0.04		1.09 ±0.21		0.85 ±0.06	
20:3n6	2.39 ±0.17		2.18 ±0.11		2.20 ±0.24	2.52 ±0.09		2.41 ±0.22		1.65 ±0.23	
20:4n6	13.6 ±0.54		12.3 ±0.55		13.6 ±0.50	13.3 ±0.75		12.0 ±0.93		8.38 ±2.09	
22:2n6	1.03 ±0.61		0.80 ±0.26		0.24 ±0.09	0.62 ±0.28		0.56 ±0.23		1.91 ±0.17	
22:4n6	1.66 ±0.04		1.59 ±0.08		1.57 ±0.09	ND		1.19 ±0.09		0.83 ±0.16	
22:5n6	7.12 ±0.58		7.27 ±0.26		8.00 ±0.66	1.74 ±0.36		5.94 ±0.36		4.17 ±0.80	
ΣPUFA n6	35.9 ±0.94		33.4 ±0.46		33.4 ±0.94	29.5 ±0.90		33.2 ±0.83		28.9 ±3.59	
ΣPUFA total	56.1 ±1.88*		58.0 ±1.06*		58.8 ±1.04*	50.2 ±2.16 [#]		51.0 ±1.15 [#]		43.3 ±6.52 [#]	

CTR- control group, SFA- saturated fatty acids, MUFA-monounsaturated fatty acids, PUFA- polyunsaturated fatty acids, PUFA n3- polyunsaturated fatty acids omega 3, PUFA n6- polyunsaturated fatty acids omega 6.).*[#] Different symbols indicate statistical difference significant between phases (Acute and Recovery) in their respective (CTR-CTR, acidic pH-acidic pH, Al-Al). ND- not detected.

Appendix 7. Percentage of fatty acids of *Astyanax bimaculatus* plasma during the acute and recovery phases

Fatty acid (%)	Plasma								
	Acute phase			Recovery phase					
	CTR neutral pH	acidic pH	Aluminum	CTRL neutral pH	acidic pH	Aluminum	CTR neutral pH	acidic pH	Aluminum
14:0	0.25 ±0.02	0.25 ±0.03	0.25 ±0.03	0.45 ±0.11	0.52 ±0.07	0.44 ±0.06			
15:0	0.12 ±0.01	0.13 ±0.01	0.21 ±0.09	0.20 ±0.03	0.18 ±0.02	ND			
16:0	19.5 ±0.52	20.8 ±0.34	20.1 ±0.52	24.9 ±1.80	26.6 ±1.49	26.3 ±0.98			
17:0	0.43 ±0.03	0.39 ±0.04	0.39 ±0.02	ND	0.54 ±0.38	0.47 ±0.23			
18:0	9.78 ±0.34	9.51 ±0.35	9.89 ±0.28	9.66 ±0.43	9.89 ±0.60	9.26 ±0.13			
20:0	0.21 ±0.08	ND	0.18 ±0.02	0.15 ±0.01	0.35 ±0.08	0.16 ±0.04			
21:0	0.14 ±0.01	ND	ND	0.21 ±0.07	0.14 ±0.01	0.15 ±0.01			
22:0	0.19 ±0.05	0.12 ±0.01	0.20 ±0.01	ND	ND	ND			
24:0	0.14 ±0.01	0.13 ±0.01	0.16 ±0.01	0.15 ±0.03	0.11 ±0.01	0.12 ±0.01			
ΣSFA	30.5 ±0.55*	31.2 ±0.55*	31.4 ±0.56*	35.7 ±2.07 [#]	37.9 ±1.67 [#]	36.6 ±0.96 [#]			
16:1	1.62 ±0.10	1.66 ±0.09	1.48 ±0.10	2.17 ±0.20	2.42 ±0.28	2.26 ±0.17			
17:1	0.18 ±0.02	ND	0.17 ±0.02	ND	ND	ND			
18:1n9	28.0 ±0.61	28.5 ±0.85	26.4 ±0.65	26.2 ±1.22	25.8 ±1.11	26.4 ±0.41			
18:1n7	1.91 ±0.03	1.80 ±0.02	1.82 ±0.01	1.82 ±0.05	1.80 ±0.09	1.78 ±0.04			
20:1n9	0.38 ±0.05	0.41 ±0.03	0.51 ±0.01	0.48 ±0.01	1.09 ±0.60	0.48 ±0.03			
24:1	0.36 ±0.03	0.33 ±0.03	0.43 ±0.04	0.52 ±0.15	0.37 ±0.14	0.28 ±0.03			
ΣMUFA	32.4 ±0.71	32.7 ±0.85	30.8 ±0.67	31.2 ±1.16	30.8 ±0.86	31.2 ±0.48			
18:3n3	0.17 ±0.01	0.16 ±0.02	0.26 ±0.02	0.28 ±0.04	0.25 ±0.04	0.25 ±0.03			
20:5n3	1.19 ±0.36	0.63 ±0.08	0.85 ±0.13	1.42 ±0.30	1.90 ±0.95	1.32 ±0.42			
22:4n3	0.72 ±0.31	0.15 ±0.01	0.35 ±0.09	0.49 ±0.15	0.20 ±0.02	0.81 ±0.06			
22:5n3	0.35 ±0.01	0.45 ±0.04	0.42 ±0.03	0.49 ±0.07	0.43 ±0.04	0.47 ±0.07			
22:6n3	9.91 ±0.28	10.6 ±0.17	11.2 ±0.59	8.82 ±0.91	8.34 ±1.01	9.35 ±1.08			
ΣPUFA n3	11.2 ±0.33	11.9 ±0.29	12.9 ±0.64	11.5 ±1.25	10.9 ±1.39	11.5 ±0.64			
18:2n6c	4.97 ±0.28	5.25 ±0.32	6.29 ±0.22	5.60 ±0.17	5.29 ±0.68	5.91 ±0.37			
18:2n6t	0.64 ±0.03	0.13 ±0.01	0.43 ±0.20	0.39 ±0.11	0.16 ±0.02	0.23 ±0.03			
18:3n6	0.37 ±0.08	0.27 ±0.04	0.27 ±0.04	0.45 ±0.15	0.21 ±0.01	0.21 ±0.01			
20:2n6	1.13 ±0.35	0.76 ±0.03	0.94 ±0.05	0.75 ±0.06	0.66 ±0.04	0.71 ±0.07			
20:3n6	2.41 ±0.27	2.79 ±0.25	2.47 ±0.12	2.28 ±0.21	2.06 ±0.20	2.17 ±0.20			
20:4n6	10.4 ±0.25	9.64 ±0.50	9.24 ±0.47	7.78 ±0.64	7.23 ±0.82	7.69 ±0.60			
22:2n6	0.73 ±0.02	0.22 ±0.06	0.26 ±0.09	0.64 ±0.20	1.60 ±0.95	0.64 ±0.04			
22:4n6	2.11 ±0.20	2.08 ±0.13	1.93 ±0.12	1.47 ±0.09	1.26 ±0.21	1.31 ±0.10			
22:5n6	2.66 ±0.17	2.96 ±0.15	3.02 ±0.25	2.01 ±0.23	1.91 ±0.25	2.16 ±0.24			
ΣPUFA n6	25.0 ±0.41	23.9 ±0.74	24.7 ±0.51	21.4 ±1.28	20.1 ±1.37	20.5 ±0.74			
ΣPUFA total	36.9 ±0.63*	35.9 ±0.88*	37.6 ±1.00*	32.9 ±2.50 [#]	31.1 ±2.39 [#]	32.1 ±1.24 [#]			

CTR- control group, SFA- saturated fatty acids, MUFA-monounsaturated fatty acids, PUFA- polyunsaturated fatty acids, PUFA n3- polyunsaturated fatty acids omega 3, PUFA n6- polyunsaturated fatty acids omega 6. *[#] Different symbols indicate statistical difference significant between phases (Acute and Recovery) in their respective (CTR-CTR, acidic pH-acidic pH, Al-Al). ND-Not detected.

Appendix 8. Paper published referring to chapter 3.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 157 (2013) 1–8

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc

Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females

Vanessa A.R.O. Vieira, Tiago G. Correia, Renata G. Moreira*

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 May 2012
Received in revised form 15 August 2012
Accepted 23 August 2012
Available online 29 August 2012

Keywords:
Ecotoxicity
Glycogen
Lipids
Metals
Protein
Reproduction

ABSTRACT

We investigated the effects of acidic pH and acute aluminum (Al) exposure on the metabolic substrates of *Astyanax bimaculatus*, and on the ability of these animals to recover in clean water. After an acclimation period, sexually mature *A. bimaculatus* females were sorted into six glass aquaria with three experimental groups: control in neutral pH (7.0), acidic pH (5.5), and Al (0.5 mg·L⁻¹) in acidic pH (5.5). After a 96 h treatment, 10 animals from each experimental group were sampled and the rest were returned to clean water in neutral pH without Al for a recovery period of 96 h. The acidic pH, either alone or combined with Al, decreased T4 levels, whereas Al exposure increased T3 levels. Recovery of T3 levels occurred after 96 h. Al exposure decreased ovary and plasma proteins, muscle glycogen contents, and hepatic lipids due to lipoperoxidation. In the recovery phase, lipids decreased in most tissues, probably to re-establish ovary protein and hepatic glycogen. *A. bimaculatus* prioritized the use of energetic resources during acclimatization to Al instead of prioritizing reproduction, thereby avoiding the ovulation of impaired eggs.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Of the environmental impacts caused by humans, water pollution is often considered the most harmful (Araujo, 1998). Environmental water pollutants, such as metals, are very harmful to many aquatic organisms. Many studies have been undertaken in attempt to understand the effects of metals on animal physiology (Levesque et al., 2002; Barcarolli and Martinez, 2004; Garg et al., 2009), development (Couture and Pyle, 2012), reproduction (Correia et al., 2010), and behavior (Vieira et al., 2009). Metabolic dysfunctions caused by aquatic pollutants can occur from disruptions at many physiological levels. The storage and/or mobilization of energetic fuels, such as glucose, fatty acids, and amino acids, can be altered by exposure to several metals, including cadmium (Almeida et al., 2001; De Smet and Blust, 2001) and aluminum (Al) (Correia et al., 2010). The specific mechanisms by which these metals alter metabolic substrate metabolism are unclear; however, they may have toxic effects on the number and/or activity of metabolic enzymes (Soengas et al., 1996).

Al is an important metal found in the Earth's crust that is used in multiple anthropogenic activities; however, its precise effects on biological systems are still unclear. The solubility of Al in water depends

on the presence of several compounds (e.g., H⁺ ions) that create multiple chemical forms of Al [Al³⁺, AlOH²⁺, Al(OH)₂⁺], thereby determining Al toxicity. Cations can react with many anions, resulting in numerous Al complexes. When no significant amounts of anions are available, Al forms hydroxides, and the relative stability of these hydroxides depends on pH and anionic concentration (Smith, 1996; Berthon, 2002). Studies on Al toxicity in fish show that Al is solubilized at an acidic pH, and due to the chemical characteristics of this metal, the percentage of inorganic Al, which is the most toxic form to fish, is higher than that of its organic form at an acidic pH (Gensemer and Playle, 1999). Additionally, the acidity itself can have several physiological effects on hematological (Carvalho and Fernandes, 2006; Camargo et al., 2009), metabolic (Miron et al., 2008), and endocrinological (Correia et al., 2010) parameters. When acidic pH and Al both occur in water, the deleterious effects on fish are most pronounced in their gills and result in many physiological alterations (Teien et al., 2006; Camargo et al., 2009).

Effective acclimatization, detoxification, and tolerance mechanisms are critical for the survival of a species in a polluted environment. At some point, however, environmental changes may surpass the mean allostatic capacity of individuals and cause stress, disturbing both their homeostasis (Wendelaar Bonga, 1997; McEwen and Wingfield, 2003) and potential to reproduce (Kime, 1995). Most studies that evaluated the effects of Al on fish physiology restricted subjects to juveniles; therefore, endocrine and metabolic disturbances of Al on reproduction are poorly understood (Vuorinen and Vuorinen, 1991; Hwang et al., 2000; Vuorinen et al., 2003; Correia et al., 2010). Exposure of reproductively active animals to Al can cause physiological damage to parental

* Corresponding author at: Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, Rua do Matão, trav. 14, no. 321, Cidade Universitária, 05508-090 São Paulo, Brazil. Tel./fax: +55 11 30917531.

E-mail address: renatagm@ib.usp.br (R.G. Moreira).

(Correia et al., 2010) and offspring fish, depending on the period of exposure and the recovery capacity of the animals (Garg et al., 2009).

Considering the effects of Al on fish physiology, and the effects of pH on Al speciation, this study was designed to evaluate (1) the effects of acute exposure to Al in acidic pH and to acidic pH alone on the major energetic substrates in *Astyanax bimaculatus* females at their vitellogenic stage of reproduction; and (2) the ability of these animals to recover to baseline conditions after a recovery period of 96 h in clean water.

2. Materials and methods

2.1. Water chemistry

The water used was filtered through two cellulose filters (IMPAC® – CEP 10, São Paulo, SP, Brazil and Acqualimp® FICZ – 10, Valinhos, SP, Brazil) that contained an activated charcoal filter (5 µm) to remove solid particles and to reduce both organic matter and any possible chemical contaminants. The physical and chemical parameters of the initial water were subsequently evaluated and described. The experimental media were continuously aerated, and water temperature (maintained at approximately 25 °C with a heater) and dissolved oxygen (maintained at approximately 7 mg·L⁻¹ with aerators) were monitored daily with an oximeter (model 55; YSI, Yellow Springs, OH, USA), which measures both oxygen and water temperature. Al concentration was monitored before and after water renewal (Table 1) with an atomic absorption spectrophotometer (GBC, AAS 932 Avanta-Plus, IL, USA).

2.2. Experimental procedures

A. bimaculatus vitellogenic females were donated by the Hydrobiology and Aquaculture Unit of the Energetic Company of São Paulo State (CESP; Paraíba City, São Paulo, Brazil). *A. bimaculatus* has a wide distribution in South America (Pavanelli and Caramaschi, 1997), including southeastern Brazil, where Al accumulation is common in soil and consequently in river water (CETESB, 2009). *A. bimaculatus* is an important component of the ichthyofauna and is present in many basins of southeastern regions of Brazil (Pavanelli and Caramaschi, 1997).

The animals (n=60), weighing 49.3±4.56 g and measuring 14.0±0.31 cm, were distributed into six 140-L, 40×50×70-cm glass tanks (126 L of water; 10 fish·tank⁻¹; fish density=3.9 g·L⁻¹) and maintained for an acclimation period of 15 days under controlled conditions with a 12:12-h photoperiod, partial (80%) and daily renewal of water, and daily commercial feed.

The nominal concentration of Al was 0.5 mg Al·L⁻¹, an average of the concentrations found along the Paraíba do Sul River Basin (i.e., the region of origin of the animals), which is above 0.1 mg Al·L⁻¹, the maximum allowed by Brazilian regulations (CONAMA, 2005). Additionally, similar concentration was found by Pantaleao S. de et al. (2006), who studied *A. bimaculatus* in the Japarutuba River (northeast of Brazil). The Al solution was obtained using aluminum sulfate [Al₂(SO₄)₃; Merck, Darmstadt, Germany] from a stock solution prepared with Milli-Q water that was acidified to pH 2.5 with 65% HNO₃ (Suprapur; Merck).

Table 1
Physical and chemical parameters of water controlled during the acute test (N=18).

Parameters	CTR neutral pH	Acidic pH	Al in acidic pH
pH	7.1±0.03	5.5±0.07	5.3±0.04
Dissolved oxygen (mg·L ⁻¹)	7.1±0.17	7.1±0.18	7.1±0.16
Temperature (°C)	25.1±0.33	24.5±0.21	24.6±0.16
Total aluminum (mg·L ⁻¹)	n.d.	n.d.	0.6±0.02
Dissolved aluminum (mg·L ⁻¹)	n.d.	n.d.	0.4±0.06

Values of pH, dissolved oxygen, temperature and aluminum are expressed as mean ± SEM. n.d. – not detected; CTR – control group.

The fish were sorted into six tanks: control in neutral pH (two tanks), acidic pH (two tanks), and Al + acidic pH (two tanks). Toxicity tests were conducted for 96 h to characterize the effects of this metal in the short term (acute) using animals fasted for 24 h. After 96 h of exposure, five animals from each tank were retained in the tanks, and the water was replaced with clean water (the same physico-chemical parameters in all tanks, pH 7.0), for an additional duration of 96 h, to verify the ability of the fish to recover in the absence of the pollutant (i.e., the recovery group). During the recovery period, the animals were given food in order to provide the ideal conditions needed for a possible recovery. The remaining five fish from each tank (10 females per group) were sampled at the end of the 96 h experimental period (i.e., the recovery test). The tests were semi-static with partial renewal of water every 24 h, and the parameters were adjusted (with either HCl or NaOH; Synth, Brazil) to pH 5.5 for the acidic pH and Al in acidic pH groups and to pH 7.0 for the neutral pH control group (Table 1).

2.3. Biological sample analyses

After the exposure period during the toxicity test, the fish were transferred to smaller containers and cryoanesthetized. Blood was collected by puncture of caudal vasculature with heparinized syringes (Liquemine – Roche®). Blood was centrifuged for 5 min at 655 ×g to separate plasma, which was then divided into aliquots and stored at –80 °C until use. The fish were killed by decapitation following animal care protocols approved by the Biosciences Institute (University of São Paulo) Ethics Committee (protocol 101/2009). Samples of liver, white muscle, and ovaries were collected and frozen at –80 °C. The gonads were macroscopically evaluated (size, color, and maturation stage) and in addition to liver, weighed on an analytical balance to calculate the gonadosomatic index (GSI) and the hepatosomatic index (HSI). These indices express the percentage of gonads and liver in relation to the animal's body. GSI is an effective indicator of the functional state of the ovaries. A thin slice of the ovaries was fixed in Bouin's solution and analyzed by routine histological techniques to confirm its maturation stage.

2.4. Tissue water content

The tissue water content was analyzed to determine if the alterations in the metabolic substrates were due to changes in water content because substrate data are expressed by wet weight.

The analysis of water content (%) was performed by weighing approximately 10 mg of each tissue and placing it in an oven (60 °C) for approximately 24 h until it reached a constant mass. The tissue fragments were removed from the oven and cooled in a desiccator until reaching room temperature, at which time the final weights were determined. The difference between the initial and the final weights was expressed as a percentage of water content in each tissue (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.5. Energetic substrates

Following extraction of the total protein from the tissues with perchloric acid and solubilization of the protein with KOH according to the method of Milligan and Girard (1993), the protein content of tissues (white muscle, ovaries and liver) and plasma was determined by the colorimetric method of Lowry et al. (1951). The protein concentration was calculated using a standard curve of bovine serum albumin (Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO, USA) measured at 660 nm and expressed in mg·g⁻¹ in tissues and mg·mL⁻¹ in plasma.

Total lipids of the white muscle, ovaries and liver were extracted with a mixture of chloroform, methanol, and water (2:1:0.5) according to methods of Folch et al. (1957) as adjusted by Parrish (1999) for aquatic organisms. Total lipid content in tissue and plasma

was quantified by the enzyme-colorimetric method described by Frings et al. (1972) using cod liver oil (Sigma Diagnostics INS) to create a standard curve measured at 540 nm and expressed in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ in tissues and $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ in plasma.

For glycogen analysis, frozen samples of the white muscle and liver were transferred to assay tubes that contained 1 mL of 6 N KOH, extracted according to Bidinotto et al. (1997) and quantified according to Dubois et al.'s (1956) hydrolytic method using D-glucose (Sigma Diagnostics INS) as a standard curve at 480 nm and expressed in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

2.6. T3 and T4 plasma hormones

Plasma levels of triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) were quantified with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA; Intercheck, VA, USA). Absorbance measurements were obtained using a microplate reader (Molecular Devices, CA, USA), at 450 nm, and expressed in $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (T4) and $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (T3).

2.7. Hepatic lipoperoxidation

The determination of hepatic lipoperoxidation was performed by the Ferrous Oxidation in Xylenol orange (FOX) method, which was modified according to Hermes-Lima et al. (1995). The liver samples were homogenized with methanol and centrifuged at $1.000 \times g$ for 5 min, and following reagents were added to the supernatant: 1 mM FeSO_4 , 0.25 M H_2SO_4 , 1 mM xylenol orange, and MilliQ water to a total volume of 0.9 mL. The samples were incubated for 1 h at room temperature, and their absorbance was measured in a spectrophotometer at 580 nm. Next, cumene hydroperoxide (5×10^{-3} mM) was added, and the absorbances of the samples were measured again at 580 nm. The oxidation of ferrous ion, in the presence of xylenol orange, determined the hydroperoxidation of lipids. The results were expressed in CHP equivalents as $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ wet mass.

2.8. Statistical analysis

Data were expressed as means $\pm$ standard errors of the mean (SEMs). Mean values were compared among treatments (control, acidic pH and Al in acidic pH), using either a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for parametric data or a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test for non-parametric data. Exposure periods (acute and their respective recovery group) were compared with either a *t*-test for parametric data or a Mann-Whitney rank test for non-parametric data. For all analyses, differences were significant when $P < 0.05$. These analyses were performed using the statistical software, BioStat for Windows v2009 (AnalystSoft Inc.).

3. Results

3.1. Water chemistry

The water's physical and chemical parameters (temperature, pH and dissolved oxygen) were monitored, and if necessary, adjusted to maintain the expected values (Table 1). Concentrations of nitrogenous compounds (NH_3 and NO_2) showed no significant differences (<0.015 ppm) that could interfere with the results. The total and dissolved Al concentrations were maintained within the expected range (Table 1). Major physical and chemical parameters were evaluated: $\text{Ca}^{2+} = 8.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Fe} = 0.09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{SO}_4 = 12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{PO}_4 = 0.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, total nitrogenous compounds = $0.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, alkalinity = $15 \text{ mg} \text{ CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, organic matter = 19%, chloride = $4.90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, electrical conductivity (at 25°C) = $65.50 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, organic carbon = $1.3 \text{ mg} \text{ C} \cdot \text{L}^{-1}$, inorganic carbon = $1.2 \text{ mg} \text{ C} \cdot \text{L}^{-1}$, total hardness = $26 \text{ mg} \text{ CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, and turbidity = 1 NTU. All parameters were suitable and allowed a 100% survival rate during the experiment.

3.2. Female maturation stages, GSI and HSI

Macroscopically, the ovaries occupied approximately two-thirds of the coelomic cavity. The ovaries were greenish, slightly vascularized, and full of vitellogenic oocytes. In the histological analyses, vitellogenic oocytes, full of yolk granules and with developed follicular layers, were predominant in the ovaries, whereas perinucleolar oocytes were less common (Fig. 1), thereby confirming that females were in the mature stage of the reproductive cycle. GSI varied from 14.0% to 18.7%, and HSI varied from 0.64% to 1.02%, with no statistical differences among the experimental groups for either index (Fig. 2).

3.3. Tissue water content

Because substrate data are expressed in wet weight, the tissue water content was analyzed to determine if alterations in metabolic substrates were due to changes in water content. In animals maintained in neutral pH, the values were: $82.3 \pm 2.00\%$ for liver, $59.1 \pm 1.65\%$ for ovaries, and $76.2 \pm 1.14\%$ for muscle during the acute test, and $80.9 \pm 2.59\%$ for liver, $58.9 \pm 1.51\%$ for ovaries, and $78.3 \pm 0.59\%$ for muscle during the recovery test. In the animals exposed to acidic pH, the values were: $80.3 \pm 2.20\%$ for liver, $57.2 \pm 0.86\%$ for ovaries, and $75.2 \pm 1.96\%$ for muscle during the acute test, and $80.1 \pm 2.21\%$ for liver, $57.2 \pm 0.21\%$ for ovaries, and $78.2 \pm 0.49\%$ for muscle during the recovery test. In the animals exposed to Al, the water content values were: $83.8 \pm 2.49\%$ for liver, $62.0 \pm 1.37\%$ for ovaries, and $77.9 \pm 1.33\%$ for liver during the acute test, and $82.9 \pm 2.68\%$ for liver, $61.1 \pm 1.93\%$ for ovaries, and $77.3 \pm 2.94\%$ for

Fig. 1. Histological sections of *Astyanax bimaculatus* ovaries from the acute treatment (96 h) to confirm maturation stage. A) Many vitellogenic oocytes (Ovs) and only a few perinucleolar oocytes (Ops) (bar: 400 μm). B) Vitellogenic oocytes (Ovs), with yolk granules and oocytes in the perinucleolar phase (Op) (bar: 75 μm).

4

V.A.R.O. Vieira et al. / Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 157 (2013) 1–8

Fig. 2. Gonadosomatic (A) and hepatosomatic (B) indices (%) in mature female *Astyanax bimaculatus*, during the acute AI test (96 h) and the recovery phase (96 h). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group.

muscle during the recovery test. No differences in water content were found during the acute experiment or after the recovery period.

3.4. Energetic substrates

We analyzed the metabolic substrate data by comparing the results of tissue and plasma contents among the different treatments. Acidic pH did not alter lipid mobilization. AI exposure, however, decreased hepatic lipid content compared to that in the control and acidic pH groups, whereas no alterations were found in other tissues or plasma (Fig. 3). After the recovery period, lipid content decreased in all tissues with all treatments.

Exposure to acidic pH did not alter protein content in either tissue or plasma. Conversely, AI exposure decreased protein content in the

ovaries and plasma compared to exposure to the neutral pH CTR and acidic pH. After the recovery phase, protein content decreased in plasma and liver of both the control and acidic pH groups, but increased in the ovaries above the levels of the control groups. Although the experimental conditions did not change protein content in liver and muscle, exposure to clean water decreased hepatic protein in females from all groups and decreased muscle protein in animals exposed to AI (Fig. 4).

Exposure to acidic pH did not lead to altered hepatic and muscular glycogen, but exposure to AI resulted in decreased muscular glycogen compared to levels in animals maintained in neutral pH. Following the recovery period, glycogen content continued to decrease in the white muscle of all groups, whereas glycogen content in the liver increased in animals previously exposed to AI (Fig. 5).

Fig. 3. Total lipid concentration in liver (A), ovaries (B), muscle (C) and plasma (D), in mature female *Astyanax bimaculatus* during the acute AI test (96 h) and the recovery phase (96 h). The values are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group. ^{a,b}Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among acute treatments (CTR with neutral pH, acidic pH and AI in acidic pH). * Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

Fig. 4. Total protein concentration in the liver (A), ovaries (B), muscle (C) and plasma (D), in mature female *Astyanax bimaculatus* during the acute Al test (96 h) and the recovery phase (96 h). The values are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments (CTR with neutral pH, acidic pH and Al in acidic pH) in acute (ab) and recovery phases (a' and b'). *Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

3.5. Thyroid hormones

Al promoted an increase in the concentrations of T3 plasma levels during the acute period, and after the recovery period, the values returned to levels measured in control animals. In contrast, T4 plasma levels decreased in animals exposed to acidic pH alone or in combination with Al compared to levels in the neutral pH group and were maintained during the recovery period (Fig. 6).

3.6. Lipoperoxidation in the liver

Peroxidation of the hepatic phospholipids increased in animals upon exposure to Al during the acute test. After the recovery phase,

the hepatic lipoperoxidation index returned to the level found in animals from the control groups (Fig. 7).

4. Discussion

The influences of acidic pH and Al on metabolic substrates were analyzed in an acute experiment on tropical *A. bimaculatus* vitellogenic female fish. The ability of *A. bimaculatus* females to recover from acidic pH and Al exposure was also evaluated. In general, we found that 96 h of exposure to Al in acidic pH was enough to alter protein metabolism, increase hepatic lipid peroxidation, and change both carbohydrate mobilization patterns and thyroid hormone levels. Some alterations could be

Fig. 5. Glycogen concentration in the liver (A) and muscle (B) of mature female *Astyanax bimaculatus* during the acute Al test (96 h) and the recovery phase (96 h). The values are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group. *Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among acute treatments (CTR with neutral pH, acidic pH and Al in acidic pH). *Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

6

V.A.R.O. Vieira et al. / Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 157 (2013) 1–8

Fig. 6. Plasma triiodothyronine (T3) (A) and thyroxine (T4) (B) concentrations in mature female *Astyanax bimaculatus* during the acute Al test (96 h) and the recovery phase (96 h). The values are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group. ^{a,b}Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among acute treatments (CTR neutral pH, acidic pH and Al in acidic pH). *Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

re-established after 96 h of maintenance in clean water, but others remained unchanged.

Some studies have shown that the effects of metals on the metabolism of an organism depend on several factors, including species type, exposure time and the presence of other substances that may interact with the compound and thereby change its mode of action in the body (Aragão and Araújo, 2006). Garg et al. (2009) observed different responses in metabolic substrates following exposure to cadmium, zinc, and arsenic. The data from this study showed reduced levels of carbohydrates and lipids in the gill muscle and lipids of three different fish species (*Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, and *Catla catla*). Results of previous studies are not similar to those for *A. bimaculatus*, demonstrating that organisms respond in different ways depending on the type of pollutant, including metals. Applying this scenario to the natural environment, physiological fish responses may change even more as a result of an infinite range of variables in rivers (Mozetto and Zagatto, 2006).

Water pH is one of the main factors that influence the toxicity of substances present in water, including metals (Aragão and Araújo, 2006). Many studies have reported that acidic pH alone results in deleterious effects on many fish populations (Exley et al., 1991). Effects of acidic pH include high oxygen consumption and ionic regulatory dysfunctions, as well as endocrine and metabolic alterations (Tam et al., 1987). Each animal has a range of tolerance to pH variation: pH 5.5 is

Fig. 7. Lipid peroxidation in the liver of mature female *Astyanax bimaculatus*, during the acute Al test (96 h) and the recovery phase (96 h). The values are expressed as mean $\pm$ SEM. CTR, control group. ^{a,b}Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among acute treatments (CTR neutral pH, acidic pH and Al in acidic pH). *Bars with symbols indicate significant differences between the acute and the recovery phases ($P < 0.05$).

not lethal to *A. bimaculatus*, as this species tolerates pH variations from 5.5 to 7.5 (Planquette et al., 1996). This fact, together with the results obtained in this study, shows that most of the effects observed are likely due to Al exposure. Acidic pH, however, decreased T4 levels in *A. bimaculatus*, corroborating with the studies above, which show that acidic pH can, in some cases, promote physiological alterations.

Toxicity tests performed in tropical fish in the presence of Al and acidic pH conditions showed that Al causes disturbances in hematological (Barcarolli and Martinez, 2004), endocrinological (Correia et al., 2010), ionoregulatory (Camargo et al., 2009) and hepatic metabolic parameters (Levesque et al., 2002). Altered functions in hepatic metabolism were also found in this study, in which a decrease in hepatic lipids observed after exposure to Al could be due to excessive lipid peroxidation from damage to cell membranes and/or an enhanced activity of triacylglycerol lipase, the enzyme that hydrolyses triglyceride reserves (Levesque et al., 2002). The first option is more suitable considering that the lipids of this study were not mobilized to other tissues (at least not the ones analyzed) or to the plasma. Our data also showed that Al promoted lipid peroxidation in the liver.

Liver is the main organ involved in metabolic processes during intoxication, and also the target organ for vitellogenin synthesis. Therefore, the effect of Al on this organ can negatively impact vitellogenesis and embryo endogenous feeding (Wahli et al., 1981). In *Oreochromis niloticus*, acute Al exposure also causes a decrease in hepatic lipids of vitellogenic females; however, this substrate is mobilized to the ovaries (Correia et al., 2010). Conversely, Al does not produce the same effects in *A. bimaculatus* females, emphasizing the ability of Al to promote lipid peroxidation in the liver (Norris et al., 2000) and not just an intense lipid mobilization to the vitellogenic oocytes, as proposed by Correia et al. (2010). Species studied by these authors (e.g., *O. niloticus*), however, have asynchronous oocyte development with multiple spawning in 1 year and have less dependence on environmental conditions (Correia et al., 2010) than *A. bimaculatus*. This species can also have multiple spawnings, but spawning is restricted to a single period of the year, November to February (Agostinho et al., 1984), which can interfere with the metabolic strategy adopted by females facing adverse environmental conditions.

Mobilization of energy sources is an adaptive strategy adopted by fish to avoid oxidative stress (Wendelaar Bonga, 1997). Some hormones, such as cortisol (Mommensen et al., 1999) and thyroid hormones (Oommen and Matty, 1997), directly influence the regulation of metabolic processes. In *A. bimaculatus*, plasma T3 levels increase in vitellogenic females exposed to Al, confirming that T3 influences catabolism (Oommen and Matty, 1997), which is more evident in adverse environmental situations. Exposure to Al also increases T3 levels in

brown trout (Waring et al., 1996; Waring and Brown, 1997) but does not change thyroid hormone levels in rainbow trout (Brown et al., 1990a), suggesting the responses are species-specific (Waring and Brown, 1997).

In contrast, acidic pH, either alone or in combination with Al, decreased plasma T4 levels, indicating that our experimental conditions altered the T4/T3 ratio and suggesting changes in the activity of deiodinase enzymes (Orihuela, 2011). Acidic pH also alters thyroid hormones levels in Atlantic salmon, *Salmo salar* (Brown et al., 1990b), rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Brown et al., 1984, 1986, 1990a), and brown trout, *Salmo trutta* (Edwards et al., 1987; Brown et al., 1989), but with no pattern of responses. This, again, provides evidence that thyroid hormones are sensitive to ambient acidity (Peter and Rejitha, 2011), but the responses (even to Al) appear to be species-specific (Waring and Brown, 1997).

A disturbed environment without food can lead to the recruitment of non-carbohydrate sources, such as protein, for glucose production (Wendelaar Bonga, 1997). In vitellogenic *A. bimaculatus* females, the ovaries were considered to be important protein depots, with protein content that exceeded even that of the muscle and liver. Changes in gonadal protein content during acute Al exposure may indicate a mobilization of this source to meet the required energy demand. Therefore, the results of this study suggest that in the face of Al intoxication, parts of proteins could be used for a reactive rheostatic response (Mrosovsky, 1990). During the recovery period, however, our values increased again, indicating that the exposure period in clean water (96 h) was sufficient for the animals to recover this important nutritional source for vitellogenesis and to replenish the oocyte growth process (Lubzens et al., 2010). At the same time, parallel analyses with the same females caused an increase in estradiol (Correia, 2012), the main steroid that modulates vitellogenesis through the synthesis of vitellogenin (Lubzens et al., 2010). The cost of reproduction is strongly influenced by the reproductive strategy of each species. In this study, Al exposure influenced synchronous group spawning in females during vitellogenesis, changing the mobilization pattern of substrates during a stage prior to final maturation.

Al is an endocrine disruptor because it causes alterations in progesterone production in *O. niloticus* (Correia et al., 2010). The impact on the endocrine system can affect an animal's metabolism because a decrease in hepatic lipids can impair the biosynthesis of steroid hormones. Additionally, a reduction in protein in the vitellogenic ovaries will ultimately produce eggs deficient in protein. In *A. bimaculatus*, however, the adverse condition does not seem to accelerate spawning, as is suggested for *O. niloticus* (Correia et al., 2010). *A. bimaculatus* likely prioritizes physiological adjustments when exposed to Al, and following the recovery period, females resume vitellogenesis, as supported by an increase in the protein content of ovaries.

We conducted metabolic analyses during the recovery period to evaluate whether 96 h in clean water is a sufficient time period for animals to recuperate the losses caused by exposure to Al and/or acidic pH. In many situations, however, some patterns of substrate content were observed, even in the control group, as decreased hepatic lipids, hepatic proteins, and muscle glycogen, together with increased ovary protein. These results were common for most groups, independent of treatment, suggesting that the extension of 96 h in the tanks and/or the food supply was the determinants for the metabolic profiles, rather than for the treatment.

A. bimaculatus prioritized the maintenance of glycogen levels in the liver during the recovery period, and these stocks were maintained with energy contribution from muscle glycogen, proteins and lipids. According to Bhattacharya (1998), the depletion of glycogen stocks may be an initial sign for regulation of intermediary metabolism, resulting in hepatocyte protection from xenobiotics. Additionally, according to Christiansen and Klungsoyer (1987), liver glycogen is considered the emergency energy supply, particularly in critical situations, while muscle glycogen is responsible for supplying

energy during periods of exhaustion, hunting, and/or escape. Al causes respiratory disturbances (Poléo et al., 1997; Camargo et al., 2009) that result in hypoxia, and the most appropriate way to obtain glucose in this case is through glycolysis in the muscle and liver. Furthermore, glucose can be used as a substrate for the synthesis of nucleic acids, while some studies show that Al is genotoxic (Galindo et al., 2010). Together, these data suggest that glycogen is an important energetic substrate used by animals in Al intoxication. Other metals such as nickel, cadmium, zinc, and copper act directly on carbohydrate metabolism by influencing mobilization and utilization of energy sources under stressful conditions (Levesque et al., 2002). Because *A. bimaculatus* displayed small deposition of this substrate in the muscle and liver, ovary protein was also used as a significant energy substrate during exposure to metal stress.

During the recovery period, even for the control groups, some alterations indicated that vitellogenic females were stressed by the toxicity tests. Animal responses to environmental changes, such as social disturbance and alteration in water quality, include adjustments that alter the "set point" of some physiological conditions (i.e., allostasis, which is the ability to achieve stability through changes; McEwen and Wingfield, 2003). This means that the "set point" of biological processes that are essential for life can change due to stress. Schreck (2000) noted that allostasis is very important in fish physiology. Indeed, this was clearly observed in our results, in which *A. bimaculatus* females were sensitive to changes in management. During the recovery period, the effect of the metal is likely not isolated but part of a set of stressor factors (i.e., the containment and maintenance location in the toxicity tests during the acute experiment).

Under constant stress, physiological responses can be intense, with energetic demand to establish homeostasis that re-allocates energy to growth and reproductive activities (Wendelaar-Bonga, 1997), all depending on the spawning strategy of the considered species. Jalabert (2008) reported that fish in the reproductive stage, mainly during maturation and spawning periods, are very vulnerable to stressors due to reallocation of energy resources associated with stress responses. In this study, animals prioritized the mobilization of energy substrates in order to acclimatize to the unfavorable environment. This negatively impacted reproduction and spawning, corroborating the findings of Vuorinen and Vuorinen (1991), who showed that *Coregonus wartmanni* females, when exposed to Al in acidic pH, are less likely to spawn. Their response involved a decrease in the number of oocytes and the amount of yolk they carried, all due to reallocation in energy resources.

In conclusion, we observed that 96 h of exposure to Al in an acidic pH environment is sufficient to alter the thyroid hormone levels and the pattern of deposition and mobilization of energetic substrates, mainly in ovary proteins, hepatic lipids and muscle glycogen. Maintenance of animals for 96 h in clean water was not enough for recovery of most parameters, except for a partial re-establishment of ovary proteins. Mature *A. bimaculatus* females, even when exposed to a metal that acts as an endocrine disruptor, appear to prioritize the acclimatization process before proceeding with the perpetuation of their species, thus avoiding the release of metabolically impaired eggs.

Acknowledgments

The authors would like to thank CESP (Companhia Energética de São Paulo) for providing the animals and FAPESP (2008/57687-0) for financial support.

References

- Agostinho, C.A., Molinari, S.L., Agostinho, A.A., Verani, J.R., 1984. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L.) (Osteichthyes-Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. Rev. Bras. Biol. 44 (1), 31–36.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal Pai Silva, M., Alves Júnior, R., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Environ. Pollut. 114, 169–175.

- Aragão, M.A., Araújo, P.A., 2006. Métodos de ensaio de Toxicidade de Organismos Aquáticos. In: Zagatto, A.P., Bertolotti, E. (Eds.), *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. Rima, São Carlos, pp. 117–147.
- Araújo, F.G., 1998. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o Rio Paraíba do Sul. *Rev. Bras. Biol.* 58, 547–558.
- Barcarolli, I.F., Martinez, C.B.R., 2004. Effects of aluminum in acid water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 639–646.
- Berthon, G., 2002. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coord. Chem. Rev.* 228, 319–341.
- Bhattacharya, S., 1998. Mechanisms of signal transduction in the stress response of hepatocytes. *Int. Rev. Cytol.* 184, 109–156.
- Bidinotto, P.M., Moraes, G., Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bol. Tec. CEPTA* 10, 53–60.
- Brown, S.B., Eales, J.G., Evans, R.E., Hara, T.J., 1984. Interrenal, thyroidal, and carbohydrate responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental acidification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 36–45.
- Brown, S.B., Evans, R.E., Hara, T.J., 1986. Interrenal, thyroidal, carbohydrate, and electrolyte responses in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during recovery from the effects of acidification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 714–718.
- Brown, J.A., Edwards, D., Whitehead, C., 1989. Cortisol and thyroid hormone responses to acid stress in the brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.* 35, 73–84.
- Brown, S.B., MacLachly, D.L., Hara, T.J., Eales, J.G., 1990a. Effects of low ambient pH and aluminum on plasma kinetics of cortisol, T3, and T4 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Zool.* 68, 1537–1543.
- Brown, S.B., Evans, R.E., Majewski, H.S., Sangalang, G.B., Klavervkamp, J.F., 1990b. Response of plasma electrolytes, thyroid hormones, and gill histology in Atlantic salmon (*Salmo salar*) to acid and limed river waters. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2431–2440.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40–46.
- Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2006. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture* 251, 109–117.
- CETESB, 2009. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. Available at: <http://www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes.asp> [02/02/2011].
- Christiansen, D.C., Klungsoyer, L., 1987. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* B 88, 701–711.
- CONAMA, 2005. Available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> [02/08/2012].
- Correia, T.G., 2012. Evidências de desregulação endócrina causada pela exposição aquática ao Alumínio e ao Manganês em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758). PhD. thesis in Physiology, Bioscience Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Correia, T.G., Narcizo, A.M., Moreira, R.G., 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* C 151, 461–466.
- Couture, P., Pyle, G., 2012. Field studies on metal accumulation and effects in fish. *Fish Physiol.* 31A, 417–473.
- De Smet, H., Blust, R., 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 255–262.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and substances relates. *Anal. Chem.* 28, 350–358.
- Edwards, D., Brown, J.A., Whitehead, C., 1987. Endocrine and other physiological indicators of acid stress in the brown trout (*Salmo trutta*). *Ann. Soc. R. Zool. Belg.* 117 (Suppl. 1), 331–342.
- Exley, C., Chappell, C., Birchall, J.D., 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *J. Theor. Biol.* 151, 417–428.
- Folch, J., Less, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–503.
- Frings, C.S., Fendly, T., Dunn, R.T., Quenn, C.A., 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanillin reaction. *Clin. Chem.* 18, 673–674.
- Galindo, B.A., Troilo, G., Cólus, I.M.S., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2010. Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Water Air Soil Pollut.* 212, 419–428.
- Garg, S., Gupta, R.K., Jain, K.L., 2009. Sublethal effects of heavy metals on biochemical composition and their recovery in Indian major carps. *J. Hazard. Mater.* 163, 1369–1384.
- Geneser, R.W., Playle, R.C., 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 29, 315–450.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 271–280.
- Hwang, U.G., Kagawa, N., Mugyia, Y., 2000. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 69–76.
- Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, third ed. IMESP, São Paulo.
- Jalabert, B., 2008. An overview of 30 years of international research in some selected fields of the reproductive physiology of fish. *Cybiun* 32, 7–13.
- Kime, D.E., 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 5, 52–96.
- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquat. Toxicol.* 60, 257–267.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J., 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367–389.
- McEwen, B.S., Wingfield, J.C., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43, 2–15.
- Milligan, C.L., Girard, S.S., 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 180, 175–193.
- Miron, D.S., Moraes, B., Becker, A.G., Crestani, M., Spanello, R., Loro, V.L., Baldisserotto, B., 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture* 277 (3–4), 192–196.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268.
- Mozetto, A.A., Zagatto, P.A., 2006. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: Zagatto, A.P., Bertolotti, E. (Eds.), *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. Rima, São Carlos, pp. 16–38.
- Mrosovsky, N., 1990. Rheostasis: the Physiology of Change. Oxford University Press, New York.
- Norris, D.O., Camp, M.C., Maldonado, A.C., Woodling, J.D., 2000. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. *Comp. Biochem. Physiol.* C 127, 121–128.
- Oommen, O.V., Matty, A.J., 1997. Metabolism in poikilotherms: regulation by thyroid hormones. In: Maitra, S.K. (Ed.), *Frontiers in Environmental and Metabolic Endocrinology*. The University of Burdwan, India, pp. 1–11.
- Orihuela, D., 2011. Aluminium effects on thyroid gland function: iodide uptake, hormone biosynthesis and secretion. *J. Inorg. Biochem.* 105, 1464–1468.
- Pantaleao S. de, M., Alcantara, A.V., Alves J. do, P., Spano, M.A., 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japarutaba River in Brazil. *Environ. Mol. Mutagen.* 47 (3), 219–224.
- Parrish, C.C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer, Verlag, pp. 4–20.
- Pavanelli, C.S., Caramaschi, E.P., 1997. Composition of the ichthyofauna of two small tributaries of the Paraná river, Porto Roci, Paraná State, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 8 (1), 23–31.
- Peter, M.C.S., Rejitha, V., 2011. Interactive effects of ambient acidity and salinity on thyroid function during acidic and post-acidic acclimation of air-breathing fish (*Anabas testudineus* Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 175–183.
- Planquette, P., Keith, P., Le Bail, P.Y., 1996. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 1). Collection du Patrimoine Naturel, vol. 22. IEG-Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, INRA, CSP, Min. Env. Paris, 429 pp.
- Póleo, A.B.S., Ostbye, K., Oxnevad, S.A., Andersen, R.A., Heibo, E., Vøllestad, L.A., 1997. Toxicity of acid aluminium – rich water to seven freshwater fish species. A comparative laboratory study. *Environ. Pollut.* 96, 129–139.
- Schreck, C.B., 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: Moberg, G.P., Manch, J.A. (Eds.), *The Biology of Animal Stress*. CAB International, Wallingford, pp. 147–158.
- Smith, R.W., 1996. Kinetic aspects of aqueous aluminum chemistry: environmental implications. *Coord. Chem. Rev.* 149, 81–93.
- Soengas, J.L., Agra-Lago, M.J., Carballo, B., Andrés, M.D., Vieira, J.A.R., 1996. Effect of an acute exposure to sublethal concentrations of cadmium on liver carbohydrate metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 625–631.
- Tam, W.H., Birkett, L., Makaran, R., Payson, P., Whitney, D.K., Yu, C.K.C., 1987. Modification of carbohydrate metabolism and liver vitellogenin function in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by exposure to low pH. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 630–635.
- Teien, H.C., Kroglund, F., Salbu, B., Rosseland, B.O., 2006. Gill reactivity of aluminium species following liming. *Sci. Total. Environ.* 358, 206–220.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behavior. *Chemosphere* 76, 1416–1427.
- Vuorinen, P.J., Vuorinen, M., 1991. Effects of long term prewarming acid/aluminum exposure on whitefish (*Coregonus wartmanni*) reproduction and blood and plasma parameters. *Finn. Fish. Res.* 12, 125–133.
- Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Peuranen, S., Tigerstedt, C., 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus abula* L.) in long-term exposure to acidity and aluminum. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 255–276.
- Wahl, H., Dawid, I.B., Ryffel, G.U., Weber, T., 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science* 212, 298–304.
- Waring, C.P., Brown, J.A., 1997. Plasma and tissue thyroxine and triiodothyronine contents in sublethally stressed, aluminum-exposed brown trout (*Salmo trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 120–126.
- Waring, C.P., Brown, J.A., Collins, J.E., Prunet, P., 1996. Plasma prolactin, cortisol, and thyroid responses of the brown trout, *Salmo trutta*, exposed to lethal and sublethal aluminium in acidic soft waters. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 377–385.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.

Capítulo 4

*Efeitos do Manganês, e em associação com o
Alumínio, nos substratos energéticos de fêmeas
vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus**

(Teleostei: Characidae)

Resumo

Alguns estudos indicam que a biodisponibilidade do Manganês (Mn) e sua toxicidade em peixes de água doce aumentam em pH ácido. No entanto a presença de íons H^+ pode solubilizar outros compostos presentes no ambiente, dentre eles, outros metais tais como o Alumínio (Al). Muitos compostos em associação com outros podem sofrer efeitos de interações que acentuem ou inibem os efeitos causados por eles. O presente estudo investigou os efeitos agudos do Mn isoladamente e em associação com o Al, em pH ácido, nos principais substratos energéticos de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* e a habilidade de recuperação dos animais quando colocados em água limpa. Os resultados obtidos aqui demonstram a toxicidade do Mn principalmente no metabolismo protéico devido a diminuição da concentração de proteínas totais em todos os tecidos, seja no período de exposição agudo ou de recuperação, não havendo a recuperação deste substrato no fígado e no ovário. Apesar de não haver alterações na concentração de lipídios totais, este metal promove lipoperoxidação nos fosfolipídios das membranas do fígado e, em associação com Al, parece interferir na dinâmica de ácidos graxos polinsaturados das membranas dos ovários. O Mn, isoladamente ou em associação com o Al, mostrou-se tóxico para esta espécie, por atuar no metabolismo protéico dos ovários e fígado e, juntamente com outros dados, sugere-se que este metal pode ser considerado um desregulador do processo reprodutivo podendo retardar o processo de desova pela deficiência nutricional que seria transferida para a prole. No entanto, este metal pareceu atuar como antagonista dos efeitos do Al em outros parâmetros.

1. Introdução

O ambiente aquático é constantemente ameaçado por atividades humanas, requerendo estudos ambientais que demonstrem os efeitos adversos nas populações e ecossistemas (Suter, 1993). Os efeitos deletérios são raramente detectados e tendem a se manifestar somente após longos períodos e quando se tornam claros, podem ter ido além do ponto de reversão (Bayne et al., 1985).

O manganês (Mn) é o 5º metal e o 12º elemento mais abundante da crosta terrestre onde seus minerais (especialmente óxidos, silicatos e carbonatos) são amplamente distribuídos. De certa forma, o Mn tem ocorrência natural, sendo a erosão do solo a fonte mais importante. Por outro lado, o Mn pode ser encontrado também como resultado de contaminação do solo, sedimento ou água por aerossóis, inseticidas e fertilizantes (Gerber et al., 2002).

Este metal é essencial para muitos organismos, incluindo os peixes (Knox et al., 1981; Gatlin and Wilson, 1984; Maage et al., 2000), atuando em processos fisiológicos tais como, metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Keen et al., 1984; Keen et al., 1999; Pittman, 2005), e tem uma importante função como cofator de inúmeras enzimas envolvidas na biossíntese de DNA e neurotransmissores, transdução de sinal (Roth and Garrick, 2003; Pittman, 2005) e como constituinte de metaloenzimas (Cossarini-Dunier et al., 1988). No entanto, o excesso de Mn pode causar efeitos negativos incluindo alterações no sistema nervoso central (Gerber et al., 2002; Gunter et al., 2006), alterações no balanço de sódio (Gonzalez et al., 1990), comprometimento na absorção e mineralização do cálcio (Reader et al., 1988), alterações no metabolismo de carboidratos (Nath and Kumar, 1987; Barnhoorn et al., 1999), efeitos nas respostas imune (Cossarini-Dunier et al., 1988) e alterações no desenvolvimento e funções reprodutivas (Grey and Laskey, 1980; Laskey et al., 1982).

Alguns estudos indicam que a biodisponibilidade do Mn assim como a sua toxicidade em peixes de água doce aumenta em pH ácido (Bendell-Young and Harvey, 1986; Rouleau et al., 1996). No entanto, a presença de íons H^+ pode solubilizar outros compostos presente no ambiente, dentre eles, outros metais tais como o Alumínio (Al). O Al não é solúvel em água, mas em pH ácido ou muito básico, passa a biodisponibilizar várias espécies químicas (Smith, 1996) que determinam sua toxicidade (Guibaud and Gauthier, 2005). Além disso, quando estas substâncias estão associadas

com outros compostos presentes na água, podem ocorrer efeitos de interações que acentuem ou inibem os efeitos causados por elas (Mozeto e Zagatto, 2006).

A complexidade das várias espécies químicas do Al, formadas na água, tem sido discutida por alguns pesquisadores devido a dificuldade de entender sua toxicidade em laboratório, devido principalmente à facilidade do Al em se associar a diversos compostos orgânicos (Wilson, 2011). Adicionalmente, segundo Teien et al. (2006), o pH tem uma grande influência na especiação de metais podendo determinar a hidrólise, agregação, precipitação e competição de prótons por locais de ligação disponível.

A entrada de Mn ocorre, provavelmente, pelas brânquias e é transportado pelo sangue para vários órgãos e tecidos, acumulando-se principalmente em tecidos ricos em mitocôndrias como o fígado, pâncreas e rins (Rouleau et al., 1995). Já o Al se concentra principalmente nas brânquias e causa alterações de várias funções dos animais (Cole et al., 2001; Teien et al., 2006; Camargo et al., 2009; Vieira et al., 2013), mas são poucos os estudos que relatam a capacidade de recuperação do tecido após exposição ao metal como o reportado por Garg et al. (2009).

Considerando-se a presença de ambos metais, Mn e Al, em concentrações acima das permitidas pela legislação ambiental, no rio Paraíba do sul e a possível interação entre eles, o presente estudo investigou os efeitos agudos do Mn isoladamente (1) e em associação com Al (2), em pH ácido, nos principais substratos metabólicos de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* e a habilidade de recuperação (3) dos animais quando colocados em água limpa.

2. Materiais e métodos

2.1 Água do experimento

A água utilizada no experimento foi filtrada em 2 filtros de celulose (IMPAC® – CEP 10, São Paulo, SP, Brasil e Acqualimp® FICZ –10, Valinhos, SP, Brasil) os quais continham carvão ativado (5 µm) para remover as partículas sólida e reduzir matéria orgânica e possíveis contaminantes químicos. Os parâmetros físico-químicos da água foram avaliados e descritos. O meio experimental foi continuamente aerado e a temperatura (mantida aproximadamente a 25°C com aquecedor) e o oxigênio dissolvido (mantido aproximadamente a 7 mg·L⁻¹ com aeradores) monitorados diariamente com um oxímetro (model 55; YSI, Yellow Springs, OH, USA), que mede ambos, oxigênio e temperatura. Os metais foram dosados antes e após a renovação da água (Tabela 1) com

um espectrofotômetro de absorção atômica (GBC, AAS 932 Avanta-Plus, IL, USA) pela empresa Nova Ambi-SP e todos os procedimentos para análise foram realizados pela empresa.

2.2 Procedimento experimental

Fêmeas vitelogênicas de *A. bimaculatus* foram doadas pela Unidade de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética do Estado de São Paulo (CESP; Paraibuna, São Paulo, Brasil). *A. bimaculatus* é uma espécie amplamente distribuída na América do Sul (Pavanelli e Caramaschi, 1997), incluindo o sudeste do Brasil, onde o acúmulo de Mn e Al é comum no solo e consequentemente na água (CETESB, 2011). Esta espécie é um importante componente da ictiofauna e está presente em muitas bacias da região sudeste do Brasil incluindo a do Paraíba do Sul (Pavanelli e Caramaschi, 1997).

Os animais ($n = 60$), pesando $49.3 \pm 4.56\text{g}$ e medindo $14.0 \pm 0.31\text{cm}$, foram distribuídos em seis aquários de 140 L, $40 \times 50 \times 70\text{cm}$ (126 L de água; 10 peixes por aquário; densidade de peixes = $3.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e mantidos aclimatados por 15 dias sob condições controladas com fotoperíodo de 12:12h, renovação parcial de água (80%) e alimentados com ração comercial.

A concentração nominal de Mn e Al foi de $0.5 \text{ mg Mn}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0.5 \text{ mg Al}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta concentração é uma média das concentrações observadas ao longo da bacia do rio Paraíba do Sul (região de origem dos animais), acima dos valores máximos permitidos pela regulamentação brasileira ($0.1 \text{ mg Al}\cdot\text{L}^{-1}$, CONAMA, 2005). As soluções de Mn e Al foram obtidas utilizando sulfato de manganês [$\text{Mn SO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$; Merck, Darmstadt, Germany]) e sulfato de alumínio [$\text{Al}_2 (\text{SO}_4)_3$; Merck, Darmstadt, Germany] de uma solução estoque preparada com água Milli-Q acidificada a pH 2.5 com 65% HNO_3 (Suprapur; Merck).

Os peixes foram transferidos aleatoriamente para seis aquários e divididos em 3 grupos: controle em pH neutro (dois aquários), Mn em pH ácido (dois aquários) e Mn + Al em pH ácido (dois aquários). Os testes de toxicidade foram conduzidos por 96 horas para caracterizar os efeitos dos metais em curto prazo (agudo) utilizando animais em jejum por 24 horas. Após 96 horas de exposição, cinco animais de cada aquário foram retirados e o restante foi transferido para aquários com água limpa (os mesmos parâmetros físico-químicos e pH 7), por mais um período de 96 horas, para verificar a habilidade do animal em se recuperar na ausência do poluente (grupo recuperação).

Durante o período de recuperação, os animais foram alimentados diariamente com a finalidade de proporcionar as condições ideais necessárias para uma possível recuperação.

Os testes foram do tipo semi-estático com renovação parcial de água a cada 24 horas e os parâmetros ajustados para pH 5.5 (com HCl ou NaOH [0.1N]; Synth, Brasil) nos grupos Mn e Mn+Al e para pH 7.0 para o controle em pH neutro (Tabela 1).

2.3 Amostras de tecidos

Após os períodos de exposição, os animais foram transferidos para recipientes menores e crioanestesiados. Amostras de sangue foram coletadas por punção da vasculatura caudal com seringas heparinizadas (Liquemine - Roche®). O sangue foi centrifugado por 5 min a $655 \times g$ para separação do plasma que foi dividido em alíquotas e estocado a -80°C até o uso. Os peixes foram eutanasiados por secção medular segundo protocolo aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (protocolo 101/2009). Amostras de fígado, músculo branco e ovários foram coletadas e congeladas a -80°C . Os ovários foram macroscopicamente avaliados (tamanho, cor e estágio de maturação) e assim como o fígado, foram pesados em balança analítica para cálculo do índice gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS). Estes índices expressam a porcentagem das gônadas e fígado em relação ao peso do animal. O IGS é um indicador efetivo do estado funcional dos ovários.

2.4 Conteúdo de água nos tecidos

O conteúdo de água nos tecidos foi analisado para determinar se as alterações observadas nos substratos metabólicos não foram devido às possíveis mudanças no conteúdo de água pois, os dados foram expressos em massa úmida.

As análises do conteúdo de água (%) foram realizadas pesando-se aproximadamente 10 mg de cada tecido e colocando-os em estufa (60°C) por aproximadamente 24 horas até atingir massa constante. Os fragmentos de tecido foram removidos da estufa e colocados em um dissecador até atingir temperatura ambiente e as massas finais foram determinadas. A diferença entre a massa inicial e final foi expressa em porcentagem para cada tecido (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.5 Substratos energéticos

Após a extração das proteínas totais dos tecidos, com ácido perclórico e solubilização com KOH de acordo com o método proposto por Milligan e Girard (1993), a quantidade de proteínas de todos os tecidos (músculo branco, fígado e ovários) e no plasma foi determinada por método colorimétrico descrito por Lowry et al., (1951). A concentração total de proteínas foi calculada utilizando uma curva padrão de albumina do soro bovino (Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO, USA) em 660 nm e os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido e $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ no plasma.

Os lipídios totais do músculo branco, ovários e fígado foram extraídos com uma mistura de clorofórmio, metanol e água (2:1:0.5) de acordo com o método proposto por Folch et al. (1957) e ajustado por Parrish (1999) para organismos aquáticos. Os lipídios totais nos tecidos e plasma foram quantificados por método colorimétrico descrito por Frings et al. (1972) utilizando óleo de fígado de bacalhau (Sigma Diagnostics INS) como padrão a 540 nm, os valores foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ nos tecidos e $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ no plasma.

Para análise do glicogênio hepático e muscular, amostras de tecidos foram transferidas para tubos contendo 1 mL de 6N KOH de acordo com metodologia descrita por Bidinotto et al. (1997) e quantificado (Dubois et al., 1956) utilizando D-Glicose (Sigma Diagnostics INS) como padrão a 480 nm e os valores expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

2.6 Ácidos graxos

Os lipídios totais extraídos (metodologia descrita no item 2.5) foram separados em frações neutra (triglicérides) e polar (fosfolipídios) por cromatografia de coluna (Yang, 1995) e em seguida, metilados com cloreto de acetila (5% HCl em metanol para a formação de grupamentos metil ésteres)(Christie, 2003) e os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa (equipamento VARIAN GC 3900) com auxílio de um autoinjeter e aparelho acoplado a um ionizador de chama (FID) com coluna CP Wax 52 CB (0.25 mm de espessura, diâmetro interno de 0.25 μm e 30 m de comprimento) e hidrogênio como gás carreador a uma velocidade linear de 22 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. A temperatura programada foi de 170⁰ C por 1 min seguido por subida de 25⁰C.min⁻¹ para 240⁰C, e tempo de espera final de 5 min. No injetor e no detector (FID) as temperaturas foram de 250 e 260⁰ C, respectivamente. O perfil de ácidos graxos foi obtido com o cálculo de tempo de retenção, utilizando-se um padrão de ácidos graxos com tempo de

retenção conhecido (Supelco, 37 *standard* e Qualmix PUFA Fish M, *Indofine Chemical*) e representados por porcentagem.

2.7 Lipoperoxidação hepática

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada pelo método FOX (*Ferrous Oxidation in Xylenol Orange*) modificado de acordo com Hermes-Lima et al., (1995). Amostras de fígado foram homogeneizadas em metanol e centrifugadas a $1.000 \times g$ por 5 minutos e na sequência foram adicionados os seguintes reagentes: 1 mM FeSO₄, 0.25 M H₂SO₄, 1 mM laranja de xilenol e água MilliQ em um volume total de 0.9 mL. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 1 h e a absorbância lida em espectrofotômetro a 580 nm. Em seguida, foi adicionado cumene hidroperóxido (CHP) (5×10^{-3} mM) e a absorbância lida novamente a 580 nm. A oxidação de íons de ferro na presença de laranja de xilenol foi determinada e expressa em equivalente de CHP nmol·g⁻¹ peso úmido.

2.8 Análise estatística

Os dados foram expressos em media $\pm$ EPM. Os valores foram comparados entre tratamentos (controle, Mn em pH ácido e Mn+Al em pH ácido), utilizando análise de variância em uma via (*One way ANOVA*) seguida pelo teste de Tukey para dados paramétricos e Kruskal–Wallis para dados não paramétricos. Os períodos de exposição (agudo e seu respectivo grupo de recuperação) foram comparados utilizando teste- t para dados paramétricos e Mann-Whitney para não paramétrico. Para os ácidos graxos, primeiramente foram comparados os valores das classes totais de saturados (STA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) e se encontrada diferença entre os grupos, os ácidos graxos, individualmente, foram analisados pelos mesmos testes citados acima. Para todas as análises foi considerado como diferença significativa $P < 0.05$, utilizado-se o programa BioStat for Windows v2009 (AnalystSoft Inc.).

3. Resultados

Os resultados dos efeitos do pH ácido foram apresentados no capítulo 3 e a influência da concentração de íons H⁺ no metabolismo dos animais não foi diferente da

observada para o grupo controle em nenhum parâmetro analisado, portanto exclui-se que todos os efeitos observados neste estudo sejam decorrentes da exposição ao pH ácido e sim dos metais.

3.1 Água

Os parâmetros físico-químicos da água (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) foram monitorados, e se necessário, ajustados para manter os valores esperados (Tabela 1). Concentrações de compostos de nitrogênio (NH_3 e NO_2) não mostraram diferenças significativas (<0.015 ppm) que pudessem interferir nos resultados. As concentrações de Mn e Al foram mantidas dentro do esperado (Tabela 1). Os principais parâmetros físico-químicos foram avaliados: $\text{Ca}^{2+} = 8.88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Fe} = 0.09 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{SO}_4 = 12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{PO}_4 = 0.46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, compostos de nitrogênio total = $0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, alcalinidade = $15 \text{ mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, matéria orgânica = 19%, cloreto = $4.90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, condutividade elétrica (a 25°C) = $65.50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, carbono orgânico = $1.3 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$, carbono inorgânico = $1.2 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$, dureza total = $26 \text{ mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, e turbidez = 1 NTV. Todos os parâmetros foram adequados e permitiram 100% de sobrevivência dos animais.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos controlados na água durante o teste agudo (N= 18) com *Astyanax bimaculatus*. Valores de pH, oxigênio dissolvido, temperatura e metais foram expresso em média $\pm$ EPM. ND- não detectado; CTR- grupo controle.

	CTR	Mn	Mn+Al
Parâmetros	pH neutro	pH ácido	pH ácido
pH	7.1 ± 0.03	5.4 ± 0.06	5.4 ± 0.05
Oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	7.1 ± 0.17	7.2 ± 0.15	7.3 ± 0.16
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	25.1 ± 0.33	24.3 ± 0.28	24.3 ± 0.30
Manganês total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	ND	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.01
Manganês dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	ND	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.01
Alumínio total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	ND	ND	0.5 ± 0.04
Alumínio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	ND	ND	0.3 ± 0.05

3.2 IGS e IHS

Macroscopicamente, os ovários ocupavam aproximadamente 2/3 da cavidade celomática, sendo esverdeados, altamente vascularizados e com muitos oócitos vitelogênicos. As análises de histologia comprovaram o estágio de maturação (Figura 1 apresentada no capítulo anterior). O IGS variou de 15% a 19% e o IHS variou de 0.7% a 1.08%, não sendo observada diferença estatística entre os grupos para ambos os índices (Figura 1).

Figura 1: Índices Gonadosomático (A) e hepatossomático (B) em fêmeas maduras de *Astyanax bimaculatus*, durante o teste agudo (96 h) e recuperação (96 h). Os dados estão expressos em Média $\pm$ EPM. CTR- grupo controle, Mn (grupo manganês em pH ácido), Mn+Al (grupo exposto aos dois metais juntos em pH ácido)

3.3 Conteúdo de água nos tecidos

Não foi observada diferença significativa no conteúdo de água nos tecidos. Nos animais do controle (pH neutro), os valores foram: $82.3 \pm 2.00\%$ no fígado, $59.1 \pm 1.65\%$ nos ovários e $76.2 \pm 1.14\%$ no músculo durante o teste agudo; e $80.9 \pm 2.59\%$ no fígado, $58.9 \pm 1.51\%$ nos ovários e $78.3 \pm 0.59\%$ no músculo no período de recuperação. Nos animais expostos ao Mn em pH ácido, os valores foram: $79.4 \pm 1.60\%$ no fígado, $58.4 \pm 1.28\%$ nos ovários e $76.4 \pm 1.39\%$ no músculo durante o teste agudo; e $82.9 \pm 2.37\%$ no fígado, $58.7 \pm 0.42\%$ nos ovários e $79.3 \pm 0.38\%$ no músculo no período de recuperação. Nos animais expostos aos dois metais juntos, os valores de conteúdo de água foram: $81.3 \pm 2.40\%$ no fígado, $59.0 \pm 1.64\%$ nos ovários e $77.0 \pm 1.61\%$ no músculo durante o teste agudo; e $82.1 \pm 2.81\%$ no fígado, $56.5 \pm 1.42\%$ nos

ovários e $76.4 \pm 1.56\%$ no músculo no período de recuperação. Não foram observadas diferenças entre o período agudo e recuperação.

3.4 Substratos energéticos

As concentrações dos substratos metabólicos foram apresentadas nos tecidos analisados comparando-se os grupos e subsequentemente entre os tratamentos. Na figura 2 estão apresentados os resultados observados nas concentrações protéicas nos diferentes tecidos, mostrando que os tecidos respondem de forma diferente à toxicidade.

No fígado houve uma diminuição da concentração de proteínas nos animais do grupo exposto ao Mn, e uma diminuição mais acentuada nos animais do grupo exposto aos dois metais. Ao passar pelo período de recuperação nota-se uma diminuição deste substrato tanto nos animais do grupo controle quanto naqueles expostos ao Mn, quando comparados ao período do teste agudo, mostrando que não houve recuperação deste substrato no fígado (Figura 2A). O plasma refletiu o mesmo padrão observado no fígado no período agudo, porém, após passar pelo período de recuperação, observou-se uma diminuição do substrato nos animais do grupo controle, mas um aumento nos grupos expostos aos metais, com recuperação das concentrações iniciais na exposição aos dois metais e com valores até acima dos iniciais nos animais expostos ao Mn isoladamente (Figura 2D).

Nos ovários os metais também exerceram influência promovendo uma diminuição no conteúdo protéico nos dois grupos de exposição. Na transferência para a água limpa notou-se que os animais do grupo controle apresentaram um aumento deste substrato nos ovários, com diferença significativa quando comparados aos animais dos grupos expostos aos metais, os quais não apresentaram mudança alguma em relação ao tratamento com o(s) metal(s), evidenciando a ausência de recuperação do tecido (Figura 2B). No músculo, o Mn, isolado ou associado ao Al não alterou o conteúdo protéico, no entanto após o período de recuperação, a concentração protéica mostrou-se reduzida nos dois grupos expostos aos metais (Figura 2C) em relação ao controle mas não diferente ao seu respectivo grupo do agudo.

Figura 2: Concentração de proteínas totais no fígado (A), ovários (B), músculo (C) e plasma (D), em fêmeas maduras de *Astyanax bimaculatus* durante os testes agudo (96 h) e recuperação (96 h). Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. CTR- grupo controle. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$) entre os tratamentos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) no teste agudo (abc) e recuperação (ab'). * Barras com símbolo indicam diferenças estatísticas significativas entre os respectivos grupos entre a fase do teste agudo e de recuperação ($P < 0.05$).

A exposição ao Mn isoladamente ou associado ao Al pelo período de 96 horas não foi o suficiente para alterar as concentrações de glicogênio muscular e hepático, porém observou-se uma diminuição deste substrato nos animais do grupo controle após o período de recuperação (Figura 3).

Figura 3: Concentração de glicogênio no fígado (A) e no músculo (B) de fêmeas maduras de *Astyanax bimaculatus* durante os testes agudo (96 h) e recuperação (96 h). Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. CTR- grupo controle. *Barras com símbolo indicam diferenças estatisticamente significativa entre os respectivos grupos entre a fase do teste agudo e de recuperação ($P < 0.05$).

As análises da concentração de lipídios mostraram que a exposição ao Mn, tanto isoladamente quanto associado ao Al não alterou este substrato nos tecidos analisados. No entanto, quando os animais foram transferidos para a água limpa, no período de recuperação, é possível observar uma diminuição na concentração lipídica em quase todos os tecidos, e no plasma (Figura 4 A-D). Apenas no músculo observa-se um comportamento diferente onde há uma diminuição do conteúdo lipídico nos animais expostos ao Mn, mas apenas após o período de recuperação (Figura 4C).

Figura 4: Concentração de lipídios totais no fígado (A), ovários (B), músculo (C) e plasma (D), em fêmeas maduras de *Astyanax bimaculatus* durante os testes agudo (96 h) e recuperação (96 h). Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. CTR- grupo controle. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$) entre os tratamentos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) no período de recuperação (ab'). * Barras com símbolo indicam diferenças estatisticamente significativa entre os respectivos grupos entre a fase do teste agudo e de recuperação ($P < 0.05$).

3.5 Perfil de ácidos graxos

Os resultados das análises de ácidos graxos estão sendo apresentados de forma agrupada nas principais classes. As tabelas com todos ácidos graxos analisados individualmente estão em anexo. Durante o período agudo de exposição, assim como na concentração de lipídios, o Mn, em exposição isolada ou associado ao Al não alterou a porcentagem de ácidos graxos nos tecidos analisados. O único efeito observado foi o aumento de PUFA na fração polar dos ovários dos animais do grupo tratado com os dois metais associados (Figura 5B).

Figura 5. Porcentagem de ácidos graxos da fração neutra do fígado (A), ovários (B) e músculo (C) de *Astyanax bimaculatus* nos grupos experimentais durante os testes agudo e de recuperação. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$) entre os tratamentos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) no teste agudo (ab) e recuperação (ab'). * Barras com símbolo indicam diferença estatisticamente significativa entre as fases dos grupos do teste agudo e de recuperação ($P < 0.05$).

Figura 6. Porcentagem de ácidos graxos da fração polar do fígado (A), ovários (B) e músculo (C) de *Astyanax bimaculatus* nos grupos experimentais durante os testes agudo e de recuperação. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$) entre os tratamentos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) no teste agudo (ab) e recuperação (ab'). *Barras com símbolo indicam diferença estatisticamente significativa entre as fases dos grupos do teste agudo e de recuperação ($P < 0.05$).

Após o período de recuperação foram observadas alterações na fração polar do ovário (Figura 6) com diminuição de SAT (principalmente 16:0, anexo 5), MUFA (18:1n9, anexo 5) e aumento de PUFA, representado por alterações tanto na classe Omega 3 (diminuição do 22:6n3, anexo 5) e da classe Omega 6 (diminuição de 20:4n6, anexo 5) nos animais expostos ao Mn isoladamente e em associação com Al (anexo 5), quando comparados ao controle, mas sem diferença em relação ao seu respectivo grupo agudo. De forma contrária, no plasma a exposição ao Mn causou diminuição de PUFA também no período de recuperação (Figura 7). Além disso, após o período de recuperação várias alterações foram observadas nos ácidos graxos individualmente na maioria dos tecidos e em todos os grupos, inclusive no controle (Figuras 5, 6 e 7 e anexos). No entanto estas alterações foram aleatórias, sem manter um padrão.

Figura 7. Porcentagem de ácidos graxos do plasma de *Astyanax bimaculatus* nos grupos experimentais durante os testes agudo e de recuperação. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$) entre os tratamentos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) no teste agudo (ab) e recuperação (ab'). * Barras com símbolo indicam diferenças estatisticamente significativa entre as fases dos grupos do teste agudo e de recuperação ($P < 0.05$).

3.6 Lipoperoxidação

O Mn, isoladamente, promoveu lipoperoxidação hepática, mas em combinação com Al, não houve esta alteração. Ao passar para água limpa observou-se uma recuperação, com os valores voltando aqueles iniciais (Figura 8).

Figura 8. Peroxidação lipídica em fosfolipídios de membrana no fígado de fêmeas de *Asyanax bimaculatus*. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$) entre os tratamentos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) no teste agudo (ab). * Barra com símbolo indicam diferença estatisticamente significativa entre as fases dos grupos do teste agudo e de recuperação ($P < 0.05$).

4. Discussão

Os resultados obtidos aqui demonstram a toxicidade do Mn, principalmente, no metabolismo protéico devido à diminuição na concentração de proteínas totais em todos os tecidos seja no período de exposição agudo ou de recuperação, sem recuperação deste substrato no fígado e nos ovários. Apesar do Mn, isolado ou associado ao Al não alterar a concentração de lipídios totais, este metal promoveu lipoperoxidação nos fosfolipídios das membrana hepáticas e em associação com Al parece interferir na estruturação de PUFA nas membranas dos ovários.

Pouco se sabe sobre os reais efeitos do Mn em peixes, mas alguns estudos demonstraram que sua entrada no organismo se dá como qualquer outro metal, através das brânquias promovendo, alterações funcionais (Nyberg et al., 1995; Vieira, 2012 - capítulo 2). Na sequência o metal é transportado via corrente sanguínea e distribuído

para vários órgãos, acumulando-se principalmente em tecidos ricos em mitocôndrias como o fígado, pâncreas e rins (Rouleau et al., 1995). O fígado, por ser o principal órgão de detoxificação (Van der Oost et al., 2003) pode sofrer os danos diretos do efeito do acúmulo deste metal, o que foi observado neste estudo, com a diminuição de proteínas e o aumento de peroxidação lipídica, decorrentes da presença do acúmulo de Mn no local. Porém estes efeitos foram diferentes quando o Mn foi associado ao Al, com redução acentuada das proteínas, mas sem ação na peroxidação e no metabolismo de glicogênio quando comparado aos efeitos do Al isoladamente (Vieira et al., 2013). Correia (2012) demonstrou em seus estudos, com a mesma espécie e as mesmas condições experimentais, que o fígado é o segundo órgão, depois das brânquias, a apresentar as maiores concentrações de Mn e de Al bioacumulados. Este quadro ocorre tanto para a exposição ao Mn isoladamente, quanto associado ao Al e mesmo ao retornar para um ambiente “despoluído” estes valores não foram reduzidos. Talvez a concorrência por sítios de ligação demonstrem estes efeitos de potencialização ou antagonismo apresentado por este íons nos diferentes parâmetros e a isso é atribuído o real efeito do metal no organismos (Jaben et al., 2012; Oberholster et al., 2012).

Além disso, já foi demonstrado que o Mn altera várias funções fisiológicas tais como redução de potássio e glicogênio no fígado (Barnhoon et al., 1999; Partridge e Lymbery, 2012), hiperglicemia e inibição da liberação de insulina (Nath and Kumar, 1987), estresse oxidativo e peroxidação lipídica (Vieira et al., 2012) o que torna outros órgãos mais susceptíveis ao agente estressor comprometendo suas funções.

O fígado e os ovários desempenham um importante papel na reprodução de peixes teleósteos por protagonizarem o processo de vitelogênese (Lubzens et al., 2010) e avaliar o custo energético associado aos ajustes do processo de estresse, possibilita estabelecer a causa e o efeito dos agentes estressores e as respostas do organismo frente a eles (Mozeto e Zagatto, 2006). Os estudos de substâncias que de, alguma forma, causam impacto na reprodução e na regulação hormonal dos animais, têm atraído crescente interesse nos últimos anos, uma vez que, uma diminuição na taxa reprodutiva das espécies pode, em longo prazo, ameaçar a sobrevivência de um grande número de espécies alterando o ecossistema (Spies et al., 1990). Alterações na concentração protéica dos ovários de fêmeas maduras podem prejudicar o processo de reprodução, uma vez que, 79% da composição do vitelo é de proteínas (Lubzens et al., 2010) e o animal dificilmente priorizará o sucesso reprodutivo em um ambiente desfavorável pois

a habilidade para monitorar a disponibilidade interna e externa de energia parece ser o ponto central entre o balanço energético e a reprodução (Schneider et al., 2004).

A diminuição deste substrato observado nos animais expostos ao Mn e ao Mn+Al coincidem com uma diminuição nos principais hormônios reprodutivos, principalmente no 17α hidroxiprogesterona (17α OHP) que é o progestágeno precursor do hormônio responsável pela desova (Correia, 2012). Estes parâmetros analisados em conjunto, podem indicar que o Mn atua como desregulador endócrino assim como o Al (Correia et al., 2010; Vieira et al., 2013). Porém no presente estudo observou-se que o Al parece não antagonizar o efeito do Mn, quando estes dois metais estão juntos, pois não houve retorno da concentração de proteína nos ovários quando os animais passaram para o período de recuperação como foi observado na exposição somente ao Al por Vieira et al. (2013). Concomitantemente a estes resultados os ovários parecem ser um órgão de deposição de Mn uma vez que ao passarem para água limpa a concentração do metal aumenta (Correia, 2012).

Ainda nos ovários foi observado o aumento na porcentagem de PUFA nos fosfolipídios das membranas após a exposição ao Mn+Al juntos durante os teste agudo, demonstrando a influência do Al em promover alterações nos ácidos graxos de membrana como visto no capítulo 3. E ainda, que o Mn não foi capaz de antagonizar este efeito mas, evitou a peroxidação de fosfolipídios nos animais deste grupo, demonstrando a capacidade de alterações que ambos os metais apresentam neste órgão. Sugere-se que este ajuste nas membranas possa ter ocorrido em decorrência da alteração da permeabilidade da mesma para facilitação do transporte (Hazel e Williams, 1990) já que a intensidade de estressores foi maior.

As análises metabólicas realizadas após o período de exposição (recuperação) foram propostas com a finalidade de avaliar a capacidade dos animais de recuperar os danos causados pela exposição aos metais. No entanto, em muitas situações, alguns padrões foram observados, inclusive no grupo de controle, tais como diminuição da concentração de proteínas, lipídios e glicogênio em vários tecidos e alterações nas proporções de ácidos graxos em todos os tecidos. Estes resultados foram comuns para os animais da maioria dos grupos, independentemente do tratamento, o que sugere que a extensão de 96 horas nos tanques e /ou o fornecimento de alimento foram determinantes para os perfis metabólicos encontrados na fase de recuperação, e não os tratamentos em si.

A mobilização de recursos energéticos é uma estratégia adaptativa adotada por peixes em situações de estresse. As respostas fisiológicas para restabelecimento da homeostase podem ser intensas a ponto de realocar energia de processos mais custosos como crescimento e reprodução (Wendelaar Bonga, 1997). Os custos da reprodução dependem da estratégia reprodutiva de cada espécie e *A. bimaculatus* é uma espécie reconhecida biologicamente por se ajustar em reposta as condições do ambiente e por apresentar desova do tipo total. As fêmeas vitelogênicas desta espécie parecem dar preferência à sobrevivência ao invés de desovar oócitos deficientes que poderiam dificultar a sobrevivência da prole, assim como observado por Vieira et al. (2013) com a mesma espécie exposta ao Al.

Pode-se concluir que o Mn, isoladamente ou em associação com o Al, mostrou-se tóxico para fêmeas vitelogênicas de *A. bimaculatus*, por atuar no metabolismo protéico dos ovários e fígado e, juntamente com outros dados, pode ser considerado um desregulador do processo reprodutivo, podendo retardar o processo de desova pela deficiência nutricional que seria transferida para a prole. No entanto, este metal pareceu atuar como antagonista dos efeitos do Al em outros parâmetros.

5. Referências Bibliográficas

- Barnhoorn, I., Van Vuren, J.H.J., du Preez, H.H., 1999. Sublethal effects of manganese on the carbohydrate metabolism of *Oreochromis mossambicus* after acute and chronic exposure. S. Afr. J. Zool. 34, 102–107.
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.A., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., R. Widdings, J., 1985. The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals. Praeger, New York, USA
- Bendell-Young, L.I. and Harvey, H.H., 1986. Uptake and tissue distribution of manganese in the white sucker (*Catostomus commersoni*) under conditions of low pH. Hydrobiologia 133, 117–125.

- Bidinotto, P.M., Moraes, G., Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. B. Tec. CEPTA 10, 53-60.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Aquat. Toxicol. 94, 40–46.
- CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 2011 + anexos (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103) Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>. Data de acesso 10/08/2012.
- Christie, W.W., 2003. Lipids Analysis. The Oily Press, Bridgwater. 307p.
- Cole, M.B., Arnold, D.E., Watten, B.J., Krise, W.F., 2001. Haematological and physiological responses of brook charr, to untreated and limestone-neutralized acid mine drainage. J. Fish Biol. 59, 79–91.
- CONAMA, 2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em: 16/06/2012.
- Correia, T.G., 2012. Evidências de desregulação endócrina causada pela exposição aquática ao Alumínio e ao Manganês em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758). Tese em Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil 140p.
- Cossarini-Dunier, M., Demael, A., Lepot, D., Guerin, V., 1988. Effect of manganese ions on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) against *Yersinia ruckeri*. Dev. Comp. Immunol. 12, 573–579.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith F., 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and substances relates. *An. Chem.* 28, 350-358.
- Folch, J, Less, M., Sloane Stanley, GH., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem*, 226, 497-503.
- Frings, C.S., Fendly, T., Dunn, R.T., Quenn, C.A., 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clin. Chem.*, 18, 673-674.
- Garg, S., Gupta, R.K., Jain, K.L., 2009. Sublethal effects of heavy metals on biochemical composition and their recovery in Indian major carps. *J. Hazard. Mater.* 163,1369–1384.
- Gatlin, D.M. and Wilson, R.P., 1984. Studies on the manganese requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 41, 85–92.
- Gerber G.B., Leonard A., Hantson P., 2002. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 25–34.
- Gonzalez, R.J., Grippo, R.S., Dunson, W.A., 1990. The disruption of sodium balance in brook char, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), by manganese and iron. *J. Fish Biol.* 37, 765–774.
- Grey, L. E., and Laskey, J. W., 1980. Multivariate analysis of the effects of manganese on the reproductive physiology and behavior of the male house mouse. *J. Toxicol. Environ. Health* 6, 861–867.
- Guibaud, G. and Gauthier, C. 2005. Aluminium speciation in the vienne river on its upstream catchment (Linousen region, France). *J. Inorg. Biochem.* 99:1817-1821.
- Gunter, T.E., Gavin, C.E., Aschner, M., Gunter, K.K., 2006. Speciation of manganese in cells and mitochondria: a search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 27, 765–776.

- Hazel, J.R. and Williams, E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid. Res.* 29, 167–227.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylene orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19 (3), 271-280.
- Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 1985. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, third ed. IMESP, São Paulo.
- Jaben, G., Javed, M., Azmat, H. 2012. Assessment of heavy metals in the fish collected from the river Ravi, Pakistan. *Pakistan Vet. J.* 32, 107 – 111.
- Keen, C. L., Lonnerdal, B., Hurley, L. S., 1984. Manganese. In *Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements* (E. Frieden, Ed.), pp. 89– 132. Plenum Publishing Co., New York.
- Keen, C.L., Ensunsa, J.L., Watson, M.H., Baly, D.L., Donovan, S.M., Monaco, M.H., and Clegg, M.S., 1999. Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology* 20 (2– 3), 213–223.
- Knox, D., Cowey, C.B., Adron, J.W., 1981. The effect of low dietary manganese intake on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 46, 495–501.
- Laskey, J.W., Rehnberg, G.L., Hein, J.F., Carter, S.D., 1982. Effects of chronic manganese (Mn₃O₄) exposure on selected reproductive parameters in rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 9, 677–687.
- 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.

- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J. 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 367-389.
- Maage, A., Lygren, B., El-Mowafi, A.F.A., 2000. Manganese requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Fish. Sci.* 66, 1–8.
- Milligan, C.L., Girard, S.S., 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 180, 175-193.
- Mozeto, A. A. e Zagatto, P. A. 2006. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: P. A. Zagatto & E. Bertolotti (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, p. 15 – 38p.
- Nath, K. and Kumar, N., 1987. Toxicity of manganese and its impact on some aspects of carbohydrate metabolism of a freshwater teleost, *Colisa fasciatus*. *Sci. Total Environ.* 67, 257–262.
- 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.
- Oberholster, P. J., Myburgh, J. G., Ashton, P. J., Coetzee, J. J., Botha, A. M., 2012. Bioaccumulation of aluminium and iron in the food chain of Lake Loskop, South Africa. *Ecotox. Environm. Saf.* 75, 34–141.
- Parrish, C.C. 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts MT, Wainman BC (eds) *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer, New York, pp 4–20
- Partridge, G. J. and Lymbery, A. J., 2009. Effects of manganese on juvenile mullet (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity-Implications for inland mariculture. *Aquaculture* 290 (3-4), 311 – 316.

- Pavanelli, C.S. and Caramaschi, E.P., 1997. Composition of the ichthyofauna of two small tributaries of the Paraná river, Porto Roci, Paraná State, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 8(1), 23-31.
- Pittman, J.K., 2005. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol.* 167, 733–742.
- Reader, J.P., Dalziel, T.R.K., Morris, R., 1988. Growth, mineral uptake and skeletal calcium deposition in brown trout, *Salmo trutta* L., yolk-sac fry exposed to aluminium and manganese in soft acid water. *J. Fish Biol.* 32, 607–624.
- Rouleau, C., Tjälve, H., Gottofrey, J., Pelletier, É., 1995. Uptake, distribution and elimination of $^{54}\text{Mn(II)}$ in the brown trout (*Salmo trutta*). *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 483–490.
- Rouleau, C., Tjalve, H., Gottofrey, J., 1996. Effects of low pH on the uptake and distribution of $^{54}\text{Mn(II)}$ in brown trout (*Salmo trutta*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 708–710.
- Roth, J.A. and Garrick, M.D., 2003. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1–13.
- Schneider, J. E., 2004. Energy balance and reproduction. *Physiol. Behav.* 81, 289-317.
- Smith, R. W., 1996. Kinetic aspects of aqueous aluminum chemistry: environmental implications. *Coordin. Chem. Rev.*, 149, 81-93.
- Spies, R.B., Stegeman, J.J., Rice, D.W., Jr, Woodlin, B., Thomas, P., Hose, J.E., Cross, J.N., Prieto, M., 1990. Sublethal responses of *Platichthys stellatus* to organic contamination in San Francisco Bay with emphasis on reproduction. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, Pp. 87-122.

- Suter, II, G.W. (Ed.), 1993. Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Teien, H. C., Standring, W. J. F., Salbu, B., 2006. Mobilization of river transported colloidal aluminium upon mixing with seawater and subsequent deposition in fish gills. *Sci. Total Environ.* 364: 149-164p.
- 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.
- 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. Physiol.* 157 C, 1-8.
- Vieira, M. C., Torronteras, R., Córdoba, F., Canalejo, A., 2012. Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotox. Env. Safety* 78, 212 – 217.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Wilson, R.W. 2011. Aluminum. In: Wood, C., Farrel, A.P., Brauner, C.J (Eds.). *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*, Volume 31B. Academic Press 1 edition. 528p.
- Yang, Z., 1995. Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples. MSc Thesis. Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, 96 pp.

Anexo 1. Porcentagem de ácidos graxos da fração neutra do fígado nos testes agudo e de recuperação.

Ácido Graxo (%)	Fígado (fração neutra)									
	Agudo					Recuperação				
	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	
14:0	0.29 ±0.02	0.47 ±0.06	1.05 ±0.35	0.57 ±0.13	0.66 ±0.17	1.96 ±0.53				
15:0	0.25 ±0.03	0.25 ±0.02	0.49 ±0.10	ND	ND	ND				
16:0	26.8 ±3.24	24.4 ±2.27	20.5 ±1.47	21.5 ±13.4	21.9 ±2.63	23.9 ±3.19				
17:0	0.65 ±0.07	0.87 ±0.08	1.24 ±0.28	1.73 ±0.06	3.98 ±1.34	2.81 ±0.87				
18:0	7.81 ±0.62	7.62 ±0.22	8.96 ±0.58	9.96 ±2.35	6.07 ±0.49	7.52 ±0.24				
20:0	0.31 ±0.04	0.30 ±0.05	0.45 ±0.04	ND	ND	ND				
ΣSFA	36.3 ±2.84	34.4 ±2.28	32.7 ±2.08	33.4 ±2.16	31.5 ±2.18	36.2 ±1.73				
16:1	2.52 ±0.29	2.66 ±0.09	2.29 ±0.15	2.63 ±0.33	2.76 ±0.15	2.82 ±0.32				
18:1n9	37.4 ±2.84	37.2 ±1.17	32.2 ±2.28	30.3 ±2.96	28.6 ±3.19	31.2 ±3.35				
18:1n7	2.50 ±0.17	2.37 ±0.07	2.26 ±0.10	2.50 ±0.19	2.00 ±0.05	2.12 ±0.18				
20:1n9	1.02 ±0.17	1.02 ±0.13	1.29 ±0.10	ND	0.55 ±0.05	ND ±0.13				
ΣMUFA	43.5 ±2.67*	43.3 ±1.20*	38.0 ±2.45	35.8 ±3.15 [#]	33.9 ±3.31 [#]	36.2 ±3.64				
18:3n3	0.24 ±0.04	0.34 ±0.07	0.63 ±0.17	0.53 ±0.19	0.34 ±0.05	0.47 ±0.16				
20:3n3	0.47 ±0.05	0.53 ±0.14	0.59 ±0.10	ND	ND	ND				
20:5n3	1.18 ±0.34	1.22 ±0.21	1.56 ±0.26	2.59 ±0.91	4.65 ±1.69	5.28 ±1.38				
22:4n3	0.85 ±0.55	0.60 ±0.11	0.68 ±0.15	ND	ND	ND				
22:6n3	1.18 ±0.23	1.07 ±0.10	2.32 ±0.78	2.89 ±1.21	2.41 ±1.02	3.41 ±1.07				
ΣPUFA n3	3.83 ±0.65	3.78 ±0.40	5.80 ±1.24	6.01 ±2.56	9.40 ±2.47	11.4 ±3.53				
18:2n6c	8.99 ±1.13	11.2 ±1.69	11.4 ±1.08	10.9 ±1.66	8.37 ±1.27	7.35 ±0.27				
18:2n6t	0.99 ±0.22	1.34 ±0.31	2.35 ±0.71	1.87 ±0.57	4.10 ±0.94	ND ±0.67				
18:3n6	0.46 ±0.07	0.36 ±0.03	0.63 ±0.11	0.38 ±0.03	0.53 ±0.02	0.31 ±0.02				
20:2n6	0.79 ±0.06	0.70 ±0.12	1.05 ±0.26	1.53 ±0.52	ND	0.96 ±0.23				
20:3n6	1.29 ±0.13	0.99 ±0.14	1.43 ±0.17	2.12 ±0.34	0.85 ±0.09	0.83 ±0.07				
20:4n6	1.85 ±0.15	1.38 ±0.07	2.40 ±0.45	3.92 ±2.22	2.35 ±0.90	2.51 ±0.60				
22:2n6	0.89 ±0.38	0.86 ±0.15	0.99 ±0.20	1.94 ±0.16	3.90 ±2.16	2.42 ±1.69				
22:4n6	0.25 ±0.06	0.23 ±0.06	0.27 ±0.07	2.29 ±1.19	5.25 ±2.08	1.80 ±0.44				
22:5n6	0.47 ±0.15	0.90 ±0.25	1.54 ±0.42	1.50 ±0.14	ND	ND				
ΣPUFA n6	15.6 ±0.86	17.8 ±1.97	22.1 ±1.90	24.6 ±2.56	25.1 ±2.68	16.1 ±1.88				
ΣPUFA total	20.0 ±0.19*	22.2 ±2.17*	29.1 ±3.12	30.6 ±3.91 [#]	34.5 ±4.46 [#]	27.5 ±5.18				

CTR- grupo controle, SFA- ácidos graxos saturados, MUFA- ácidos graxos monoinsaturados, PUFA- ácidos graxos polinsaturados, PUFA n3- ácidos graxos polinsaturados omega 3, PUFA n6- ácidos graxos polinsaturados omega 6. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) (^{ab} teste agudo, ^{ab} teste recuperação).^{**} Diferentes símbolos indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Agudo e Recuperação) e seus respectivos grupos (CTR-CTR, Mn pH ácido - Mn pH ácido, Mn+Al pH ácido - Mn+Al pH ácido). ($P<0.05$). ND-Não detectado.

Anexo 2. Porcentagem de ácidos graxos da fração neutra dos ovários nos testes agudo e de recuperação.

Ácido graxo (%)	Ovários (fração neutra)									
	Agudo					Recuperação				
	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn+Al pH ácido
14:0	0.77 ±0.03	0.84 ±0.08	0.83 ±0.10	1.03 ±0.08	1.07 ±0.13	1.17 ±0.15				
15:0	0.21 ±0.01	0.20 ±0.02	0.21 ±0.01	0.26 ±0.01	0.27 ±0.01	0.27 ±0.02				
16:0	35.5 ±0.88	30.1 ±2.48	32.9 ±0.94	37.2 ±1.78	38.1 ±0.80	40.6 ±3.32				
17:0	0.36 ±0.01	0.36 ±0.02	0.38 ±0.02	0.32 ±0.02	0.34 ±0.01	0.35 ±0.03				
18:0	4.19 ±0.19	4.82 ±0.38	4.24 ±0.08	4.57 ±0.36	4.04 ±0.28	5.11 ±0.91				
ΣSFA	41.0 ±0.83	36.4 ±2.18*	38.6 ±1.07*	43.4 ±1.83	43.8 ±0.07 [#]	47.5 ±4.14 [#]				
16:1	4.12 ±0.18	3.88 ±0.16	4.32 ±0.19	4.59 ±0.32	4.52 ±0.19	4.27 ±0.43				
17:1	0.30 ±0.01	0.30 ±0.01	0.35 ±0.01	0.39 ±0.11	0.28 ±0.03	0.21 ±0.02				
18:1n9	40.2 ±0.96	40.5 ±0.82	40.0 ±1.58	34.6 ±1.19	36.5 ±0.98	34.7 ±2.66				
18:1n7	3.01 ±0.07	2.60 ±0.12	3.07 ±0.08	2.79 ±0.07	2.74 ±0.05	2.42 ±0.22				
20:1n9	0.40 ±0.04	0.53 ±0.08	0.51 ±0.06	0.39 ±0.02	0.39 ±0.04	0.34 ±0.02				
ΣMUFA	48.1 ±0.86*	47.8 ±0.74*	48.3 ±1.49*	42.8 ±1.45 [#]	44.4 ±0.96 [#]	42.0 ±3.25 [#]				
18:3n3	ND	0.37 ±0.12	0.20 ±0.02	ND	0.18 ±0.02	0.18 ±0.02				
20:5n3	0.18 ±0.04	0.44 ±0.20	0.23 ±0.05	0.76 ±0.27	0.21 ±0.04	0.25 ±0.11				
22:6n3	0.54 ±0.05	0.57 ±0.05	0.64 ±0.11	0.82 ±0.12	0.82 ±0.18	0.59 ±0.10				
ΣPUFA n3	0.85 ±0.09	1.39 ±0.32	1.07 ±0.18	1.71 ±0.27	1.21 ±0.22	1.03 ±0.22				
18:2n6c	6.86 ±0.17	10.8 ±2.26	8.03 ±0.43	7.76 ±0.55	7.23 ±0.45	6.61 ±0.57				
18:2n6t	0.22 ±0.05	0.21 ±0.07	0.11 ±0.01	0.51 ±0.13	0.16 ±0.01	ND				
18:3n6	0.31 ±0.04	0.36 ±0.03	0.40 ±0.02	0.26 ±0.02	0.33 ±0.05	0.28 ±0.03				
20:2n6	0.49 ±0.09	0.85 ±0.40	0.88 ±0.31	0.33 ±0.02	0.38 ±0.04	0.33 ±0.03				
20:3n6	0.81 ±0.04	0.83 ±0.06	1.04 ±0.10	0.86 ±0.07	0.84 ±0.06	0.71 ±0.07				
20:4n6	1.09 ±0.15	0.84 ±0.05	1.19 ±0.08	0.99 ±0.10	1.06 ±0.12	0.85 ±0.11				
22:2n6	0.14 ±0.02	0.31 ±0.13	0.16 ±0.01	0.52 ±0.32	0.11 ±0.06	0.36 ±0.26				
22:4n6	ND	ND	ND	0.64 ±0.28	0.21 ±0.06	0.12 ±0.01				
22:5n6	0.17 ±0.02	0.16 ±0.03	0.22 ±0.01	0.58 ±0.18	0.29 ±0.05	0.31 ±0.16				
ΣPUFA n6	9.97 ±0.21	14.3 ±2.19	11.9 ±0.52	11.9 ±0.72	10.4 ±0.53	9.35 ±0.97				
ΣPUFA total	10.8 ±0.29*	15.7 ±2.47*	13.0 ±0.68*	13.6 ±0.70 [#]	11.6 ±0.70 [#]	10.3 ±1.18 [#]				

CTR- grupo controle, SFA- ácidos graxos saturados, MUFA- ácidos graxos monoinsaturados, PUFA- ácidos graxos polinsaturados, PUFA n3- ácidos graxos polinsaturados omega 3, PUFA n6- ácidos graxos polinsaturados omega 6. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) (^{ab} teste agudo, ^{ab} teste recuperação).^{*#} Diferentes símbolos indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Agudo e Recuperação) e seus respectivos grupos (CTR-CTR, Mn pH ácido - Mn pH ácido, Mn+Al pH ácido - Mn+Al pH ácido). ($P<0.05$). ND-Não detectado.

Anexo 3. Porcentagem de ácidos graxos da fração neutra do músculo nos testes agudo e de recuperação.

Ácido graxo (%)	Músculo (fração neutra)									
	Agudo			Recuperação						
	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn + Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido				
14:0	0.36 ±0.01	0.44 ±0.02	0.43 ±0.05	0.62 ±0.08	0.52 ±0.04	0.64 ±0.07				
15:0	ND	0.11 ±0.01	0.11 ±0.01	ND	ND	ND				
16:0	15.6 ±0.18	16.9 ±0.28	17.0 ±0.89	19.7 ±0.99	17.8 ±0.15	18.0 ±0.52				
17:0	0.27 ±0.01	0.34 ±0.02	0.33 ±0.01	0.27 ±0.06	0.35 ±0.10	ND				
18:0	7.72 ±0.22	7.43 ±0.21	7.88 ±0.40	7.47 ±0.34	7.79 ±0.41	7.37 ±0.17				
20:0	0.27 ±0.02	0.25 ±0.01	0.28 ±0.03	0.47 ±0.09	0.44 ±0.13	0.30 ±0.06				
ΣSFA	24.2 ±0.18	25.4 ±0.51	25.9 ±0.75	28.5 ±1.21	26.8 ±0.47	26.3 ±0.68				
16:1	2.39 ±0.06	2.60 ±0.02	2.46 ±0.17	2.95 ±0.13	2.67 ±0.10	2.88 ±0.04				
17:1	0.14 ±0.30	0.18 ±0.01	0.16 ±0.01	0.39 ±0.11	1.83 0.19	0.65 ±0.14				
18:1n9	47.2 ±0.54	44.7 ±0.90	44.5 ±0.98	39.8 ±1.58	37.3 ±1.32	43.1 ±0.84				
18:1n7	2.18 ±0.04	2.11 ±0.06	2.07 ±0.06	2.11 ±0.14	2.12 ±0.04	2.11 ±0.09				
20:1n9	0.90 ±0.05	0.69 ±0.02	0.89 ±0.17	1.81 ±0.99	0.78 ±0.07	0.73 ±0.03				
ΣMUFA	52.9 ±0.48	50.3 ±0.86	50.0 ±0.94	47.1 ±1.15	43.6 ±1.35	49.4 ±0.84				
18:3n3	0.61 ±0.03	0.67 ±0.01	0.63 ±0.06	0.56 ±0.09	0.50 ±0.07	0.55 ±0.03				
20:3n3	ND	0.37 ±0.18	ND	ND	ND	ND				
20:5n3	0.31 ±0.03	0.39 ±0.13	0.24 ±0.05	0.92 ±0.21	3.60 ±0.42	1.23 ±0.19				
22:5n3	0.13 ±0.01	0.24 ±0.12	ND	0.32 ±0.08	0.44 0.11	ND				
22:6n3	0.44 ±0.06	0.32 ±0.05	0.57 ±0.20	1.12 ±0.36	1.75 ±0.20	0.82 ±0.11				
ΣPUFA n3	1.46 ±0.08	1.77 ±0.38	1.44 ±0.21	1.70 ±0.23	4.46 ±0.43	1.79 ±0.20				
18:2n6c	18.1 ±0.50	19.5 ±0.45	19.4 ±0.78	15.4 ±0.95	13.5 ±0.29	17.1 ±0.50				
18:2n6t	0.16 ±0.02	0.37 ±0.22	0.18 ±0.04	0.57 ±0.21	ND	ND				
18:3n6	0.14 ±0.02	0.13 ±0.01	0.17 ±0.03	0.33 ±0.10	0.31 ±0.02	0.33 ±0.01				
20:2n6	0.68 ±0.08	0.52 ±0.02	0.63 ±0.11	0.86 ±0.32	1.23 ±0.70	0.52 ±0.02				
20:3n6	0.85 ±0.04	0.75 ±0.05	0.87 ±0.11	0.85 ±0.07	0.93 ±0.07	0.77 ±0.06				
20:4n6	1.13 ±0.06	0.93 ±0.09	1.08 ±0.16	1.37 ±0.25	2.33 ±0.59	1.14 ±0.07				
22:2n6	0.16 ±0.01	0.27 ±0.12	0.15 ±0.01	0.46 ±0.15	2.44 ±0.92	0.64 ±0.05				
22:5n6	0.17 ±0.01	0.21 ±0.09	0.26 ±0.01	2.19 ±1.20	3.00 ±0.34	1.30 ±0.20				
ΣPUFA n6	21.3 ±0.57	22.4 ±0.82	22.4 ±0.91	21.5 ±1.01	23.3 ±0.88	21.5 ±0.84				
ΣPUFA total	22.8 ±0.59	24.2 ±1.17	23.9 ±1.06	24.3 ±1.20	29.5 ±1.21	24.1 ±0.99				

CTR- grupo controle, SFA- ácidos graxos saturados, MUFA- ácidos graxos monoinsaturados, PUFA- ácidos graxos polinsaturados, PUFA n3- ácidos graxos polinsaturados omega 3, PUFA n6- ácidos graxos polinsaturados omega 6. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) (^{ab} teste agudo, ^{ab'} teste recuperação).^{##} Diferentes símbolos indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Agudo e Recuperação) e seus respectivos grupos (CTR-CTR, Mn pH ácido - Mn pH ácido, Mn+Al pH ácido - Mn+Al pH ácido). ($P<0.05$). ND-Não detectado.

Anexo 4. Porcentagem de ácidos graxos da fração polar do fígado nos testes agudo e de recuperação.

Ácido graxo (%)	Fígado (fração polar)								
	Agudo			Recuperação					
	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido
14:0	0.18 ±0.01	0.24 ±0.03	0.23 ±0.03	0.16 ±0.01	0.16 ±0.01	0.16 ±0.02			
15:0	0.19 ±0.02	ND	0.27 ±0.06	ND	ND	ND			
16:0	9.41 ±0.10	8.47 ±0.50	8.57 ±0.57	12.9 ±1.05	10.6 ±0.44	10.6 ±0.55			
17:0	0.49 ±0.01	0.59 ±0.06	0.64 ±0.04	0.20 ±0.03	0.27 ±0.08	0.21 ±0.01			
18:0	19.0 ±0.44	19.9 ±0.43	19.5 ±0.58	19.5 ±1.42	19.0 ±0.76	18.8 ±1.71			
20:0	0.14 ±0.01	0.18 ±0.02	0.36 ±0.02	ND	ND	ND			
21:0	0.10 ±0.01	0.13 ±0.01	0.15 ±0.01	0.16 ±0.01	0.16 ±0.01	ND			
22:0	0.30 ±0.03	0.30 ±0.03	0.27 ±0.04	0.23 ±0.02	0.24 ±0.03	0.20 ±0.06			
24:0	0.31 ±0.02	0.35 ±0.05	0.32 ±0.04	0.23 ±0.02	0.25 ±0.03	0.17 ±0.01			
ΣSFA	29.8 ±0.53*	30.1 ±0.51	30.2 ±0.55	33.4 ±1.81 [#]	30.8 ±0.63	30.2 ±2.23			
16:1	0.59 ±0.02	0.58 ±0.07	0.56 ±0.08	0.76 ±0.04	0.69 ±0.03	0.80 ±0.07			
18:1n9	14.9 ±0.39	13.5 ±0.98	10.7 ±0.89	15.4 ±0.44	13.0 ±1.12	14.2 ±1.32			
18:1n7	1.25 ±0.04	1.16 ±0.04	1.14 ±0.05	1.51 ±0.09	1.48 ±0.08	1.19 ±0.06			
20:1n9	0.35 ±0.04	0.36 ±0.02	0.50 ±0.03	0.41 ±0.05	0.40 ±0.06	0.26 ±0.02			
24:1	0.41 ±0.04	0.42 ±0.04	0.47 ±0.07	0.37 ±0.07	0.36 ±0.03	0.38 ±0.12			
ΣMUFA	17.5 ±0.43	16.0 ±1.00	13.4 ±0.92*	18.5 ±0.48	15.9 ±1.12	16.9 ±1.32 [#]			
18:3n3	0.16 ±0.04	0.17 ±0.02	0.26 ±0.04	0.23 ±0.03	0.17 ±0.02	0.14 ±0.02			
20:3n3	ND	0.15 ±0.02	0.31 ±0.04	ND	ND	ND			
20:5n3	0.91 ±0.22	0.93 ±0.22	1.93 ±0.69	1.38 ±0.54	1.03 ±0.27	2.94 ±2.54			
22:4n3	0.58 ±0.16	0.35 ±0.10	0.69 ±0.41	ND	0.41 ±0.21	0.18 ±0.05			
22:5n3	0.41 ±0.05	0.74 ±0.13	0.66 ±0.15	0.77 ±0.11	0.71 ±0.07	2.21 ±1.66			
22:6n3	13.6 ±0.58	16.4 ±1.10	18.2 ±2.41	16.0 ±0.43	16.8 ±0.54	14.3 ±1.49			
ΣPUFA n3	15.6 ±0.55	18.7 ±1.36	22.0 ±2.33	18.4 ±0.98	18.9 ±0.92	19.1 ±2.93			
18:2n6c	3.11 ±0.14	3.60 ±0.32	3.63 ±0.37	4.01 ±0.39	4.09 ±0.46	3.38 ±0.65			
18:2n6t	0.33 ±0.13	0.29 ±0.04	1.82 ±0.72	0.29 ±0.15	0.23 ±0.09	0.15 ±0.02			
18:3n6	0.33 ±0.05	0.25 ±0.04	0.40 ±0.01	0.29 ±0.02	0.27 ±0.03	0.20 ±0.04			
20:2n6	0.99 ±0.03	1.40 ±0.15	1.43 ±0.26	0.14 ±0.02	0.14 ±0.01	0.78 ±0.10			
20:3n6	3.46 ±0.17	3.62 ±0.15	2.63 ±0.19	2.97 ±0.11	3.29 ±0.32	2.78 ±0.52			
20:4n6	18.8 ±0.48	19.5 ±0.80	15.8 ±0.74	15.5 ±0.34	19.2 ±0.49	17.8 ±1.85			
22:2n6	0.67 ±0.21	0.36 ±0.06	1.01 ±0.54	0.54 ±0.38	0.50 ±0.24	0.40 ±0.07			
22:4n6	3.21 ±0.17	2.75 ±0.22	2.15 ±0.29	2.41 ±0.26	2.72 ±0.29	2.93 ±0.22			
22:5n6	3.26 ±0.08	3.95 ±0.44	5.37 ±0.30	3.40 ±0.29	3.78 ±0.21	3.41 ±0.70			
ΣPUFA n6	34.3 ±0.31	35.0 ±1.07	34.2 ±1.21	29.5 ±0.46	34.2 ±0.33	33.6 ±0.77			
ΣPUFA total	49.8 ±0.47*	53.8 ±1.09	56.3 ±1.33	48.4 ±1.42 [#]	53.6 ±1.12	53.0 ±2.76			

CTR- grupo controle, SFA- ácidos graxos saturados, MUFA- ácidos graxos monoinsaturados, PUFA- ácidos graxos polinsaturados, PUFA n3- ácidos graxos polinsaturados omega 3, PUFA n6- ácidos graxos polinsaturados omega 6. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) (^{ab} teste agudo, ^{ab} teste recuperação).^{##} Diferentes símbolos indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Agudo e Recuperação) e seus respectivos grupos (CTR-CTR, Mn pH ácido - Mn pH ácido, Mn+Al pH ácido - Mn+Al pH ácido). ($P<0.05$). ND-Não detectado.

Anexo 5. Porcentagem de ácidos graxos da fração polar dos ovários nos testes agudo e de recuperação.

Ácido graxo (%)	Ovário (fração polar)								
	Agudo			Recuperação					
	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido
14:0	0.14 ±0.01	0.16 ±0.01	0.13 ±0.01	0.27 ±0.04	0.15 ±0.01	0.20 ±0.01	0.16 ±0.01	0.11 ±0.01	0.11 ±0.01
15:0	ND	0.30 ±0.02	ND	0.16 ±0.01	0.11 ±0.01	0.11 ±0.01	0.16 ±0.01	0.11 ±0.01	0.11 ±0.01
16:0	14.5 ±0.30	12.7 ±0.63	11.7 ±0.74	22.7 ±2.21 ^{a'}	14.9 ±1.09 ^{b'}	16.9 ±0.15 ^{b'}	22.7 ±2.21 ^{a'}	14.9 ±1.09 ^{b'}	16.9 ±0.15 ^{b'}
17:0	0.26 ±0.01	0.26 ±0.01	0.25 ±0.02	0.26 ±0.03	0.20 ±0.01	0.20 ±0.02	0.26 ±0.03	0.20 ±0.01	0.20 ±0.02
18:0	13.2 ±0.56	12.5 ±0.28	12.7 ±0.52	14.7 ±1.43	12.9 ±1.18	10.9 ±0.39	14.7 ±1.43	12.9 ±1.18	10.9 ±0.39
ΣSFA	28.2 ±0.40 [*]	25.9 ±0.69	25.0 ±0.41	38.2 ±3.56 ^{a' #}	28.3 ±0.48 ^{b'}	28.4 ±0.48 ^{b'}	38.2 ±3.56 ^{a' #}	28.3 ±0.48 ^{b'}	28.4 ±0.48 ^{b'}
16:1	1.21 ±0.04	1.08 ±0.05	0.94 ±0.09	2.11 ±0.22	1.28 ±0.16	1.57 ±0.06	2.11 ±0.22	1.28 ±0.16	1.57 ±0.06
17:1	0.14 ±0.01	0.35 ±0.06	ND	0.12 ±0.01	ND	ND	0.12 ±0.01	ND	ND
18:1n9	21.2 ±0.70	19.8 ±0.51	18.9 ±1.05	28.9 ±3.01 ^{a'}	19.4 ±1.48 ^{b'}	21.7 ±0.65 ^{ab'}	28.9 ±3.01 ^{a'}	19.4 ±1.48 ^{b'}	21.7 ±0.65 ^{ab'}
18:1n7	1.50 ±0.04	1.32 ±0.04	1.34 ±0.05	1.91 ±0.15	1.49 ±0.06	1.37 ±0.03	1.91 ±0.15	1.49 ±0.06	1.37 ±0.03
20:1n9	0.40 ±0.01	0.41 ±0.01	0.44 ±0.03	0.43 ±0.04	0.42 ±0.05	0.36 ±0.01	0.43 ±0.04	0.42 ±0.05	0.36 ±0.01
24:1	0.18 ±0.02	0.20 ±0.01	0.18 ±0.01	0.21 ±0.03	0.15 ±0.01	0.15 ±0.01	0.21 ±0.03	0.15 ±0.01	0.15 ±0.01
ΣMUFA	24.6 ±0.66 [*]	23.1 ±0.51	21.8 ±1.13 [*]	33.7 ±3.39 ^{a' #}	22.7 ±1.57 ^{b'}	25.1 ±0.67 ^{ab' #}	33.7 ±3.39 ^{a' #}	22.7 ±1.57 ^{b'}	25.1 ±0.67 ^{ab' #}
18:3n3	0.11 ±0.01	0.14 ±0.01	0.16 ±0.01	0.18 ±0.04	0.13 ±0.01	0.13 ±0.01	0.18 ±0.04	0.13 ±0.01	0.13 ±0.01
20:5n3	1.27 ±0.19	1.11 ±0.15	1.14 ±0.22	0.72 ±0.21	0.97 ±0.13	0.81 ±0.04	0.72 ±0.21	0.97 ±0.13	0.81 ±0.04
22:4n3	0.50 ±0.16	2.08 ±1.46	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:5n3	0.49 ±0.03^a	0.78 ±0.05^b	0.73 ±0.05^b	0.50 ±0.12	0.69 ±0.08	0.63 ±0.03	0.50 ±0.12	0.69 ±0.08	0.63 ±0.03
22:6n3	14.5 ±0.53	17.2 ±0.88	17.3 ±1.16	7.60 ±3.18 ^{a'}	17.7 ±1.71 ^{b'}	16.7 ±0.41 ^{b'}	7.60 ±3.18 ^{a'}	17.7 ±1.71 ^{b'}	16.7 ±0.41 ^{b'}
ΣPUFA n3	16.7 ±0.28	19.9 ±1.12	19.3 ±1.27	8.89 ±3.37 ^{a'}	19.5 ±1.83 ^{b'}	18.2 ±0.39 ^{b'}	8.89 ±3.37 ^{a'}	19.5 ±1.83 ^{b'}	18.2 ±0.39 ^{b'}
18:2n6c	3.67 ±0.14	4.08 ±0.31	3.94 ±0.35	4.87 ±0.91	4.04 ±0.26	3.83 ±0.21	4.87 ±0.91	4.04 ±0.26	3.83 ±0.21
18:2n6t	0.41 ±0.17	0.20 ±0.07	0.19 ±0.02	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18:3n6	0.15 ±0.02	0.12 ±0.01	0.13 ±0.01	0.15 ±0.01	0.21 ±0.03	0.19 ±0.01	0.15 ±0.01	0.21 ±0.03	0.19 ±0.01
20:2n6	1.22 ±0.16	1.44 ±0.19	1.33 ±0.10	0.76 ±0.04	0.99 ±0.07	0.84 ±0.04	0.76 ±0.04	0.99 ±0.07	0.84 ±0.04
20:3n6	3.59 ±0.10	3.80 ±0.18	3.98 ±0.26	2.64 ±0.37	3.62 ±0.12	3.25 ±0.10	2.64 ±0.37	3.62 ±0.12	3.25 ±0.10
20:4n6	14.0 ±0.28	14.0 ±0.64	16.0 ±0.79	7.07 ±1.94 ^{a'}	13.9 ±0.69 ^{b'}	12.4 ±0.46 ^{b'}	7.07 ±1.94 ^{a'}	13.9 ±0.69 ^{b'}	12.4 ±0.46 ^{b'}
22:2n6	0.63 ±0.24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:4n6	2.92 ±0.30	3.35 ±0.19	2.77 ±0.39	1.83 ±0.55	3.17 ±0.18	3.53 ±0.20	1.83 ±0.55	3.17 ±0.18	3.53 ±0.20
22:5n6	3.83 ±0.21	4.47 ±0.62	5.46 ±0.60	1.89 ±0.61	3.98 ±0.22	3.99 ±0.26	1.89 ±0.61	3.98 ±0.22	3.99 ±0.26
ΣPUFA n6	30.3 ±0.48	30.9 ±1.59	33.8 ±1.57	19.1 ±3.34 ^{a'}	29.3 ±0.99 ^{b'}	28.1 ±0.36 ^{b'}	19.1 ±3.34 ^{a'}	29.3 ±0.99 ^{b'}	28.1 ±0.36 ^{b'}
ΣPUFA total	47.0 ±0.53^{a*}	50.9 ±1.17^{ab}	53.1 ±1.24^b	28.0 ±6.63 ^{a' #}	48.9 ±1.56 ^{b'}	46.3 ±0.64 ^{b'}	28.0 ±6.63 ^{a' #}	48.9 ±1.56 ^{b'}	46.3 ±0.64 ^{b'}

CTR- grupo controle, SFA- ácidos graxos saturados, MUFA- ácidos graxos monoinsaturados, PUFA- ácidos graxos polinsaturados, PUFA n3- ácidos graxos polinsaturados omega 3, PUFA n6- ácidos graxos polinsaturados omega 6. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) (^{ab} teste agudo, ^{ab'} teste recuperação).^{##} Diferentes símbolos indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Agudo e Recuperação) e seus respectivos grupos (CTR-CTR, Mn pH ácido - Mn pH ácido, Mn+Al pH ácido - Mn+Al pH ácido). ($P<0.05$). ND-Não detectado.

Anexo 6. Porcentagem de ácidos graxos da fração polar do músculo nos testes agudo e de recuperação.

Ácido graxo (%)	Músculo (fração polar)									
	Agudo					Recuperação				
	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn +Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn +Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido		
14:0	0.29 ±0.03	0.47 ±0.07	0.30 ±0.04	0.26 ±0.07	0.25 ±0.05	0.26 ±0.07	0.25 ±0.05	0.26 ±0.01		
15:0	0.28 ±0.05	0.50 ±0.06	0.43 ±0.09	ND	ND	ND	ND	ND		
16:0	11.3 ±0.43	12.5 ±0.42	11.1 ±0.28	17.0 ±1.45	12.5 ±0.63	12.5 ±0.63	12.5 ±0.63	13.2 ±1.04		
17:0	0.59 ±0.03	0.92 ±0.14	0.66 ±0.08	ND	ND	ND	ND	ND		
18:0	14.0 ±0.48	12.5 ±0.47	13.1 ±0.41	12.6 ±1.03	13.3 ±0.91	13.3 ±0.91	13.3 ±0.91	11.5 ±0.61		
20:0	0.20 ±0.01	0.25 ±0.01	0.24 ±0.02	0.14 ±0.02	0.16 ±0.01	0.16 ±0.01	0.16 ±0.01	0.18 ±0.03		
21:0	0.22 ±0.02	0.37 ±0.05	0.27 ±0.03	0.20 ±0.01	ND	ND	ND	ND		
22:0	0.29 ±0.02	0.65 ±0.31	0.30 ±0.03	ND	ND	ND	ND	ND		
24:0	0.34 ±0.04	0.40 ±0.02	0.40 ±0.03	ND	0.25 ±0.03	0.25 ±0.03	0.25 ±0.03	0.26 ±0.02		
ΣSFA	27.4 ±3.66	28.3 ±0.67*	26.8 ±0.42	30.2 ±1.65	26.5 ±0.45#	26.5 ±0.45#	26.5 ±0.45#	25.4 ±1.58		
16:1	0.62 ±0.06	0.77 ±0.08	0.53 ±0.06	0.87 ±0.13	0.86 ±0.19	0.86 ±0.19	0.86 ±0.19	0.77 ±0.06		
17:1	0.55 ±0.19	0.83 ±0.34	0.91 ±0.24	1.29 ±0.23	1.56 ±0.19	1.56 ±0.19	1.56 ±0.19	1.41 ±0.06		
18:1n9	12.7 ±1.44	13.8 ±1.09	10.2 ±0.94	14.9 ±0.77	14.2 ±3.27	14.2 ±3.27	14.2 ±3.27	13.5 ±1.59		
18:1n7	1.67 ±0.07	1.68 ±0.04	1.45 ±0.11	1.87 ±0.15	2.04 ±0.14	2.04 ±0.14	2.04 ±0.14	1.70 ±0.10		
20:1n9	0.52 ±0.02	0.45 ±0.04	0.45 ±0.06	0.43 ±0.02	0.47 ±0.06	0.47 ±0.06	0.47 ±0.06	0.38 ±0.04		
24:1	0.46 ±0.01	0.45 ±0.02	0.45 ±0.04	0.29 ±0.03	0.31 ±0.01	0.31 ±0.01	0.31 ±0.01	0.59 ±0.14		
ΣMUFA	16.4 ±1.52	17.8 ±1.15	13.8 ±1.25*	19.4 ±0.89	19.5 ±3.38	19.5 ±3.38	19.5 ±3.38	18.3 ±1.68#		
18:3n3	0.22 ±0.01	0.34 ±0.03	0.24 ±0.04	0.23 ±0.02	0.26 ±0.07	0.26 ±0.07	0.26 ±0.07	0.21 ±0.01		
20:3n3	0.18 ±0.02	1.23 ±0.65	0.22 ±0.02	ND	ND	ND	ND	ND		
20:5n3	1.64 ±0.59	1.39 ±0.26	1.19 ±0.30	1.12 ±0.24	1.02 ±0.14	1.02 ±0.14	1.02 ±0.14	4.18 ±2.58		
22:4n3	1.10 ±0.05	0.65 ±0.21	0.38 ±0.12	ND	0.37 ±0.07	0.37 ±0.07	0.37 ±0.07	0.23 ±0.06		
22:5n3	0.54 ±0.01	0.56 ±0.11	0.61 ±0.03	0.48 ±0.08	0.47 ±0.06	0.47 ±0.06	0.47 ±0.06	0.41 ±0.04		
22:6n3	17.0 ±0.98	17.8 ±1.92	21.6 ±1.89	18.9 ±2.06	17.4 ±2.77	17.4 ±2.77	17.4 ±2.77	19.3 ±2.88		
ΣPUFA n3	20.1 ±1.06	21.9 ±1.31	24.2 ±1.73	20.7 ±2.06	19.5 ±2.53	19.5 ±2.53	19.5 ±2.53	24.3 ±2.39		
18:2n6c	8.33 ±0.38	8.91 ±0.56	7.30 ±0.75	10.2 ±0.47	10.3 ±1.32	10.3 ±1.32	10.3 ±1.32	7.24 ±0.84		
18:2n6t	0.54 ±0.26	0.50 ±0.16	0.20 ±0.03	ND	ND	ND	ND	ND		
18:3n6	0.47 ±0.05	1.23 ±0.42	0.36 ±0.03	0.33 ±0.01	0.31 ±0.04	0.31 ±0.04	0.31 ±0.04	0.36 ±0.04		
20:2n6	1.02 ±0.08	1.16 ±0.13	0.96 ±0.03	0.91 ±0.04	0.89 ±0.04	0.89 ±0.04	0.89 ±0.04	0.70 ±0.05		
20:3n6	2.39 ±0.17	2.25 ±0.10	2.41 ±0.12	2.52 ±0.09	2.42 ±0.17	2.42 ±0.17	2.42 ±0.17	1.88 ±0.09		
20:4n6	13.6 ±0.54	9.46 ±0.56	14.0 ±1.06	13.3 ±0.75	12.5 ±1.57	12.5 ±1.57	12.5 ±1.57	10.9 ±0.27		
22:2n6	1.03 ±0.61	0.94 ±0.33	0.45 ±0.18	0.62 ±0.28	0.42 ±0.10	0.42 ±0.10	0.42 ±0.10	3.30 ±2.28		
22:4n6	1.66 ±0.04	1.48 ±0.15	1.41 ±0.08	ND	1.40 ±0.23	1.40 ±0.23	1.40 ±0.23	1.34 ±0.06		
22:5n6	7.12 ±0.58	5.95 ±0.74	7.89 ±0.46	1.74 ±0.36	5.94 ±0.85	5.94 ±0.85	5.94 ±0.85	6.03 ±0.27		
ΣPUFA n6	35.9 ±0.94	31.8 ±0.26	35.0 ±1.34	29.5 ±0.90	34.2 ±2.08	34.2 ±2.08	34.2 ±2.08	31.8 ±1.84		
ΣPUFA total	56.1 ±1.88*	53.7 ±1.51	59.3 ±1.31	50.2 ±2.16#	53.8 ±3.11	53.8 ±3.11	53.8 ±3.11	56.1 ±2.73		

CTR- grupo controle, SFA- ácidos graxos saturados, MUFA- ácidos graxos monoinsaturados, PUFA- ácidos graxos polinsaturados, PUFA n3- ácidos graxos polinsaturados omega 3, PUFA n6- ácidos graxos polinsaturados omega 6. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) (^{ab} teste agudo, ^{ab} teste recuperação).^{##} Diferentes símbolos indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Agudo e Recuperação) e seus respectivos grupos (CTR-CTR, Mn pH ácido - Mn pH ácido, Mn+Al pH ácido - Mn+Al pH ácido). ($P<0.05$). ND-Não detectado.

Anexo 7. Porcentagem de ácidos graxos do plasma nos testes agudo e de recuperação.

Ácido graxo (%)	Plasma									
	Agudo			Recuperação						
	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido	CTR pH neutro	Mn pH ácido	Mn+Al pH ácido				
14:0	0.25 ±0.02	0.31 ±0.03	0.25 ±0.03	0.45 ±0.11	0.56 ±0.05	0.67 ±0.11				
15:0	0.12 ±0.01	0.22 ±0.07	0.11 ±0.01	0.20 ±0.03	0.26 ±0.01	0.24 ±0.02				
16:0	19.5 ±0.52	21.0 ±0.51	19.6 ±0.85	24.9 ±1.80	30.2 ±0.74	26.6 ±1.33				
17:0	0.43 ±0.03	0.41 ±0.03	0.48 ±0.04	ND	0.33 ±0.06	ND ±0.23				
18:0	9.78 ±0.34	9.88 ±0.27	10.1 ±0.49	9.66 ±0.43	10.8 ±0.51	8.95 ±1.26				
20:0	0.21 ±0.08	0.25 ±0.10	0.26 ±0.04	0.15 ±0.01	0.12 ±0.01	ND ±0.04				
21:0	0.14 ±0.01	ND	0.16 ±0.03	0.21 ±0.07	0.13 ±0.01	0.32 ±0.15				
22:0	0.19 ±0.05	0.12 ±0.01	0.19 ±0.02	ND	ND	ND				
24:0	0.14 ±0.01	0.14 ±0.01	0.18 ±0.02	0.15 ±0.03	0.15 ±0.01	0.25 ±0.11				
ΣSFA	30.5 ±0.55*	32.0 ±0.71*	31.2 ±1.07*	35.7 ±2.07 [#]	42.5 ±1.40 [#]	36.8 ±2.72 [#]				
16:1	1.62 ±0.10	1.93 ±0.04	1.47 ±0.17	2.17 ±0.20	2.57 ±0.11	2.78 ±0.14				
17:1	0.18 ±0.02	0.15 ±0.01	0.18 ±0.01	ND	ND	ND				
18:1n9	28.0 ±0.61	29.3 ±1.29	27.6 ±1.35	26.2 ±1.22	30.3 ±0.65	28.7 ±1.24				
18:1n7	1.91 ±0.03	1.87 ±0.04	1.79 ±0.06	1.82 ±0.05	2.15 ±0.10	1.85 ±0.09				
20:1n9	0.38 ±0.05	0.46 ±0.06	0.65 ±0.06	0.48 ±0.01	0.58 ±0.10	0.39 ±0.03				
24:1	0.36 ±0.03	0.31 ±0.02	0.45 ±0.05	0.52 ±0.15	0.26 ±0.02	0.32 ±0.06				
ΣMUFA	32.4 ±0.71	33.9 ±1.37	32.2 ±1.67	31.2 ±1.16	35.9 ±0.86	34.0 ±1.38				
18:3n3	0.17 ±0.01	0.21 ±0.03	0.23 ±0.01	0.28 ±0.04	0.19 ±0.03	0.17 ±0.01				
20:5n3	1.19 ±0.36	0.86 ±0.15	0.87 ±0.13	1.42 ±0.30 ^{a'}	0.49 ±0.05 ^{b'}	1.06 ±0.28 ^{ab'}				
22:4n3	0.72 ±0.31	ND	0.20 ±0.07	0.49 ±0.15	ND	ND				
22:5n3	0.35 ±0.01	0.46 ±0.05	0.51 ±0.07	0.49 ±0.07	0.30 ±0.06	1.01 ±0.39				
22:6n3	9.91 ±0.28	9.85 ±0.80	10.4 ±0.58	8.82 ±0.91	4.35 ±1.16	7.44 ±1.34				
ΣPUFA n3	11.9 ±0.33	11.3 ±1.05	12.2 ±0.84	11.5 ±1.25 ^{a'}	5.35 ±1.24 ^{b'}	9.17 ±1.37 ^{ab'}				
18:2n6c	4.97 ±0.28	5.58 ±0.52	5.66 ±0.23	5.60 ±0.17	5.94 ±0.40	4.96 ±0.40				
18:2n6t	0.64 ±0.03	0.18 ±0.02	0.29 ±0.08	0.39 ±0.11	0.30 ±0.12	0.24 ±0.03				
18:3n6	0.37 ±0.08	0.26 ±0.06	0.38 ±0.10	0.45 ±0.15	0.23 ±0.02	0.32 ±0.10				
20:2n6	1.13 ±0.35	1.27 ±0.47	0.88 ±0.04	0.75 ±0.06	0.78 ±0.10	0.62 ±0.06				
20:3n6	2.41 ±0.27	2.71 ±0.20	2.64 ±0.10	2.28 ±0.21	1.87 ±0.16	1.98 ±0.28				
20:4n6	10.4 ±0.25	8.60 ±0.57	9.38 ±0.78	7.78 ±0.64	4.98 ±0.88	7.73 ±1.01				
22:2n6	0.73 ±0.02	0.23 ±0.04	0.30 ±0.09	0.64 ±0.20	0.11 ±0.01	0.96 ±0.25				
22:4n6	2.11 ±0.20	1.80 ±0.13	1.82 ±0.17	1.47 ±0.09	0.93 ±0.17	1.60 ±0.29				
22:5n6	2.66 ±0.17	2.08 ±0.37	3.02 ±0.29	2.01 ±0.23	0.98 ±0.17	1.98 ±0.32				
ΣPUFA n6	25.0 ±0.41	22.5 ±1.34	24.3 ±1.52	21.4 ±1.28	16.1 ±1.04	19.9 ±1.61				
ΣPUFA total	36.9 ±0.63*	33.9 ±1.97*	36.5 ±2.11*	32.9 ±2.50 ^{a'#}	21.4 ±2.24 ^{b'#}	29.1 ±2.86 ^{ab'#}				

CTR- grupo controle, SFA- ácidos graxos saturados, MUFA- ácidos graxos monoinsaturados, PUFA- ácidos graxos polinsaturados, PUFA n3- ácidos graxos polinsaturados omega 3, PUFA n6- ácidos graxos polinsaturados omega 6. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (CTR pH neutro, Mn pH ácido e Mn+Al pH ácido) (^{ab} teste agudo, ^{ab'} teste recuperação).^{##} Diferentes símbolos indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Agudo e Recuperação) e seus respectivos grupos (CTR-CTR, Mn pH ácido - Mn pH ácido, Mn+Al pH ácido - Mn+Al pH ácido). ($P<0.05$). ND-Não detectado.

Capítulo 5

Discussão Geral e Conclusões

Discussão Geral

Entender e prever como os organismos respondem às mudanças ambientais é um desafio constante, devido às mudanças nos ecossistemas e a crescente ameaça da atividade humana. Efeitos das perturbações antrópicas são amplos, e podem afetar todos os níveis de organização biológica (Wikelsky e Cooke, 2006), gerando, por exemplo, disfunções metabólicas causadas por poluentes aquáticos, consequências de desregulação em diferentes níveis fisiológicos (Haller et al., 1996; Alanärä et al., 1998; Sloman et al., 2000).

Estudar os efeitos nas brânquias é essencial, pois estas são alvo fácil para as substâncias presentes na água por terem uma relação direta entre o animal e o ambiente, apresentando uma grande superfície de contato que a torna responsável por inúmeras funções vitais nestes animais. Dentre as funções branquiais está o controle iônico e osmorregulatório responsável por manter a concentração iônica e osmótica em equilíbrio; e os contaminantes podem interferir neste processo por alterar o tecido branquial e/ou o fluxo através das lamelas (Heath, 1995). No presente trabalho, o Al e o Mn promoveram alterações em diferentes etapas do processo, que podem diretamente influenciar neste equilíbrio afetando muitas outras funções. Ambos os metais isoladamente promoveram diminuição da atividade de bomba NKA e diminuição da quantidade de CC nas lamelas, principais responsáveis pela regulação iônica (Hirose et al., 2003) e mesmo após 96 horas de exposição na ausência dos metais, as brânquias não recuperam estas CC lamelares perdidas.

Segundo Monette e McCormick (2008) as CC são os principais sítios de acúmulo de Al e consequentemente a morte destas células facilitaria a eliminação do metal do órgão. Na fase de recuperação as quantidades de CC aumentaram, mas apenas nos filamentos branquiais, fato que pode estar associado a localização destas células mais próximas à corrente sanguínea, facilitando a tomada de íons (Dang et al., 2000) e com isso restabelecem a atividade da bomba mas em níveis superiores aos anteriores. Além disso, o Al promoveu lipoperoxidação nos fosfolipídios de membrana, função que não é retomada em 96 horas de água limpa o que pode acarretar em danos ainda maiores uma vez que uma membrana debilitada altera total ou parcialmente sua função afetando diretamente o metabolismo (Hogg e Kalyanaraman, 1998).

No entanto, no ambiente aquático há a presença de mais de uma substância, e desta forma, os efeitos dos contaminantes podem, de alguma maneira, ser inibidos ou

potencializados (Zagatto e Bertoletti, 2006). O propósito da interação entre Mn e o Al neste trabalho foi para realmente verificar qual o comportamento e os efeitos causados por ambos nos mesmos parâmetros observados na exposição isolada e verificou-se que nas brânquias os resultados obtidos diferenciaram muito. Em alguns parâmetros o Mn tem efeito de potenciação ao Al, em outros de antagonismo e em alguns não exerce efeitos algum, resultados também observados com outros metais por Xu et al., (2011) o qual atribuiu este comportamento à interação dos íons no meio, ao tempo de exposição e a fatores abióticos envolvidos. O curioso foi notar efeitos dos dois metais juntos (adição) na dinâmica de fosfolipídios da membrana branquial. Um aumento na proporção de STA e MUFA e diminuição de PUFA nos animais expostos ao Al e Mn juntos pode ter possibilitado uma alteração na fluidez de membrana (Hazel e Willians, 1990) mas não foram observadas mudanças na atividade da bomba e alterações na quantidade de CC, e estes efeitos podem ter ocorrido em decorrência dos efeitos antagônicos exercidos pela combinação do Mn e Al.

O período de recuperação para este tecido possibilitou verificar a habilidade deste órgão e a plasticidade do organismo em responder a fatores externos. Se houve danos morfológicos nas brânquias, causados pelos metais, outras alternativas, como o aumento das CC nos filamentos e mudanças na fluidez de membrana parecem ter sido fundamentais para sobrevivência do animal mas não para evitar danos em outras funções no organismo. Segundo Exley et al. (1991) os efeitos dos metais sobre as brânquias se resumem em aumento da barreira de difusão dos gases respiratórios devido a excessiva produção de muco para proteção do órgão, lesão do epitélio pela precipitação do metal e efeitos histopatológicos que podem afetar o bom funcionamento do órgão (Camargo et al., 2009) e consequentemente de outras funções que dependam dele.

Deficiências nas trocas gasosas, nas concentrações iônicas e osmóticas e a presença dos metais no organismo, transportado pela corrente sanguínea e distribuídos para vários órgãos, podem desencadear respostas a um estado de estresse. Com a percepção de um estado alterado respostas neuroendócrinas são desencadeadas e dão origem a um série de reações que envolvem ajustes bioquímicos e fisiológicos, os quais requerem uma alta demanda energética para o organismo restabelecer a homeostase (Iwama et al., 2006). Geralmente peixes utilizam a glicose como energia em condições de estresse procurando manter os níveis de glicogênio hepático através da gliconeogênese e para tanto o organismo pode mobilizar substratos energéticos, tais

como aminoácidos para suprir a essa demanda energética (Adams et al., 1990; Mommsen et al., 1999). Os metais em ação isolada, promoveram alterações nos substratos metabólicos principalmente no fígado, no metabolismo lipídico e protéico, e nos ovários no metabolismo protéico. E ainda, quando estes metais estavam em associação, os efeitos no fígado e no ovário foram potencializados promovendo diminuição acentuada de proteínas nestes tecidos, evidenciando a toxicidade do Mn, neste caso.

Outros autores também observaram que muitos agentes tóxicos alteram os níveis dos substratos metabólicos trazendo implicações para diversas funções em peixes; o armazenamento ou mobilização de substratos energéticos tais como glicose, glicogênio, lactato, lipídios, proteínas podem ser alterados pela exposição aos metais (Sreedevi et al., 1992; Ricard et al., 1998; Barnhoorn et al., 1999; De Smet e Blust., 2001; Vieira et al., 2013). Desta forma, em determinadas situações quando a energia é escassa os mecanismos fisiológicos tendem a favorecer processos que assegurem a sobrevivência, desviando energia de processos que demandam altas quantidades de energia como crescimento e reprodução (Schneider, 2004).

O estresse pode afetar a reprodução de várias maneiras dependendo do ciclo de vida, da severidade e duração do agente estressor podendo acelerar ou inibir a reprodução (Gowaty et al., 2007). Além disso os estressores encontrados durante fases de desenvolvimento podem surtir efeitos nas fases posteriores. Jalabert (2008) relatou que peixes nas fases reprodutivas são bem vulneráveis aos efeitos de estressores principalmente durante os períodos de maturação e desova, devido ao redirecionamento dos recursos energéticos associados à resposta ao estresse (Schreck e Li, 1991). Na fase de vitelogênese e maturação final, os ovários são importantes órgãos de armazenamento de proteínas (Lubzens et al., 2010) e a estratégia de desova de cada espécie irá influenciar a resposta do animal em um ambiente desfavorável e ainda, o sucesso reprodutivo de uma população depende principalmente, além do sucesso da desova, da taxa de fertilização e qualidade dos ovos (Vazzoler e Agostinho, 1991).

Para a espécie *A. bimaculatus* o fato de apresentar múltiplas desovas mas, restritas a um único período do ano (Novembro a Fevereiro) (Agostinho et al., 1984), parece ter sido determinante na tática adotada pelas fêmeas frente às condições ambientais adversas possíveis de se notar neste estudo. Foi possível verificar que houve uma realocação de recursos energéticos, que prioritariamente se depositariam nos ovários, para outros tecidos, mostrando que no momento da exposição, os animais

priorizaram o processo de desintoxicação ao de desova, evitando a liberação de oócitos deficientes nutricionalmente que pudessem acarretar em insucesso da prole. E ainda, neste caso, o metal Mn demonstrou ser mais tóxico nos ovários para fêmeas vitelogênicas que o Al.

O período de recuperação de 96 horas, em parte, trouxe algumas respostas esperadas, mas também mostrou alterações no grupo controle o que não era esperado. Alguns autores sugerem que em muitas situações adversas, a recuperação de um período de estresse ocorre em muitas espécies, em um período de 6 horas e períodos além deste tempo pode ter efeitos de artefatos das condições experimentais e/ou dos regimes de amostragem (Pankhurst, 2012). Mesmo oferecendo alimentação neste período, muitos animais não a aceitaram e um longo período de jejum pode ter contribuído para os resultados aqui encontrados já que os valores são expressos por média do grupo, não permitindo uma interpretação correta sobre alguns parâmetros como sendo efeitos isolados ao metal na fase de recuperação.

Conclusões

Em respostas aos objetivos propostos inicialmente, podemos chegar às seguintes conclusões:

Objetivo 1- Verificar se a exposição ao Al e/ou Mn, isoladamente ou combinados, promove alterações funcionais nas brânquias de fêmeas vitelogênicas de teleósteos, avaliando atividade da Na^+K^+ ATPase e anidrase carbônica, quantidade de células de cloreto e composição de ácidos graxos de membranas;

- ✓ O Al promoveu alterações nas funções branquiais, alterou as funções da bomba de NKA, as quantidades de CC e promoveu lipoperoxidação nos fosfolipídios de membrana;
- ✓ O Mn também promoveu alterações nas funções da bomba de NKA e nas quantidades de CC;
- ✓ Os dois metais em combinação promoveram alterações nas proporções de ácidos graxos de membrana e lipoperoxidação destas mas, não promoveram alterações na NKA e CC.

Objetivo 2- Avaliar o efeito do Al e do Mn, isoladamente ou combinados, no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios nos principais tecidos de armazenamento de substratos energéticos.

- ✓ O Al foi capaz de promover alterações qualitativas e quantitativas nos lipídios, alterando as proporções de ácidos graxos do fígado e ovários e diminuindo a concentração lipídica no fígado, promovendo lipoperoxidação neste órgão. Além disso também foi prejudicial ao processo reprodutivo por diminuir a concentração protéica nos ovários;
- ✓ O Mn promoveu diminuição de proteínas no fígado, músculo e ovários e consequentemente a circulação plasmática destas, além de promover lipoperoxidação hepática;
- ✓ A ação dos dois metais em combinação acentuou os efeitos nas concentrações protéicas no fígado e no plasma e promoveu alterações nas proporções de ácidos graxos da fração polar dos lipídios dos ovários.

Objetivo 3- Avaliar a capacidade de recuperação quando mantidos em condições ideais, ou seja, na ausência dos metais depois de um período de exposição.

- ✓ após exposição ao Al isoladamente, as concentrações de proteínas nos ovários retornaram aos níveis normais, e a peroxidação no fígado diminuiu;
- ✓ após exposição ao Mn isoladamente não houve recuperação das concentrações protéicas nos ovários e fígado, perdidas durante a exposição, e houve uma diminuição das concentrações lipídicas em todos os tecidos;
- ✓ Após exposição aos dois metais juntos, os níveis de proteínas tanto no fígado quanto nos ovários diminuíram ainda mais após o período de recuperação;
- ✓ Mas em geral, fazer a avaliação de recuperação para alterações nos substratos metabólicos somente após 96 horas pode ter sido um tempo muito longo pois muitos animais ficaram sem se alimentar (voluntariamente) o que pode ter refletido nos resultados encontrados para os animais, inclusive do controle.

Objetivo 4- Avaliar se a exposição de fêmeas vitelogênicas ao Al e ao Mn individualmente, provoca efeitos semelhantes ou não, aos efeitos causados pela exposição aos dois metais combinados.

- ✓ Em fêmeas maduras de *A. bimaculatus* a exposição aos metais promoveu alterações complexas nos organismos como um todo, tanto quando expostas aos metais separadamente quanto juntos, mostrando que nesta fase, o animal é muito susceptível a alterações no ambiente que podem trazer consequências ao processo reprodutivo. Várias interações foram observadas entre o Al e Mn, evidenciando casos de antagonismo, potenciação e até mesmo de sinergismo entre estes metais, dependendo do parâmetro fisiológico analisado.

Referências Bibliográficas

- Adams, S.M., Shugart, L.R., Southworth, G.R., Hinton, D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCarthy, J.F.; Shugart, L.R. (Ed.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton: Lewis Publishers, pp. 333-353.
- Agostinho, C.A., Molinari, S.L., Agostinho, A.A., Verani, J.R., 1984. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L.) (Osteichthyes-Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. *Rev. Brasil. Biol.* 44(1), 31- 36.
- Alanärä, A., Winberg, S., Brännäs, E., Klessling, A., Höglund, E., Elofsson, U., 1998. Feeding behaviour, brain serotonergic activity levels, and energy reserves of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) within a dominance hierarchy. *Can. J. Zool.* 76, 212–220.
- Barnhoorn, I., van Vuren, J.H.J., du Preez, H.H., 1999. Sublethal effects of manganese on the carbohydrate metabolism of *Oreochromis mossambicus* after acute and chronic exposure. *S. Afr. J. Zool.* 34, 102–107.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40–46.
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flick, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na/K – ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *J. Exp. Biol.* 151, 517-428.
- De Smet, H. and Blust, R., 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 255–262.

- Exley, C., Chappell, J.S., Birchall, J.D., 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *J. Teor. Biol.* 151, 417-428.
- Gowaty, P.A., Anderson, W.W., Bluhm, C.K., Drickamer, L.C., Kim, Y.K., Moore, A.J., 2007. The hypothesis of reproductive compensation and its assumptions about mate preferences and offspring viability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 15023–15027.
- Haller, J., Miklósi, A., Csányi, V., Makara, G.B., 1996. Behavioral tactics control the energy costs of aggression: the example of *Macropodus opercularis*. *Aggressive Behav.* 22, 437–446.
- Hazel, J.R. and Williams, E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid. Res.* 29, 167–227.
- Heath, A. G. 1995. Water pollution and fish physiology. Boca Raton; CRC Press, 359p.
- Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N.; Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 136 B, 593-620.
- Hogg, S. and Kalyanaraman, B., 1998. Nitric oxide and low density lipoprotein oxidation. *Free Rad. Res.* 28, 593-600.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M., 2006. Stress in Fish. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. *The Physiology of Fishes*. 3 ed. New York: CRC Press. 9, 319-342.
- Jalabert, B., 2008. An overview of 30 years of international research in some selected fields of the reproductive physiology of fish. *Cybium* 32, 7–13.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J., 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 367-389.

- Mommsen, T.P., Vijayam, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 9, 211-268.
- Monette, M.Y. and 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.
- Pankhurst, N.W., 2012. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 265-275.
- Ricard, A.C., Daniel, C., Andersen, P., Hontela, A., 1998. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 34, 377-381.
- Schneider, J. E., 2004. Energy balance and reproduction. *Physiol. Behav.* 81, 289-317.
- Schreck, C.B. and Li, H.W., 1991. Performance capacity of fish: stress and water quality. In: Brune, D.E., Tomasso, J.R. (Eds.), *Aquaculture and Water Quality*, vol. 3. World Aquaculture Society, Baton Rouge, *Advances in World Aquaculture*, pp. 21-29.
- Sreedevi, P., Sivaramakrishna, B., Suresh, A., Radhakrishnaiah, K., 1992. Effect of nickel on some aspects of protein metabolism in the gill and kidney of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* L. *Environ. Pollut.* 77, 59-63.
- Sloman, K.A., Motherwell, G., O'Connor, K.I., Taylor, A.C., 2000. The effect of social stress on the standard metabolic rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta*. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 49-53.
- Vazzoler, A.E.A.M. and Agostinho, A.A., 1991. Uma nova abordagem da relação gonadossomática aplicada a teleósteos do alto rio Paraná. In: *Encontro Brasileiro de Ictiologia*, Maringá/PR., 52p.

- 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. Physiol.* 157 C, 1-8.
- Wikelski, M. and Cooke, S.J., 2006. Conservation physiology. *Trends Ecol. Evol.* 21, 38-46.
- Xu, X., Li, Y., Wang, Y., Wang, Y., 2011. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. *Toxicol. in Vitro* 25, 294–300.
- Zagatto, A. P. e Bertoletti, E. (Eds)., 2006. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima. 478p.