Bianca Mayumi Silva Kida

Influência do pH ácido, alumínio e manganês na fisiologia reprodutiva em machos de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae)

Influence of acidic pH, aluminum and manganese on reproductive physiology of *Astyanax bimaculatus* males (Characiformes: Characidae)

Versão corrigida

São Paulo

2014

Bianca Mayumi Silva Kida

Influência do pH ácido, alumínio e manganês na fisiologia reprodutiva em machos de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae)

Influence of acidic pH, aluminum and manganese on reproductive physiology of *Astyanax bimaculatus* males (Characiformes: Characidae)

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

Orientadora: Renata Guimarães Moreira Whitton

São Paulo

2014

Kida, Bianca
Influência do pH ácido, alumínio e manganês na fisiologia reprodutiva em machos de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae)

71p.

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

1. Hormônios Esteroides
2. Peixes
3. Desreguladores endócrinos

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

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a) Dr(a).

_____

Profª Drª Renata Guimarães Moreira Whitton

Orientadora

Ao meu pai, Wilson Kida, que de forma imprescindível me deu forças para seguir em frente sempre me apoiando em minhas decisões.

Ao meu irmão, Wilian Kida, que como um anjo, me protege e zela por mim.

A minha mãe, Suely Kida (in memoriam) que sempre estará presente em todas as minhas conquistas e para quem dedico todo o meu esforço.

A minha família e amigos que durante todo o meu caminho me tornaram uma pessoa melhor, profissional e capaz de seguir o meu caminho.

Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.
Martin Luther King

Agradecimentos

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

À FAPESP pela bolsa concedida para a realização do curso de mestrado e ao auxílio financeiro concedido pelo Projeto Temático 2008/57687- 0. Ao Projeto Temático "*Effects of global climate changes of the brazilian fauna: a conservation physiology approach*" (FAPESP, Processo: 2008/57687-0), coordenado pelo Dr. Carlos A. Navas (IB-USP) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do presente estudo.

Ao Danilo Caneppele e à equipe da CESP de Paraibuna pela disponibilização dos animais para a realização deste trabalho.

À Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton pela orientação, confiança depositada em mim, incentivo, competência e dedicação. Agradeço principalmente a chance de crescer pessoalmente e profissionalmente e por acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui.

Aos meus queridos amigos e companheiros de trabalho LAMEROENSES: Aline Dal'Olio, Amanda Narcizo, Andreone Medrado, Bruno Araújo, Carlos Eduardo Garcia, Carlos Eduardo Tolussi, Cristiéle Ribeiro, Elena Galvanese, Gabriela Brambila, Jandyr Rodrigues Filho, Jéssica Teske, Mariana Frias, Paulo Mello, Roberta Mourão, Walquíria Pedra. Muito obrigada pelo auxílio nas coletas, pela convivência no laboratório, congressos, auxílios nos experimentos, churrascos e Rei das Batidas.

E em especial àqueles que estiveram presentes em toda essa jornada; Raisa Abdalla, pelos momentos de trabalho e descontração; uma ótima companheira de trabalho e amiga, que como toda relação é cheia de altos e baixos, mas que nunca impediram de cumprir o nosso trabalho; Renato Honji, pela paciência (e muita) e ajuda; Andreone

Medrado, pela bela estrutura no biotério, que nos economizaram muitas horas de trabalho.

Aos LAMEROENSES que seguiram em frente, Vanessa Vieira e Tiago Correia, por me iniciarem na Ecotoxicologia, e por me ensinarem muito do que sei.

Ao pessoal do Instituto de Biociências e do Departamento de Fisiologia que nos acompanham em todos os momentos decisivos nesse processo, principalmente à Rose pela paciência e ajuda, à Gisele e Marcilene pelo auxílio e prontidão, à Suzi com seu café e chá de gengibre que são imprescindíveis nas horas sentadas em frente ao computador e ao Vagner, sempre nos salvando no laboratório.

Ao meu querido pai, amigo, confidente, Wilson Kida, que garantiu que tudo fosse possível, me ajudando nos momentos difíceis, com palavras de força, me fazendo companhia, cozinhando aqueles pratos que só ele faz, e que são tão requisitados pelos LAMEROENSES..rs..

Ao meu irmão, que sempre esteve presente em pensamento e sempre torcendo por mim. Aquele por quem eu prezo a confiança, carinho e quem eu me orgulho de ser irmã. Obrigada por tudo que já fez e faz por mim. Saiba que a mamãe se orgulha do homem que você se tornou.

À minha mãe Suely Kida (*in memoriam*), que embora não tenha acompanhado o meu crescimento profissional, me formou como pessoa e me permitiu chegar até aqui. Aquela pessoa que me mostrou que é preciso lutar pelo que quer, e para atingir os objetivos é preciso força e garra. Você nos deixou tão cedo, mas sempre estará presente em nossos corações e em nossas vidas. Te amo! Continue olhando por nós.

Aos meus queridos amigos, que durante essa fase me proporcionaram muitos momentos de alegria, e inesquecíveis para mim. Aos amigos do Guarujá, que cresceram comigo e acreditaram em mim; aos amigos da Vila Matilde, que com certeza serão eternos; aos amigos do Mackenzie, que se não fossem as inúmeras horas de estudos e dedicação, a parceria e alegria durante os quatro anos de curso eu não

estaria escrevendo o agradecimento da minha dissertação de mestrado. Aos amigos que conquistei pelos lugares que passei e que não menos importantes, agradeço por me acompanharem até aqui.

A minha família, Silva e Kida, por estarem presentes, cada uma de sua maneira, nos momentos difíceis e de alegria em minha vida. Minha querida avó Maria José, e batian Mariko Kida, pelos exemplos de mulher que são para mim.

Índice

1. Introdução **11**

1.1. A poluição aquática e a Ecotoxicologia **11**

1.2. Os efeitos dos metais sobre a fisiologia reprodutiva **13**

1.3. Desreguladores endócrinos **16**

1.4. *Astyanax bimaculatus* **19**

2. Objetivos **21**

2.1. Objetivo geral **21**

2.2. Objetivos específicos **21**

3. Material e Métodos **22**

3.1. Condições experimentais e análise química da água **22**

3.2. Delineamento Experimental **22**

3.3. Estrutura do biotério **25**

3.4. Soluções-estoque **26**

3.5. Coleta das amostras **27**

3.6. Análises histológicas das gônadas **27**

3.7. Análises hormonais **28**

3.7.1. Extração de hormônios no plasma **28**

3.8. Concentração espermática **29**

3.9. Análises estatísticas **31**

4. Resultados **32**

4.1. Análise físico-química da água **32**

4.2. Estádio de maturação de *Astyanax bimaculatus* **36**

4.3. Análises hormonais **38**

4.3.1. Concentração plasmática de 11-cetotestosterona **38**

4.3.2. Concentração plasmática de testosterona **40**

4.3.3. Concentração plasmática de 17β-estradiol **42**

4.3.4. Concentração plasmática de cortisol **44**

4.4. Concentração espermática **46**

5. Discussão **51**

5.1. Parâmetros físico-químicos **51**

5.2. Análises hormonais **53**

5.3. Concentração espermática **58**

6. Conclusões **60**

7. Resumo **61**

8. Abstract **62**

9. Referências bibliográficas **63**

1. Introdução

1.1. A poluição aquática e a Ecotoxicologia

A poluição vem contribuindo para causar grandes alterações dos ecossistemas aquáticos. A biota 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 (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, seu padrão de potabilidade, assim como as condições e padrões de lançamento de efluentes que assegurem e preservem a vida aquática.

Diante desse problema que só tem aumentado nos últimos anos, foi necessária a implantação de estudos que visam entender quais são esses compostos que estão agindo como poluentes e como estes podem atuar sobre os organismos que vivem nos ambientes contaminados. Há diversas interações e efeitos que podem ser causados por poluentes, que variam quanto a sua amplitude, duração e persistência, podendo alterar os sistemas fisiológicos. Diante desse problema, os estudos na área de Ecotoxicologia surgiram como uma forma de buscar a interação dos contaminantes sobre a ecologia dos ambientes e sobre os organismos que nele vivem. A Ecotoxicologia foi definida como uma "*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*" (Plaa, 1982). A partir da década de 70, essa ciência se tornou mais abrangente após casos de grande importância ecológica, trazendo a tona a importância de tentar controlar essa poluição que se agravou a partir de então.

Diante dessa problemática, as águas superficiais do Estado de São Paulo enfrentam uma situação muito crítica em relação à qualidade, e muitos valores encontrados nos corpos d'água se encontram acima daqueles estabelecidos pelas leis

ambientais. Segundo dados da CETESB (2012), diversas bacias hidrográficas do Estado de São Paulo, inclusive na bacia do Alto Tietê, onde se encontram os animais do presente estudo, as concentrações de diversos metais, entre eles o alumínio e o manganês, ultrapassam os limites permitidos pelo CONAMA, atingindo também as águas destinadas ao consumo público.

Portanto, se julga necessário que mais estudos sejam realizados a fim de abranger os conhecimentos sobre a atual situação dos corpos d'águas, e como esse problema recorrente tem atingido a biota desses ambientes, assim como a sociedade dependente desse ecossistema.

1.2. Os efeitos dos metais sobre a fisiologia reprodutiva

A intensa exploração dos recursos naturais decorrente do crescimento populacional e desenvolvimento industrial (Zhou *et al*., 2008) gera efluentes industriais e domésticos, que ainda carecem de um tratamento adequado (Zagatto e Bertoletti, 2006). A ocorrência de solos contaminados por metais é um problema ambiental global que resulta não apenas em riscos ecológicos e para os humanos, mas também pode causar grandes implicações financeiras em termos de custos de remediação e em questões de desenvolvimento (Semezin *et al.,* 2007). Poluentes atmosféricos, efluxo ou escoamento industrial e agrícola podem desregular o funcionamento de ecossistemas aquáticos (Masson *et al.,* 2002) e como resultado deste impacto são observados efeitos biológicos nos organismos tais como mudanças morfológicas e fisiológicas em diferentes níveis de organização (Zhou *et al*., 2008) e até mesmo na dinâmica ecológica das comunidades (Depledge *et al.*, 1995).

Dentre os metais, o alumínio (Al) em águas acidificadas e em altas concentrações pode se tornar um agente tóxico para os animais aquáticos, podendo se organizar em formas iônicas, polimerizadas, coloides ou partículas, que sofrem influência do pH, alterando sua biodisponibilidade (Teien *et al*., 2007). O Al constitui 8% da composição da crosta terrestre (Poléo *et al*., 1995), no entanto até o presente momento não se conhece nenhuma função biológica para esse metal (Nayak, 2002). A toxicidade do Al em peixes varia com a concentração, com o pH, temperatura, concentração de Ca^{2+}, força iônica e material orgânico dissolvido assim como a duração de exposição ao metal (Nilsen *et al.,* 2013).

Entre os efeitos primários resultantes da exposição ao Al em peixes estão as alterações nos sistemas fisiológicos, como o osmorregulatório e ionorregulatório, causados principalmente por modificações celulares nas brânquias, que comprometem também o sistema respiratório (Exley *et al*., 1991). Entre os efeitos secundários estão as alterações metabólicas (Brodeur *et al.,* 2001; Vieira *et al.,* 2013) e endócrinas, por exemplo nos esteroides gonadais (Correia *et al*., 2010). Dentre os efeitos sobre o sistema endócrino, se destacam também respostas fisiológicas ao estresse causado pelo Al em combinação ao pH ácido (Heath, 1995), causando por exemplo, diminuição na expressão de gonadotropinas hipofisárias (Narcizo, 2009) e a diminuição na concentração plasmática de 17α- hidroxiprogesterona (17α-OHP) em fêmeas de

Oreochromis niloticus (Correia *et al.,* 2010), o que sugere prejuízos na eficiência reprodutiva, considerando que os progestágenos são importantes hormônios na maturação final dos gametas. Estudos *in vitro* conduzidos por Narcizo (2014) indicaram que a exposição de fêmeas de *O. niloticus* ao Al resultaram em alterações em nível celular, inibindo a resposta de células esteroidogênicas ovarianas às gonadotropinas e alteração da expressão gênica de βFSH, βLH, e de forma geral causou uma desestruturação celular na hipófise desses animais.

Assim como o Al, o manganês (Mn) em altas concentrações pode afetar negativamente os organismos, causando alterações na ionorregulação e osmorregulação, alterações metabólicas (Partridge e Lymbery, 2009), assim como causar a lipoperoxidação e o estresse oxidativo (Vieira *et al*., 2012). O Mn é um metal amplamente distribuído na crosta terrestre, sendo o 12º elemento mais abundante, e o 5º entre os metais. Este não é encontrado puro na natureza, mas sim sob a forma mineral, que em concentrações fisiológicas é essencial na manutenção da homeostase dos organismos (Kalembkiewicz *et al.,* 2008), participando de diversos processos fisiológicos como reprodução, metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, e também como cofator de enzimas (Prestifilippo *et al.,* 2007).

Este metal também pode interferir negativamente na esteroidogênese gonadal, porém, neste caso, dados da literatura descrevem estes efeitos em mamíferos, atuando então sobre a fertilidade de machos, bem como na concentração sérica de hormônios, como o folículo estimulante (FSH) e a testosterona (T) em ratos tratados com doses altas de cloreto de manganês ($MnCl_2$) durante um período crônico (Cheng *et al.,* 2003). Embora o Mn seja um elemento essencial aos organismos, Vieira *et al*., (2012) relataram que o Mn pode causar toxicidade para peixes e outros organismos aquáticos, variando o seu potencial tóxico de acordo com a espécie, estágio de vida, além de poder ser influenciado pela qualidade da água. Portanto, ainda segundo a autora, as brânquias são os primeiros órgãos a serem afetados pelo Mn, assim como o Al, e em seguida estão os demais órgãos como pele, rins, fígado e intestinos.

A exposição ao Al e ao Mn pode desencadear também sérios prejuízos sobre a reprodução de teleósteos, principalmente alterando a produção dos hormônios que modulam o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, como no caso do Al (Hwang *et al*., 2000; Correia *et al*., 2010; Narcizo, 2014), assim como o cádmio (Cd) que também afeta o sistema reprodutivo (Lafuente, 2013; Amutha e Subramanian, 2013). Animais expostos

ao Mn também demonstraram alterações sobre a função normal do sistema endócrino, em particular alterando a produção e secreção de hormônios sexuais (Pine *et al.*, 2005). Correia (2012) observou que o Mn foi capaz de causar uma diminuição nas concentrações de hormônios esteroides como 17α-OHP, cortisol e o hormônio tireoidiano tiroxina (T4) em fêmeas maduras de *Astyanax bimaculatus*. Além disso, a deficiência de Mn^{2+} em animais de laboratório está associada a prejuízos no crescimento e na reprodução, em ambos os sexos, sugerindo a importância do Mn^{2+} nos processos reprodutivos (Smith, 1944), no entanto, em altas doses esse metal pode gerar efeitos negativos nesses processos.

1.3. Desreguladores endócrinos

Devido à interação direta e permanente com a água, os peixes são sensíveis a muitas substâncias tóxicas (Masson *et al.,* 2002). Algumas dessas substâncias podem causar alterações sobre o sistema endócrino dos organismos, e quando apresentam essa característica são definidas como desreguladores endócrinos (EDC), do inglês *Endocrine disruptors chemicals*. Estas são capazes de interferir no sistema endócrino, alterando processos como de síntese e/ou degradação de hormônios, bloqueando os receptores hormonais ou mimetizando os hormônios endógenos, em baixas concentrações (Matthiessen e Johnson, 2007). A exposição a essas substâncias, entre elas os metais presentes nos efluentes, pode perturbar a função endócrina com efeitos no eixo reprodutivo (Arukwe, 2001; Iavicoli *et al.*, 2009) ou em outros órgãos endócrinos, como por exemplo, o pâncreas (Hontela e Lacroix, 2006).

Os efeitos causados pelos metais sobre o sistema endócrino podem ser originados de interferências sobre o eixo neuroendócrino composto pelo hipotálamo–hipófise–gônadas, que controla a reprodução em peixes e nos demais vertebrados. Nesse controle, o hipotálamo é modulado exogenamente por fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura, pH, e endogenamente através da melatonina, dopamina (Korf, 2006) e *kisspeptina* (Zohar *et al.,* 2010). Este então passa a sintetizar e secretar um neuro-hormônio conhecido como GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) que estimula a adeno-hipófise a sintetizar as gonadotropinas FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante) (Rocha e Rocha, 2006).

O FSH é o primeiro hormônio gonadotrópico a ser liberado no ciclo reprodutivo, ocorrendo nos primeiros estágios da maturação gonadal, e estimula a produção de 17β-estradiol pelas células foliculares dos ovários e pelas células de Leydig nos testículos. O LH estimula a secreção de 17α20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α,20β-DHP) e 11-cetotestosterona (11-KT) em fêmeas e machos, participando do processo de maturação final e liberação de gametas (Banerjee e Khan, 2008).

Dentre os efeitos dos poluentes sobre o eixo endócrino, os desajustes hormonais desencadeiam sérios prejuízos sobre a reprodução, podendo destacar a diminuição na síntese dos esteroides gonadais, vitelogenina, gonadotropinas e aumento dos níveis de dopamina em perca (*Perca fluviatilis*) e pardelha dos alpes (*Rutilus rutilus*) (Karels *et al.,* 1998).

Assim como os efeitos observados nos hormônios esteroides sexuais, os metais são capazes de atuar como EDC's para outras classes de hormônios, como o cortisol, atuando sobre o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (Brodeur *et al.,* 1998). O cortisol é um hormônio esteroide secretado pelas células do tecido interrenal no rim dos teleósteos que são também o principal local de produção das catecolaminas (células cromafins) nos teleósteos (Lima *et al*., 2006). Fisiologicamente este hormônio é um potente glico-mineralocorticoide e desempenha um papel central na resposta ao estresse (Arjona *et al*., 2008). A concentração plasmática deste hormônio tem sido amplamente utilizada como indicador do estresse fisiológico (Weendelar Bonga, 1997). Waring *et al.* (1996) relataram os efeitos do Al em pH ácido aumentando a concentração de cortisol. A capacidade de ativar a resposta normal de estresse e elevar o cortisol plasmático em resposta a um estressor é uma parte integral da resposta adaptativa fisiológica, e a sua desregulação pode reduzir a sobrevivência dos animais (Hontela e Lacroix, 2006).

Não apenas os metais, mas o pH ácido de forma isolada, pode ser capaz de alterar a capacidade reprodutiva em peixes (Sangalang, 1990), causando alterações como aumento da concentração plasmática de T, ou atraso no desenvolvimento em fêmeas juvenis de esturjão russo (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt) (Zelennikov *et al*., 1999), entre outros efeitos que podem atingir diretamente a capacidade de sucesso reprodutivo dos organismos. A precipitação ácida tem causado a redução e extinção de população de salmão no sul da Noruega desde o fim do século 19 (Sandoy e Langaker, 2001). Além disso, a combinação dos efeitos do pH ácido ao metal Al causa distúrbios em inúmeras funções fisiológicas em salmão (*Salmo salar*) tais como redução no crescimento, alterações na função comportamental e na capacidade de sobrevivência (Bukler *et al.,* 1995).

Estudos acerca da fisiologia de peixes juntamente com estudos ecotoxicológicos podem fornecer dados como a antecipação e o diagnóstico de possíveis impactos ecológicos causados por poluentes (Calow, 1993). O conhecimento do efeito de alguns metais, como Al e Mn sobre a fisiologia reprodutiva de fêmeas de teleósteos já vem sendo conduzidos, inclusive com espécies nativas, como é o caso do lambari, *Astyanax bimaculatus* (Correia, 2012; Vieira, 2012; Vieira *et al*., 2013) e *Astyanax fasciatus* (Correia, 2008). No entanto, estudos sobre o impacto de metais na fisiologia reprodutiva de machos de teleósteos são escassos.

De forma geral os poluentes não só podem atuar sobre a função endócrina dos animais, mas também alterar a viabilidade dos gametas. Uma vez que a qualidade do

espermatozoide é o principal fator para o sucesso na reprodução (Kime *et al*., 1996), a medição de parâmetros como motilidade, concentração espermática, taxa de fertilização, entre outros, pode fornecer dados importantes quanto aos efeitos da exposição aos metais, podendo ser utilizado como um bioindicador. Saxena *et al*. (1989) constataram que a administração oral de cádmio (5 $mg.L^{-1}$) e cádmio mais chumbo (25 $mg.L^{-1}$) em ratos causou diminuição na concentração e motilidade dos espermatozoides.

Alterações subletais em peixes, ou seja, que não causam a morte dos organismos podem afetar a fisiologia do animal, reduzindo o seu desempenho reprodutivo, que consequentemente influencia o declínio e perda de populações selvagens em águas afetadas pela deposição ácida (Bukler *et al.*, 1995). A avaliação de risco baseada em medidas fisiológicas em organismos expostos a vários contaminantes tem sido pouco estudada, no entanto, essas medições são muito interessantes uma vez que o prejuízo em qualquer função do organismo causará a redução no potencial de sobrevivência do indivíduo (Depledge *et al.*, 1995).

Pesquisas sobre a fisiologia de peixes juntamente com estudos ecotoxicológicos podem fornecer dados como a antecipação e o diagnóstico de possíveis impactos ecológicos causados por poluentes (Calow, 1993). Portanto, visto os estudos incipientes da influência dos metais na fisiologia de machos, o presente trabalho é uma importante ferramenta para fornecer dados sobre as possíveis alterações decorrentes da exposição a estes metais na fisiologia reprodutiva em machos de teleósteos, pois objetivou estudar o impacto da exposição ao Al e Mn na endocrinologia reprodutiva de machos de *Astyanax bimaculatus,* uma espécie importante na Bacia do Alto do Tietê.

1.4. Astyanax bimaculatus

O *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), conhecido como lambari-do-rabo-amarelo ou tambiú, apresenta algumas características morfológicas como duas manchas, sendo uma na região umeral (próxima à nadadeira peitoral), com forma ovalada e posição horizontal, e outra em forma de clava, seguindo do pedúnculo caudal à porção mediana do corpo (Sampaio e Almeida, 2009). Os machos apresentam corpo mais longilíneo (Figura 1) enquanto que as fêmeas apresentam um corpo mais ovalado (Figura 2).

Figura 1: Espécime macho de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758).

Figura 2: Espécime fêmea de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758).

Os lambaris habitam diversos ambientes, como rios, riachos, lagoas e represas, mesmo naqueles onde há ocupação humana. São capazes de realizar forrageamento em todos os níveis tróficos, atuando como consumidores primários (alimentando-se de

plantas e fitoplâncton), secundários ou terciários (ingerindo zooplâncton, insetos e peixes). Por esse motivo, essa espécie é considerada como oportunista, visto que possui grande capacidade de colonizar diferentes habitats. Seu sucesso reprodutivo se deve à grande gama de táticas reprodutivas, variando de acordo com as condições ambientais, sendo capaz de se ajustar a essas variações (Sampaio e Almeida, 2009). Atualmente, essa espécie tem sido muito utilizada em estudos, que variam desde o conhecimento de sua biologia reprodutiva até avaliações ecotoxicológicas, uma vez que, segundo Sampaio e Almeida (2009), diversos fatores favorecem os estudos com esta espécie, como ajustes a diferentes habitats, fácil manejo e manutenção em laboratório, além de serem sensíveis às mudanças ambientais, apresentando-se como bons bioindicadores.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral verificar se os metais Al e Mn e o pH ácido podem atuar como desreguladores endócrinos sobre a fisiologia reprodutiva em machos adultos de *Astyanax bimaculatus*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as possíveis mudanças decorrentes da exposição ao pH ácido, Al e Mn, isoladamente ou combinados, sobre a esteroidogênese testicular, determinando o perfil plasmático dos hormônios esteroides: 11-cetotestosterona, testosterona, 17β-estradiol e cortisol.
- Verificar se o pH ácido e estes metais são capazes de alterar a produção de espermatozoides.

3. Material e Métodos

3.1. Condições experimentais e análise química da água

A água utilizada no experimento foi filtrada com o uso de dois filtros, um mecânico, composto por um filtro de polipropileno (Health do Brasil), e outro de carvão ativado (Aleas) para remover partículas sólidas e para reduzir as matérias orgânicas e eventuais contaminantes químicos, respectivamente. Os parâmetros físicos e químicos da água foram posteriormente avaliados e descritos. O meio experimental foi continuamente aerado, e a temperatura da água e oxigênio dissolvido foram monitorados diariamente com uma sonda multiparâmetros (Pro Plus, YSI), utilizada ainda para determinar as concentrações de nitrato (NO_3) e amônio (NH_4). O pH (mantido em diferentes valores, de acordo com o grupo experimental) foi monitorado com um pHmetro (Gehaka). As concentrações de Al e Mn foram monitoradas antes e depois da renovação da água com um espectrofotômetro de absorção atômica (GBC, AAS 932 Avanta-Plus, IL, EUA).

3.2.Delineamento experimental

Os machos sexualmente maduros de lambari do rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*-Linnaeus, 1758), com massa corpórea média de 24,29 ± 1,17 g e 11,78 ± 0,18 cm de comprimento total foram doados pela Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna (S 23º24.53,71’ W 45º59,82’), pertencente à Companhia Energética de São Paulo – CESP, localizada no município de Paraibuna – SP (Figura 3) e mantidos no Biotério de Ectotérmicos do Departamento de Fisiologia - IB/USP (Figura 4). A espécie *A. bimaculatus* tem distribuição na América do Sul (Pavanelli e Caramaschi, 1997), incluindo o sudeste do Brasil, onde é comum o acúmulo de Al no solo e consequentemente na água dos rios (CETESB, 2012). *A. bimaculatus* é um componente importante da ictiofauna e está presente em muitas bacias de regiões do sudeste do Brasil (Pavanelli e Caramaschi, 1997).

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

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

Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de sete dias de aclimatação, já nas condições do biotério, em 10 aquários de vidro de 40 x 50 x 70cm (132L de água/aquário; 2,20g.L^{-1} de peixe), com renovação diária de água (90%)

e alimentados com ração extrusada com 32% de proteína bruta, 4mm de diâmetro, uma vez ao dia. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos experimentos e os animais foram mantidos sem alimento até o término da exposição aguda, sendo a alimentação restabelecida durante o período de recuperação. O fotoperíodo utilizado no experimento, com iluminação artificial do biotério, foi de C:E 13:11 (13 horas de claro, 11 horas de escuro).

Para a condução do experimento foram determinados cinco grupos experimentais (duplicatas): 1) grupo controle em pH neutro (CTR – n), sendo todos os demais em pH ácido: 2) grupo pH ácido (pH – ac), 3) grupo Al (Al), 4) grupo Mn (Mn) e um 5) grupo com ambos os metais Al+Mn (Al-Mn). Os metais foram mantidos em uma concentração nominal próxima a 0,5 $mg.L^{-1}$ nos grupos 3, 4 e 5, sendo que os valores exatos foram detalhados no item resultados.

O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira etapa se deu pela exposição aguda aos metais por 96 horas, sendo que esta se dividiu em dois momentos: uma coleta de 3 animais por aquário após 24 horas e depois, com 96 horas de exposição, totalizando 6 animais por grupo. Na segunda etapa, nomeada como período de recuperação, também de 96 horas, os animais voltaram às condições iniciais, de água livre de metais, alimentação normal e pH próximo a neutralidade e foram coletados 3 animais por aquário após 24 e 96 horas, totalizando também 6 animais por grupo experimental. Para que a densidade de indivíduos fosse mantida no período de recuperação, adicionou-se 6 animais que não foram amostrados, devidamente identificados, eliminando o efeito da diminuição da densidade populacional nos aquários. Estes ensaios foram do tipo semi-estático, com renovação parcial de água (90% vol. total) a cada 24 horas (Figura 5).

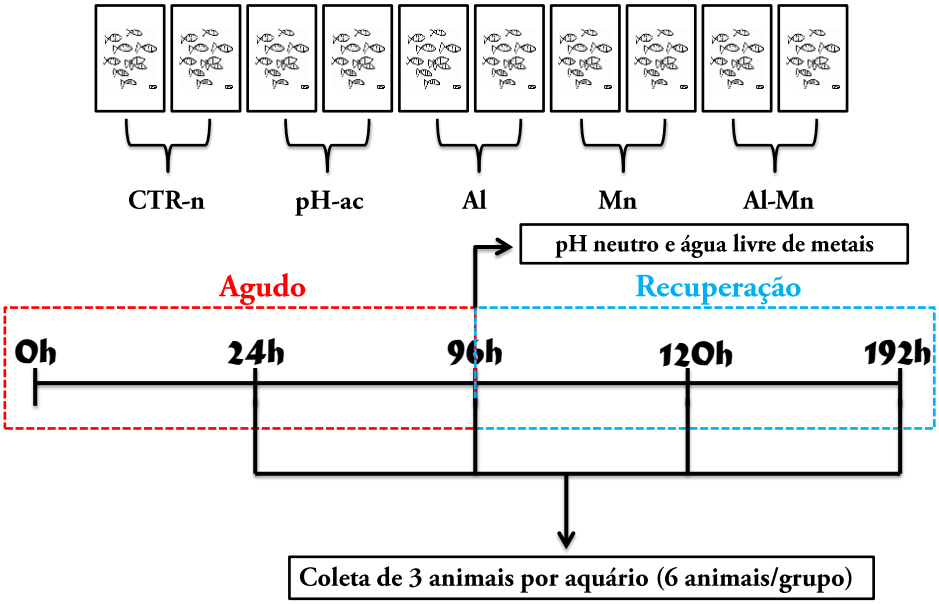

Figura 5: Esquema do delineamento experimental

3.3.Estrutura do biotério

Para a condução do experimento no biotério, foi desenvolvida uma estrutura com a finalidade de minimizar o contato dos pesquisadores com os animais, de forma que a troca da água fosse realizada sem a necessidade de manipulação. Para isso, foi instalado um sistema de entrada e saída de água, além de um sistema de filtragem e armazenamento de água para a troca diária (Figura 6).

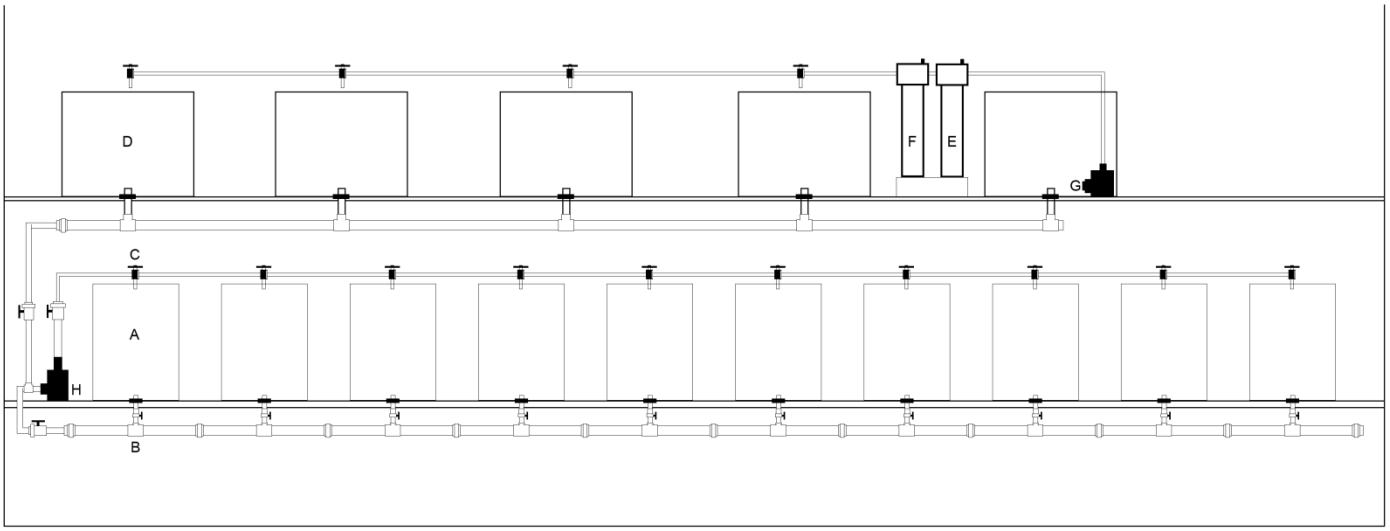

Figura 6: Esquema (vista frontal) de estrutura montada para a condução do experimento no Biotério de Ectotérmicos do Departamento de Fisiologia – IB/USP. Legenda: A: Aquários; B: Saída de água; C: Entrada de água; D: armazenamento de água; E: Filtro químico F: Filtro mecânico; G: Bomba de água submersa;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

3.4. Soluções-estoque

As soluções estoque de Al e Mn foram preparadas para a introdução destes metais no meio experimental, cuja concentração testada foi de 0,5 $mg.L^{-1}$ (metal nominal) para ambos os metais. Para a solução de Al, pesou-se 20 g de $Al_2(SO_4)_3$ (Sigma Aldrich) que foi diluído em 250ml de água Milli-Q e ajustou-se o pH da solução para 2,5 com HNO_3 65% (Suprapur, Merck). A partir desta solução, foram adicionados 10,509 ml nos aquários de 132L para manter a concentração de 0,5$mg.L^{-1}$. Já para a solução de Mn, utilizou-se 20g de $MnSO_4$ (Sigma Aldrich) em 250ml de água Milli-Q, e também foi ajustado o pH da solução para 2,5 seguindo o mesmo protocolo. Nos aquários experimentais foram adicionados 2,538ml dessa solução para manter a concentração de 0,5$mg.L^{-1}$ de Mn. As concentrações de Al e Mn na água experimental foram confirmadas pelo método de espectrofotometria de absorção atômica (GBC, AAS 932 Avanta-Plus, IL, USA) pela empresa Nova Ambi durante o experimento.

3.5. Coleta das amostras

As quatro coletas foram programadas para o período da manhã, em novembro/2012. Os peixes foram alocados em recipientes menores e anestesiados por imersão em água contendo benzocaína anestésica (*ethyl-p-aminobenzoate*) previamente solubilizada em etanol, na proporção de 1g/10L de água, e os dados morfométricos e ponderais foram mensurados. Após a anestesia, o sangue foi coletado a partir da vasculatura caudal utilizando-se seringas descartáveis de 1 ml heparinizadas (Hepamax)(Figura 7), e centrifugado por 5 minutos a 655,2x *g* para separação do plasma da fração celular, que foi distribuído em alíquotas e congeladas em freezer -80ºC até a sua utilização.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 163/2012.

Figura 7: *Astyanax bimaculatus.* Coleta de sangue pela vasculatura caudal com seringas de 1ml heparinizadas.

3.6. Análises histológicas das gônadas

As gônadas foram removidas e fragmentos foram fixados por 20-24 horas em solução de Bouin acético e desidratadas com uma série crescente de diluições de etanol. Alguns fragmentos de gônadas foram colocados em uma solução de resina metacrilato e etanol absoluto (proporção de 1:1) por 2 horas, infiltrado em solução de resina pura por mais sete dias na geladeira. Cortes com 3 µm de espessura foram obtidos com o auxílio

de micrótomo Leica RM2255 equipado com navalha de vidro e corados com hematoxilina-eosina, e ácido periódico de Schiff (PAS) + hematoxilina + *Metanil Yellow* (Quintero-Hunter *et al*., 1991). Esse procedimento foi adotado para a obtenção de fotos com melhor qualidade e para melhor visualização e identificação das estruturas, visto que os cortes obtidos em resina são mais finos do que em Paraplast®.

Os cortes preparados foram analisados e documentados, utilizando-se um sistema computadorizado de captura de imagens (microscópio de luz transmitida – *Leica DM 1000;* câmera fotográfica – *Leica DFC 295;* e programa de captura de imagem – *Leica Application Suíte Professional, LAS V3.6*).

3.7. Análises hormonais

A concentração dos esteroides gonadais 17β estradiol (E_2), testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-KT) foi determinada no plasma dos animais pelo método de Elisaimunoensaio (ELISA) com o uso de kits comerciais (*Cayman Chemical*) e para cortisol (C) foram utilizados kits da marca *IBL International*. Antes de iniciar a leitura das amostras, foi necessário realizar um protocolo de extração do plasma, para separar as frações proteica e lipídica, utilizando-se apenas a fração lipídica (onde se encontram os hormônios esteroides). As proteínas do plasma foram precipitadas com éter etílico na proporção de 1:3 (plasma: éter etílico) e centrifugadas a 344x *g* por 9 minutos a 4ºC. Logo após serem centrifugadas, as amostras foram colocadas em freezer -80ºC por 7 minutos, para garantir que toda proteína fosse decantada. Por fim, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, seco com nitrogênio e estocado a 4ºC até a sua utilização. Antes de iniciar os ensaios, foram realizados vários testes de diluição para os hormônios, de forma a certificar-se de que a diluição utilizada fosse adequada para se ajustar à curva padrão sugerida nas instruções do kit. A leitura das placas foi realizada no espectrofotômetro Spectra Max (*Molecular Devices*), sendo 412 nm para 11-KT, T, E_2 e 450nm para C.

3.7.1. Extração de hormônios no plasma

Como já relatado foi realizada uma bateria de testes com machos do mesmo lote, nos quais o sangue foi coletado para identificar a diluição ideal para cada hormônio.

Após alguns testes, foi determinada para cada hormônio uma diluição distinta: 20 vezes para 11-cetotestosterona, (7,5 µl de plasma e 142,5µl de água destilada); 10 vezes para testosterona, (15 µl de plasma e 135 µl de água destilada); 3 vezes para o 17β- estradiol (40 µl de plasma e 80 µl de água destilada) e por fim utilizou-se uma diluição de 4 vezes para cortisol (12,5 ul de plasma e 37,5 de água destilada).

3.8. Concentração espermática

Para a coleta de sêmen foi realizada uma pequena pressão na região abdominal para a extrusão do sêmen, e este foi coletado com o auxílio de uma micropipeta e conservado em formol salino tamponado (Figura 8). Para a mensuração da concentração espermática (sptz.10^9.ml^{-1}), 2 µL de sêmen de cada animal foram adicionados a 2000 µL de formol salino tamponado, resultando em uma diluição de 1:1000. A contagem de células espermáticas foi realizada em câmara hematimétrica de Neubauer (400x) (Figura 9).

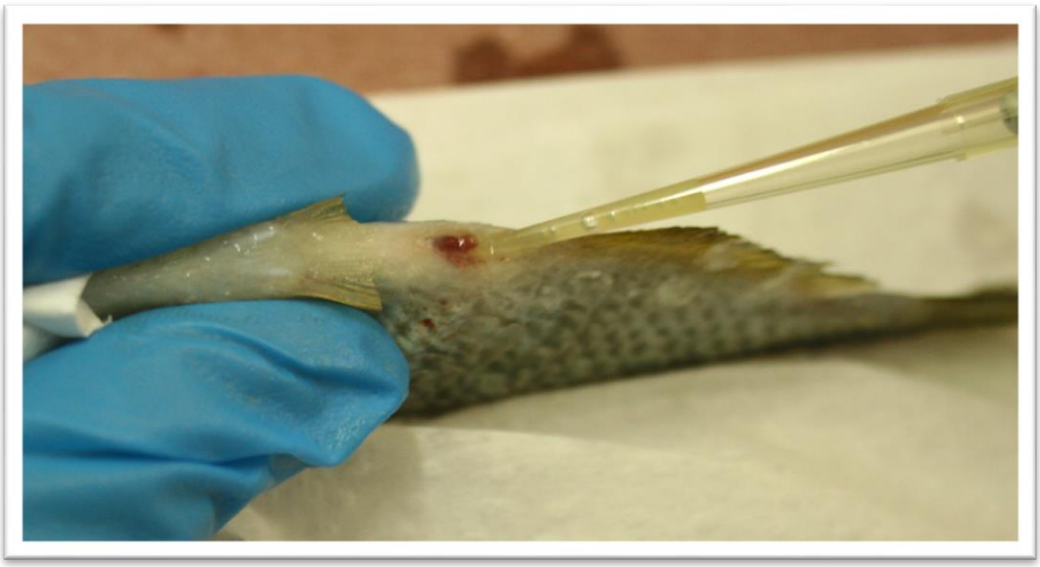

Figura 8: *Astyanax bimaculatus*. Extrusão e coleta de sêmen.

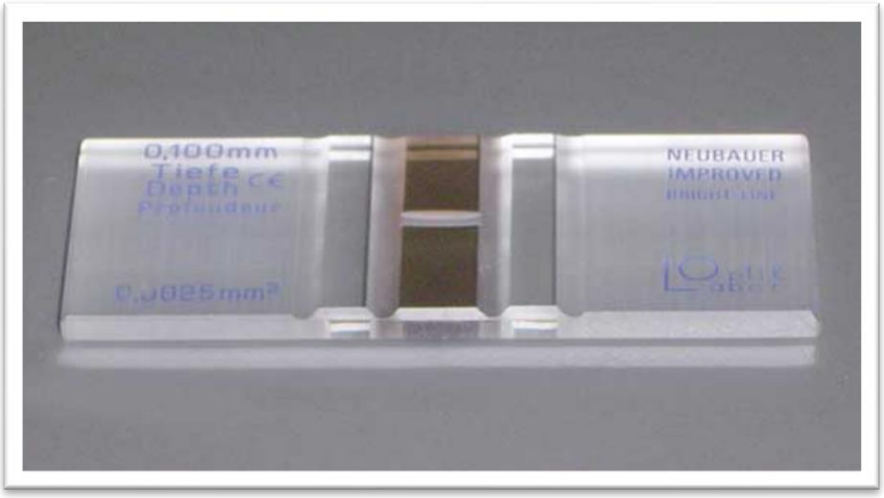

Figura 9: Câmara hematimétrica de Neubauer

Para a realização do procedimento de coleta e adição do sêmen a câmara de Neubauer foi utilizado o protocolo descrito na Figura 10. O cálculo da concentração de espermatozoides foi realizado utilizando-se a fórmula representada na Figura 11 (Sanches, 2010).

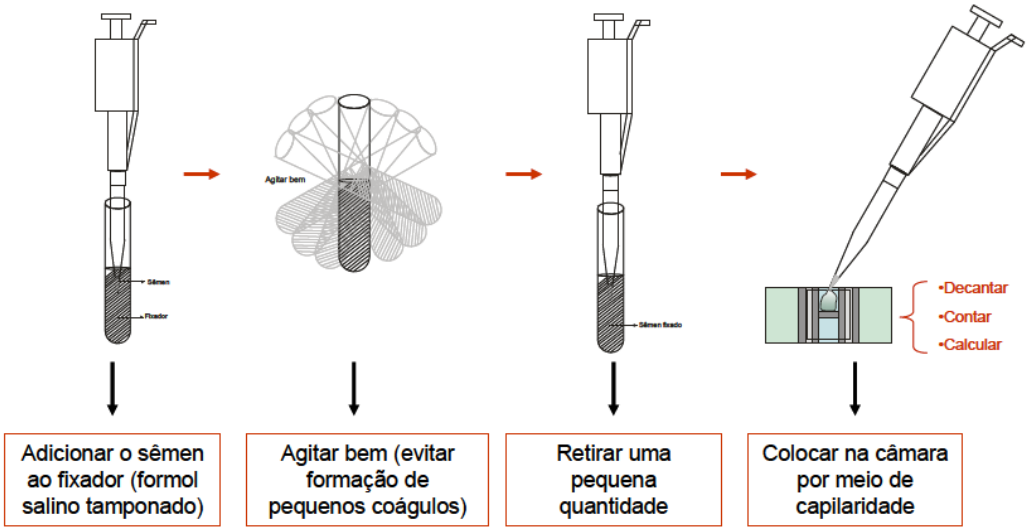

Figura 10. Esquema para preparação e contagem de espermatozoides (Sanches, 2010).

$$CSPZ\left(SPZ.mL^{-1}\right)=\left(\frac{\sum SPZ}{10\ q.c.}\right)\times\frac{25\ q.t.\times diluição\times 1000}{profundidade\ da\ câmara\left(mm\right)}$$

$SPZ = espermatozóides$
$\sum SPZ = número\ total\ de\ espermatozóides\ contados$
$q.c. = quadrícula\ contados$
$q.t. = quadrícula\ totais$
$profundidade\ da\ câmara = 0{,}10mm$
$diluição = fator\ de\ diluição\ do\ sêmen\ pelo\ fixador$

Figura 11. Fórmula para cálculo de concentração espermática (Sanches, 2010).

3.9. Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. Para a análise estatística, as concentrações hormonais foram transformadas em log10 para normalizar os dados, mas apresentados na concentração original nos gráficos. Para avaliação dos efeitos dos metais, os períodos experimentais foram analisados separadamente (agudo e recuperação) utilizando o teste *two-way* ANOVA tendo como fatores o tempo e o tratamento, comparando o CTR-n, pH ac, e os grupos de metais. Estes foram analisados com o auxílio do programa *Sigma Stat* 3.5, com nível de significância $P<0{,}05$.

4. Resultados

4.1. Análise físico-química da água

Os principais parâmetros físico-químicos foram avaliados: Ca^{2+} = 8,88 mg.L^{-1}, Fe = 0,09 mg.L^{-1}, SO_4= 12 mg.L^{-1}, PO_4=0,46 mg.L^{-1}, compostos nitrogenados totais =0,40 mg.L^{-1}, alcalinidade=15 mg $CaCO_3$.L^{-1}, matéria orgânica=19%, cloretos=4,90 mg.L^{-1}, condutividade elétrica (a 25 °C) = 65,50 µS.cm^{-1}, carbono orgânico=1,3 mg C. L^{-1}, carbono inorgânico = 1,2 mg C.L^{-1}, dureza total=26 mg $CaCO_3$.L^{-1}, e turbidez=1 NTV. Todas as variáveis apresentaram valores adequados e permitiram uma taxa de sobrevivência de 100% durante o período experimental. Outros parâmetros foram monitorados durante todo o experimento (Tabela 1) a fim de garantir as condições necessárias para a manutenção dos organismos.

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

Parâmetros	CTR – n	pH ac	Al	Mn	Al-Mn
pH	7,20 ± 0,2	5,84 ± 0,5	5,64 ± 0,3	5,86 ± 0,5	5,71 ± 0,4
O_2 dissolvido (mg.L^{-1})	7,39 ± 0,4	7,51 ± 0,3	7,43 ± 0,6	7,45 ± 0,3	7,43 ± 0,5
Temperatura (ºC)	24,82 ± 0,4	24,84 ± 0,4	24,98 ± 0,3	24,80 ± 0,4	24,83 ± 0,3
NH_4 (mg.L^{-1})	0,72 ± 0,4	0,81 ± 0,5	1,18 ± 0,6	0,76 ± 0,6	1,10 ± 1,2
NO_3 (mg.L^{-1})	0,39 ± 0,1	0,42 ± 0,1	0,42 ± 0,1	0,45 ± 0,1	0,50 ± 0,2
Al total	ND	ND	0,60 ± 0,09	ND	0,55 ± 0,14
Al dissolvido	ND	ND	0,36 ± 0,11	ND	0,38 ± 0,16
Mn total	ND	ND	ND	0,52 ± 0,13	0,57 ± 0,06
Mn dissolvido	ND	ND	ND	0,31 ± 0,16	0,51 ± 0,11

A partir dos dados de concentração dos metais, estes foram organizados em gráficos para representar a variação em relação ao pH durante o período experimental. Para os metais, tanto na forma total (Figura 12 e 14) quanto dissolvido (Figura 13 e 15), pode-se perceber que no momento em que foi realizada a troca de água, o pH se encontrava em valores próximos ou abaixo de 5,5, e a concentração dos metais tendiam a aumentar. A partir do momento em que as características físico-químicas da água

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

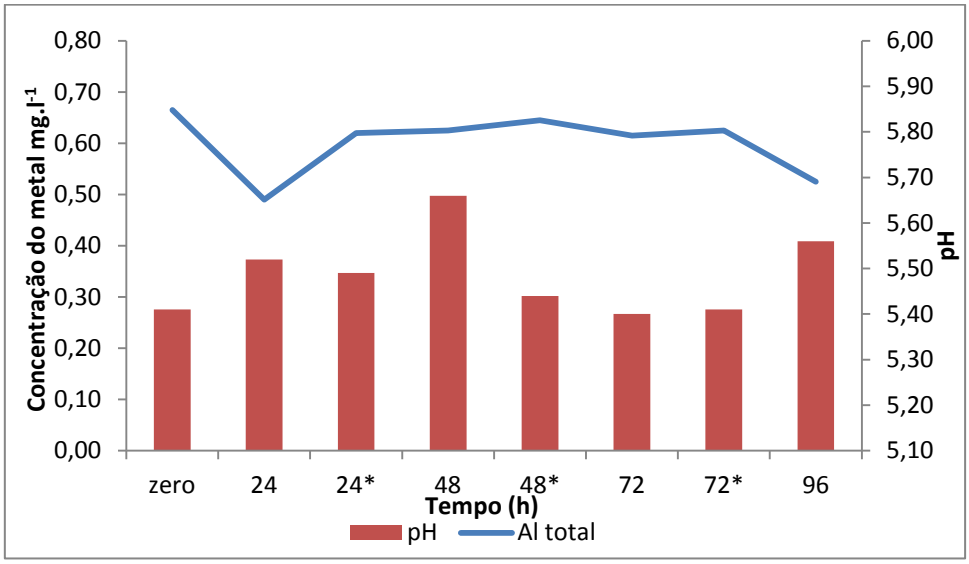

Figura 12. Concentração de Al total e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

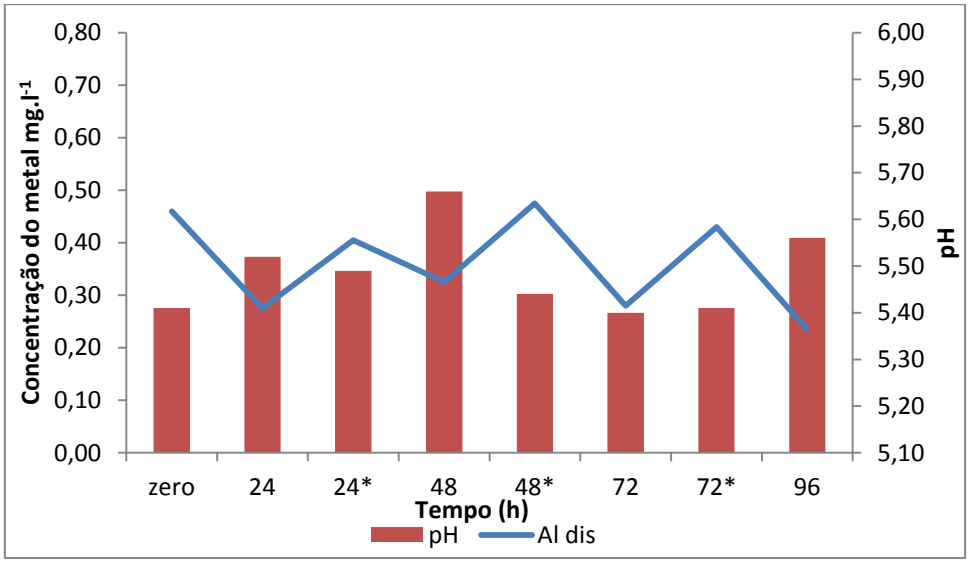

Figura 13. Concentração de Al dissolvido e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

A variação na concentração de Mn dissolvido se mostrou expressiva durante o experimento, e o pH sofreu uma grande oscilação, atuando sobre a biodisponibilidade desse metal (Figura 15). Além disso, a concentração de Mn dissolvido se manteve em valores inferiores a 0,5mg.L^{-1}.

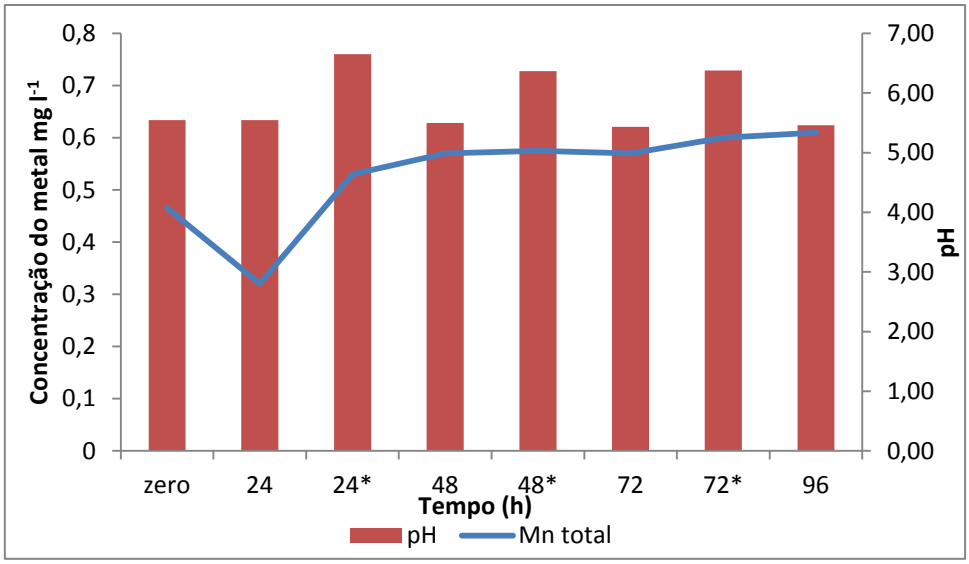

Figura 14. Concentração de Mn total e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

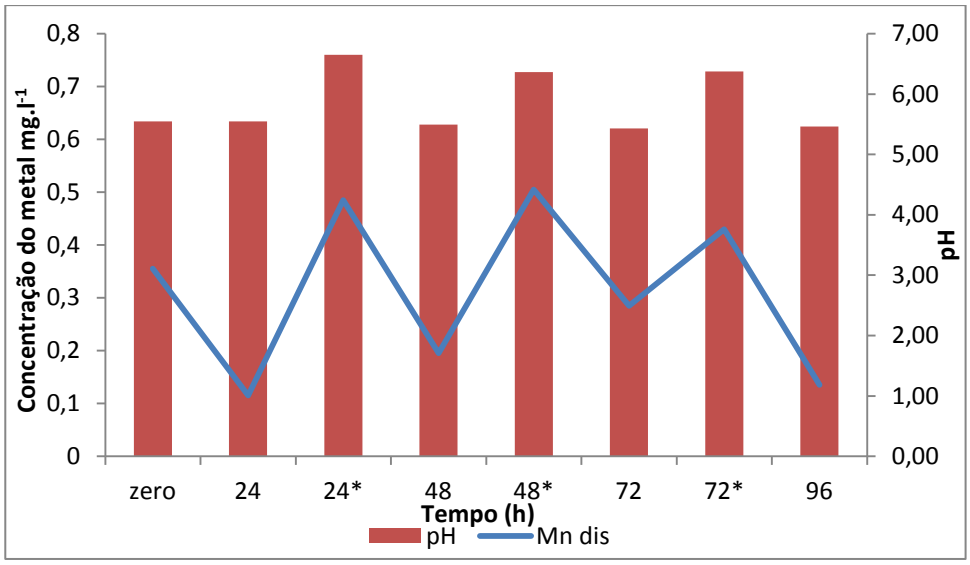

Figura 15. Concentração de Mn dissolvido e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

Já nos aquários em que os dois metais estavam presentes, tanto na fração total (Figura 16) quanto dissolvida (Figura 17) foram observadas respostas diferentes frente ao mesmo pH, sendo o Al mais dependente do pH do que o Mn.

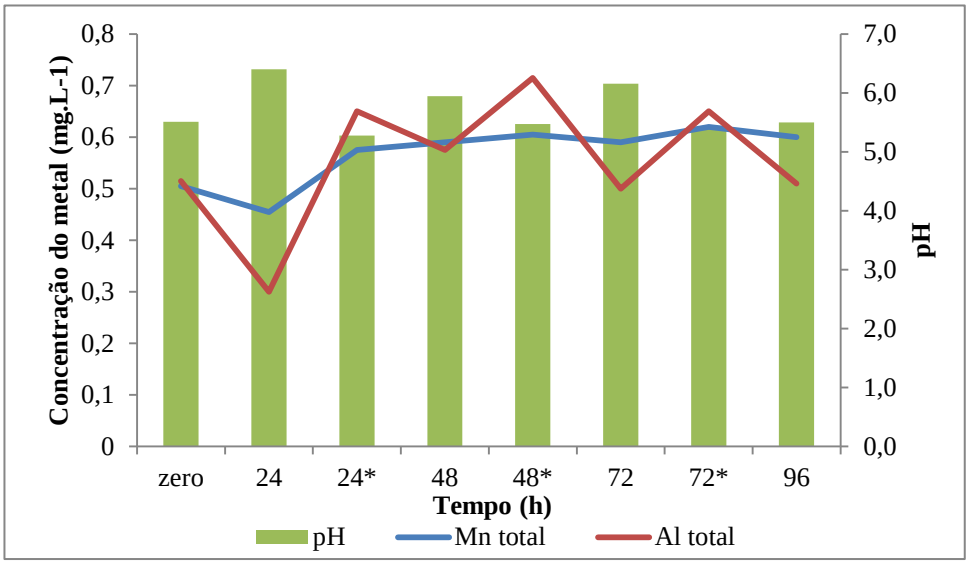

Figura 16. Concentração de Al e Mn total e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

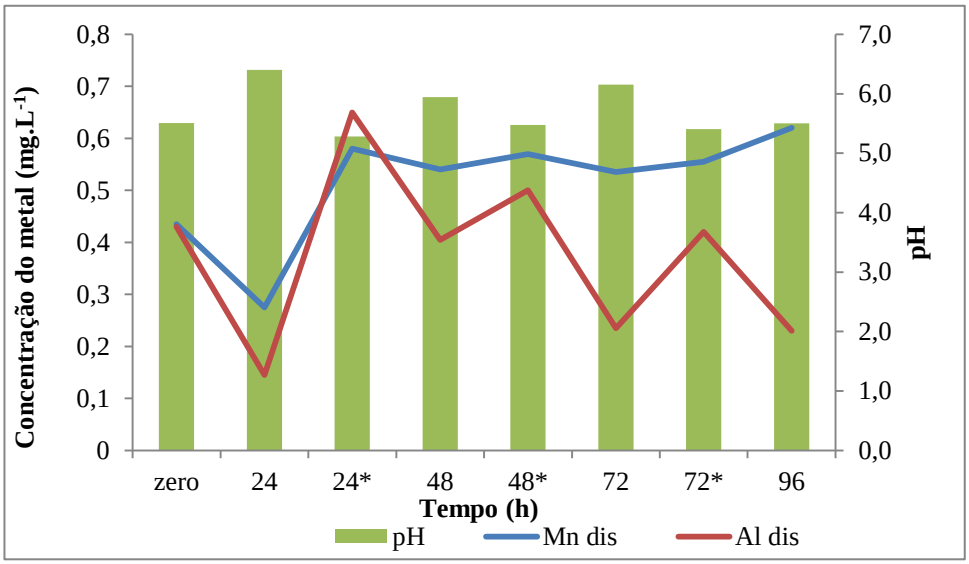

Figura 17. Concentração de Al e Mn dissolvido e variação de pH durante a exposição de 96 horas do período agudo (* representa a troca parcial de água).

4.2. Estádio de maturação de Astyanax bimaculatus

Uma vez que a proposta do presente estudo foi trabalhar com animais sexualmente maduros, algumas características foram importantes para nos informar que os animais se encontravam nesse estágio reprodutivo. Em primeiro lugar, quanto à morfologia externa, foi possível observar que quando maduros sexualmente, machos desta espécie apresentavam a nadadeira anal áspera, enquanto que em fêmeas essa característica não foi encontrada. Ou mesmo quando esses animais não estavam maduros sexualmente essa característica se tornava mais discreta, ou até mesmo imperceptível. Portanto, para a separação dos animais para o experimento, levou-se em conta em primeiro lugar esta aspereza da nadadeira anal. Além disso, ao iniciar a coleta dos tecidos foi verificado que as gônadas masculinas (testículos) se encontravam bem desenvolvidas e com a coloração esbranquiçada, evidenciando a presença de sêmen, além de ocupar grande proporção da cavidade celômica, indicando uma fase de maturação avançada do animal (Figura 18).

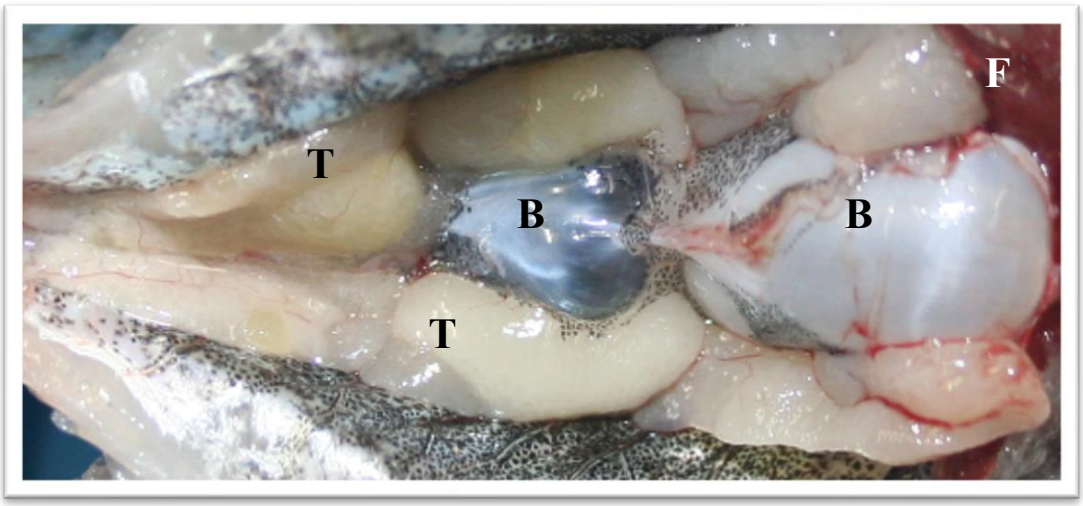

Figura 18. *Astyanax bimaculatus.* Macho adulto. T: testículos; B: bexiga natatória; F: fígado.

Além disso, outras análises como a histologia podem também confirmar o estágio reprodutivo do animal, trazendo informações mais detalhadas em relação à morfologia interna das gônadas, indicando a frequência de cistos contendo gametas em diferentes estágios de desenvolvimento, o que confirma o estágio de maturação. Nas secções histológicas foi possível evidenciar mais claramente o estádio reprodutivo

desses animais, visto que o lúmen estava preenchido por espermatozoides (Figura 19A), ocupando a maior parte deste espaço. A presença de cistos em diferentes fases de desenvolvimento da espermatogênese (Figura 19B) como espermatogônias (cabeça de seta branca), espermatócitos primários (SP) e secundários (SS) e cistos de espermátides (ST) organizados, evidenciaram a renovação dos estoques de espermatozoides no período reprodutivo. Foi interessante observar o exato momento do rompimento de um cisto de espermátides para o lúmen (Figura 19C), caracterizado como a fase final de maturação dos espermatozoides e assim a liberação dos gametas para a reprodução. A figura 19D destaca a célula de Sertoli, que está localizada ao redor dos cistos.

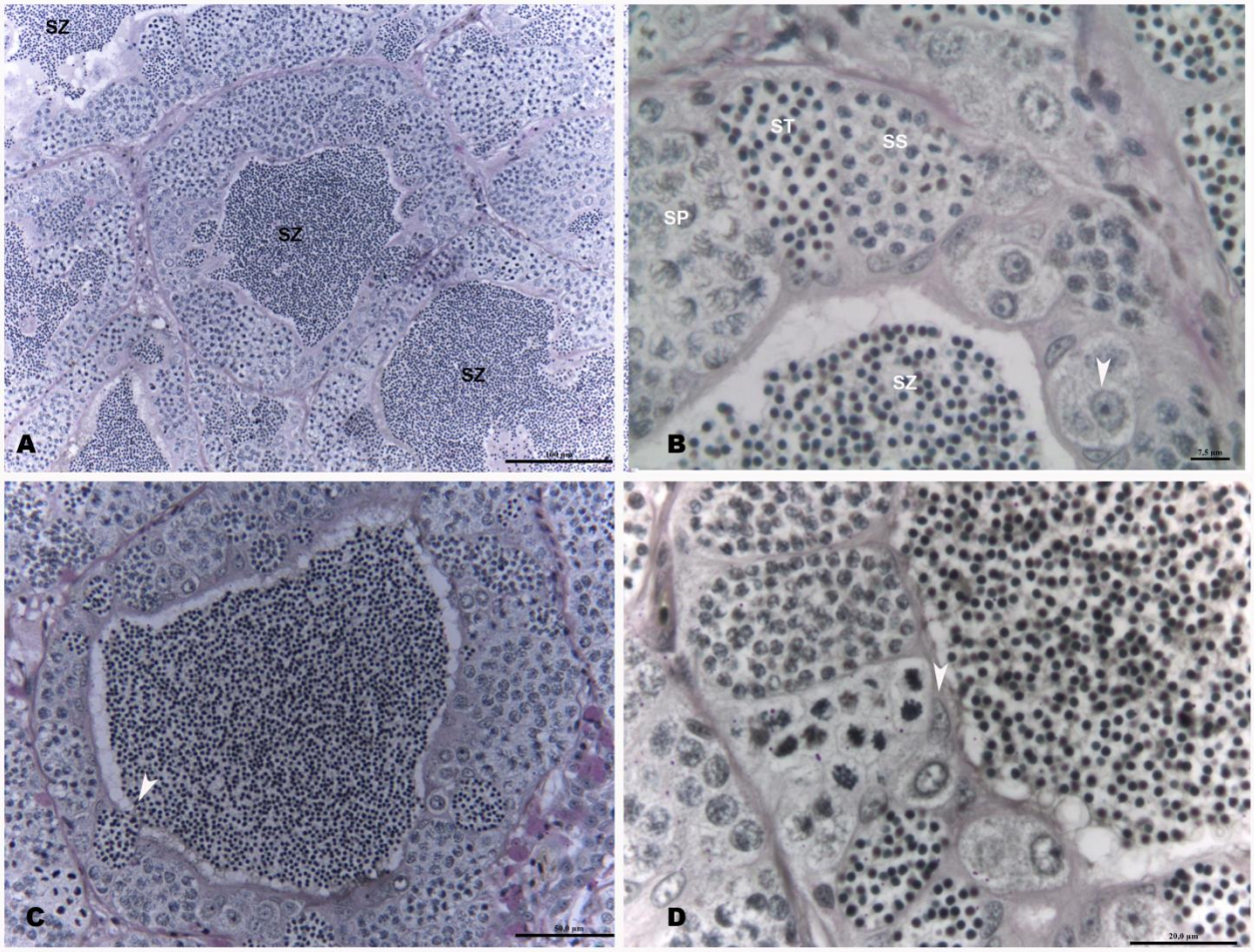

Figura 19: Secções histológicas de testículos de *Astyanax bimaculatus*. A) Visão geral do testículo com o lúmen preenchido com espermatozoides (SZ) e a presença de cisto em diferentes fases da espermatogênese; B) Visão detalhada, no qual há a presença de cistos formados por espermatogônias (cabeça de seta branca), espermatócitos primários (SP) e secundários (SS), e espermátides (ST), com o lúmen completo por SZ C) Detalhe para o cisto de espermátides rompendo para o lúmen (cabeça de seta branca); D) Visão detalhada com enfoque na célula de Sertoli, indicada pela cabeça de seta branca A) Barra= 100µm B) Barra=7,5µm C) Barra=50µm D) Barra=20µm. Hematoxilina-eosina, PAS+hematoxilina+*Metanil Yellow*.

4.3.Análises hormonais

4.3.1. Concentração plasmática de 11-cetotestosterona

Durante o período de exposição ao pH ácido, foi possível notar uma variação na concentração de 11-KT, no entanto, quando em exposição aos metais, houve uma tendência de elevação, mas que não se diferenciou dos efeitos causados pelo pH ácido. Portanto, houve um aumento na concentração de 11-KT em 24h nos animais do grupo pH-ac em relação ao CTR-n (P<0,001), mantendo os valores iguais após 96h de exposição. Já quando em exposição ao Al, houve uma elevação em 96h (P<0,001), no entanto, não foi estatisticamente diferente dos animais do grupo pH-ac (Figura 20A). Já o Mn, não apresentou essa tendência em aumentar a concentração além do que foi constatado para os animais do grupo pH-ac em 96h (Figura 20C). Os animais do grupo Al-Mn não apresentaram nenhuma alteração na concentração desse hormônio durante o período agudo de exposição (Figura 20E). Os animais do grupo CTR-n também apresentaram um aumento na concentração plasmática de 11-KT em 96h (P<0,001).

No período de recuperação, os animais dos grupos pH-ac, Al apresentaram uma recuperação já em 120h, não apresentando diferenças significativas em relação ao CTR-n (Figura 20B), embora ambos os grupos tenham apresentado um aumento significativo em 192h (P=0,013 e 0,001, respectivamente). Já os animais do grupo Mn apresentaram uma diminuição em relação ao CTR-n em 120h (P<0,001), se recuperando apenas em 192h (Figura 20D), porém também apresentaram um aumento nas concentrações em 192h (P<0,001), assim como os animais do grupo pH-ac (P=0,011). Os animais do grupo Al-Mn apresentaram uma diminuição em 192h (P=0,004) em relação ao CTR-n (Figura 20F). Assim como nos demais, os animais do grupo pH-ac apresentaram um aumento nas concentrações em 192h (P=0,008).

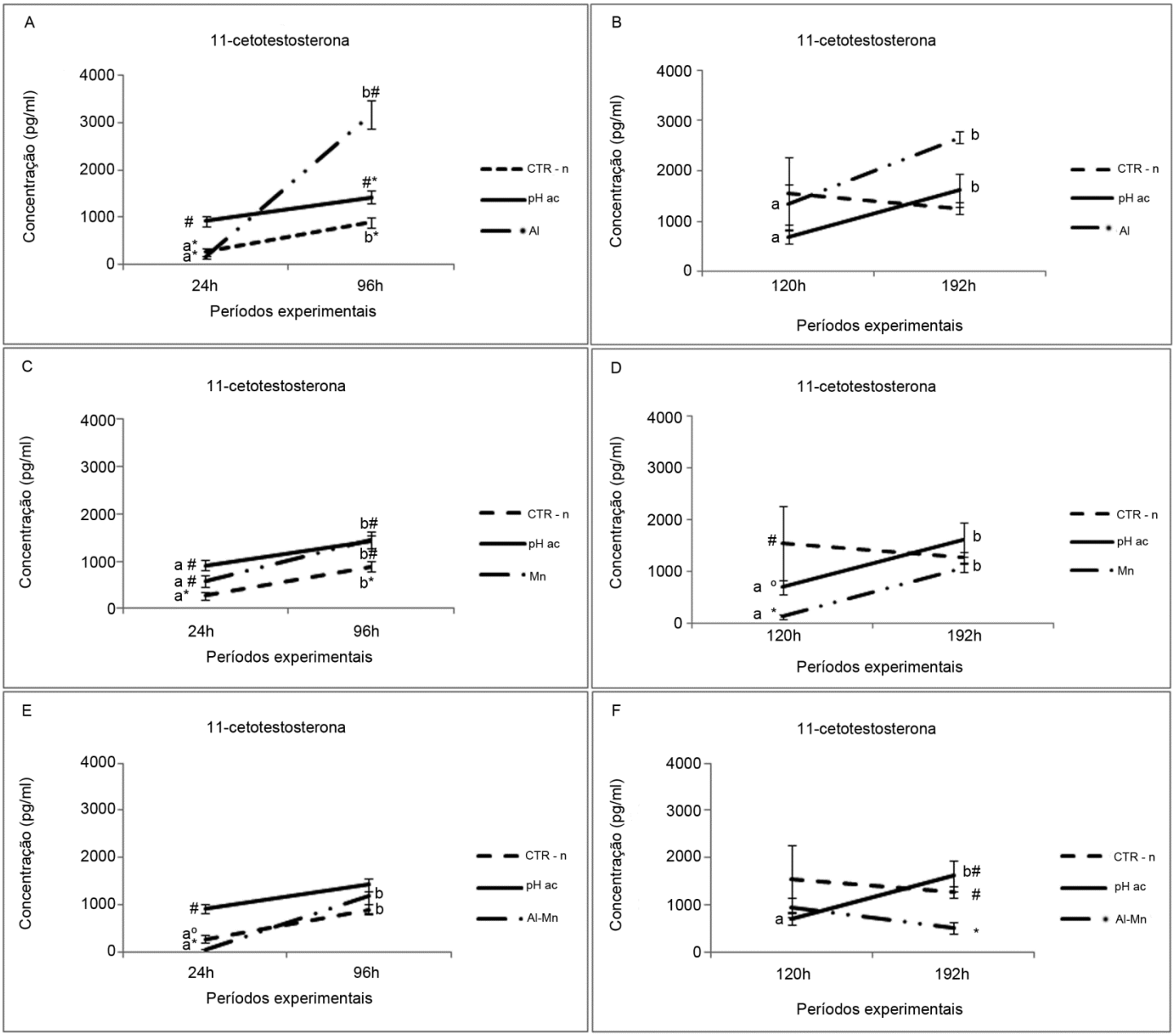

Figura 20: Concentração plasmática de 11-cetotestosterona em machos de *Astyanax bimaculatus* após exposição aguda (24 e 96 horas) e recuperação (120 e 192 horas). (A) Al agudo; (B) Al recuperação; (C) Mn agudo; (D) Mn recuperação; (E) Al-Mn agudo; (F) Al-Mn recuperação. Símbolos diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos em um mesmo período experimental. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os períodos experimentais em um mesmo grupo.

4.3.2. Concentração plasmática de testosterona

Em 24h, os animais dos grupos pH-ac e o Mn aumentaram a concentração de T (P<0,001 e 0,004, respectivamente), sendo que os animais do grupo pH-ac mantiveram os mesmos valores em 96h enquanto que os animais do grupo Mn aumentaram suas concentrações (P<0,001) (Figura 21C). Já o Al causou um aumento já em 24h (P=0,015) e também em 96h (P=0,007), ultrapassando as concentrações encontradas no grupo pH-ac (P<0,001) (Figura 21A). Os metais Al-Mn combinados não foram capazes de alterar as concentrações de T em 96h (Figura 21E).

No período de recuperação, os animais dos grupos CTR-n e Al apresentaram um aumento em 120h, enquanto que os animais do grupo pH-ac permaneceram em concentrações baixas, resultando em uma diferença significativa entre esses grupos em relação ao pH-ac (P<0,001 para ambos os grupos). Já em 192h, o quadro se alterou, uma vez que os animais do grupo Al se mostraram diferentes estatisticamente do grupo CTR-n (P=0,001) e do grupo pH-ac (P=0,02), e portanto houve a recuperação apenas dos animais do grupo pH-ac em 192h (Figura 21B). Em 120h, os animais do grupo Mn e pH-ac apresentaram uma diferença significativa em relação ao CTR-n (P<0,001 para ambos os grupos), no entanto em 192h eles foram capazes de se recuperar, se assemelhando aos valores encontrados para CTR-n (Figura 21D). Os animais do grupo Al-Mn, assim como no período agudo, não apresentaram diferenças significativas durante a recuperação, embora esteja diferente do grupo CTR-n em 120h (P<0,001) e em 192h (P=0,011) (Figura 21F).

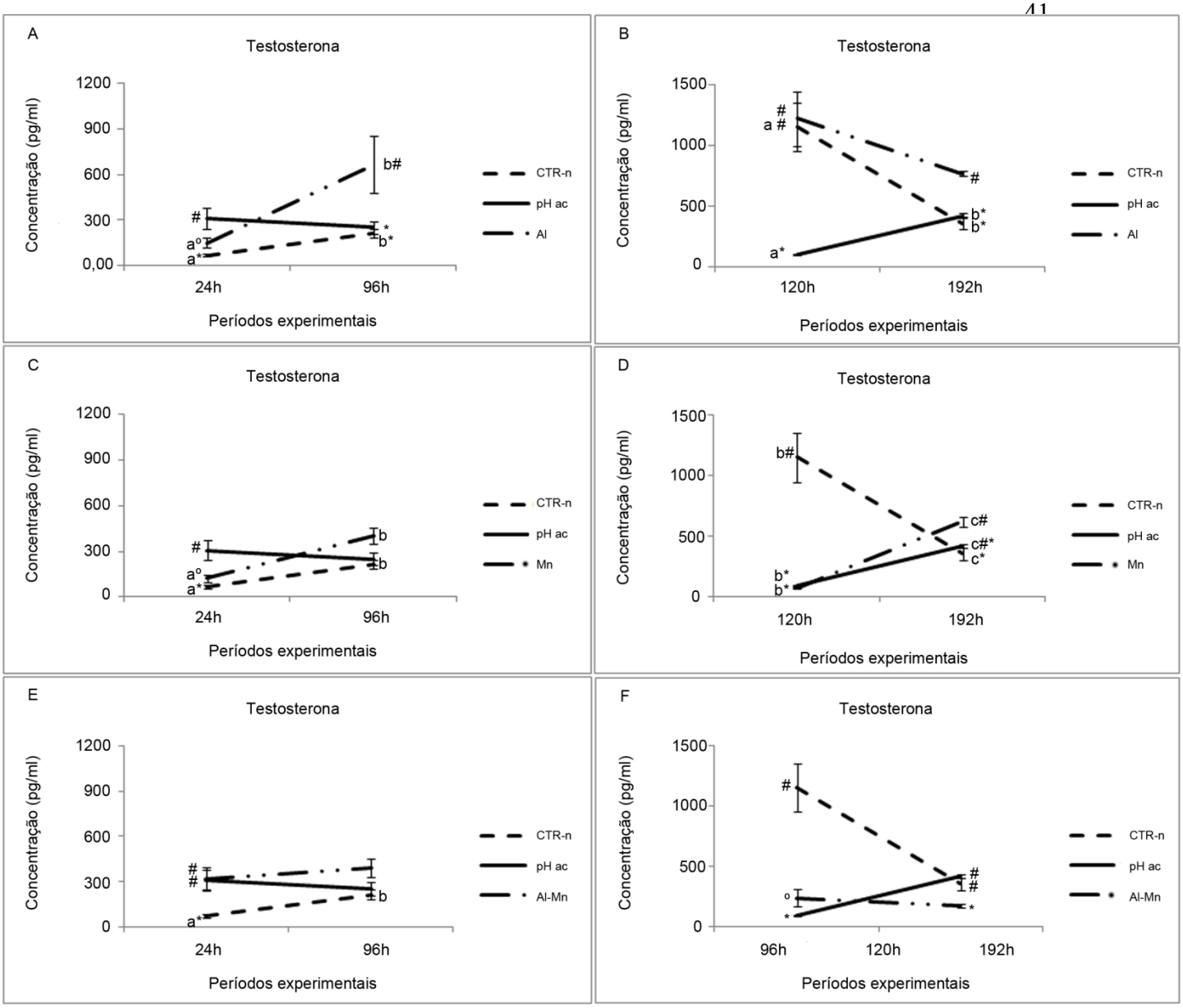

Figura 21: Concentração plasmática de Testosterona em machos de *Astyanax bimaculatus* após exposição aguda (24 e 96 horas) e recuperação (120 e 192 horas). (A) Al agudo; (B) Al recuperação; (C) Mn agudo; (D) Mn recuperação; (E) Al-Mn agudo; (F) Al-Mn recuperação. Símbolos diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos em um mesmo período experimental. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os períodos experimentais em um mesmo grupo.

4.3.3. Concentração plasmática de 17β-estradiol

Em relação às concentrações de E_2, os animais dos grupos CTR-n, o pH-ac, Al e Al-Mn apresentaram o mesmo perfil durante o período de exposição, apresentando uma diminuição após 96h (P<0,001 para todos) (Figuras 22A, 22E). Já nos animais expostos ao Mn, houve um aumento na concentração de E_2 em 24h em relação ao CTR-n (P=0,015) e ao pH-ac (P=0,013) (Figura 22C), porém os valores também diminuíram em 96h (P<0,001).

Todos os grupos foram capazes de se recuperar no período em água livre de metais, não apresentando diferenças significativas em relação ao CTR-n (Figuras 22B, D e F), podendo observar apenas uma diminuição na concentração plasmática de E_2 nos animais dos grupos Al-Mn em 192h (P=0,017), mas que se mantém igual ao CTR-n (Figura 22F).

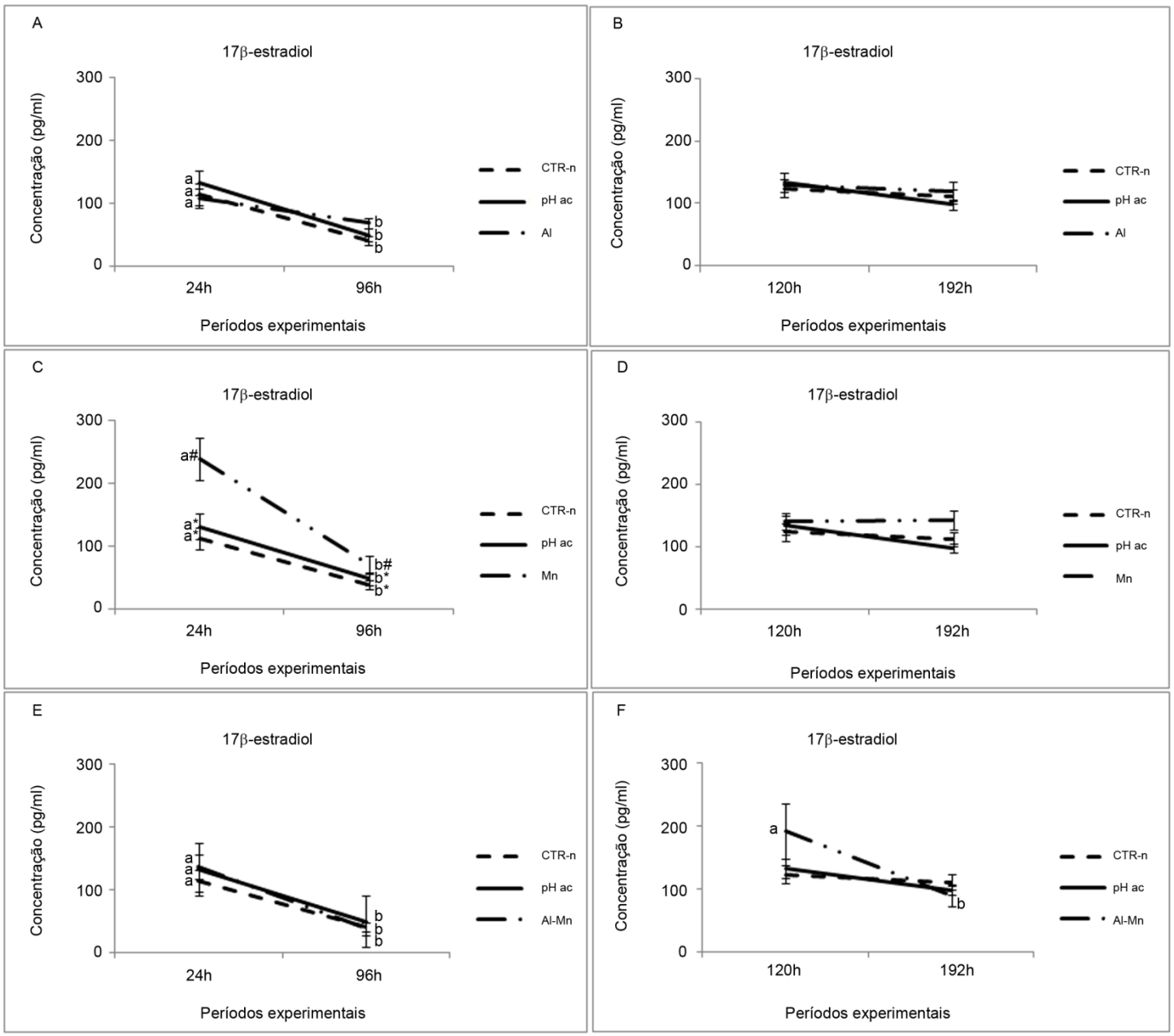

Figura 22: Concentração plasmática de 17β-estradiol em machos de *Astyanax bimaculatus* após exposição aguda (24 e 96 horas) e recuperação (120 e 192 horas). (A) Al agudo; (B) Al recuperação; (C) Mn agudo; (D) Mn recuperação; (E) Al-Mn agudo; (F) Al-Mn recuperação. Símbolos diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos em um mesmo período experimental. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os períodos experimentais em um mesmo grupo.

4.3.4. Efeitos nas concentrações de cortisol

A exposição ao pH ácido e aos metais não causaram alterações na concentração de C. Uma vez que não houve efeito, no período de recuperação os valores se mantiveram iguais ao período agudo. Apenas uma alteração foi verificada nos animais do grupo CTR-n, que apresentaram diminuição da concentração de C em 96h (P=0,007) (Figura 23A), o que manteve os valores deste esteroide nos animais deste grupo abaixo dos animais expostos ao pH ácido. Já na recuperação, esse mesmo grupo apresentou um aumento da concentração de C em 192h (P=0,001) (Figura 23B, D e F).

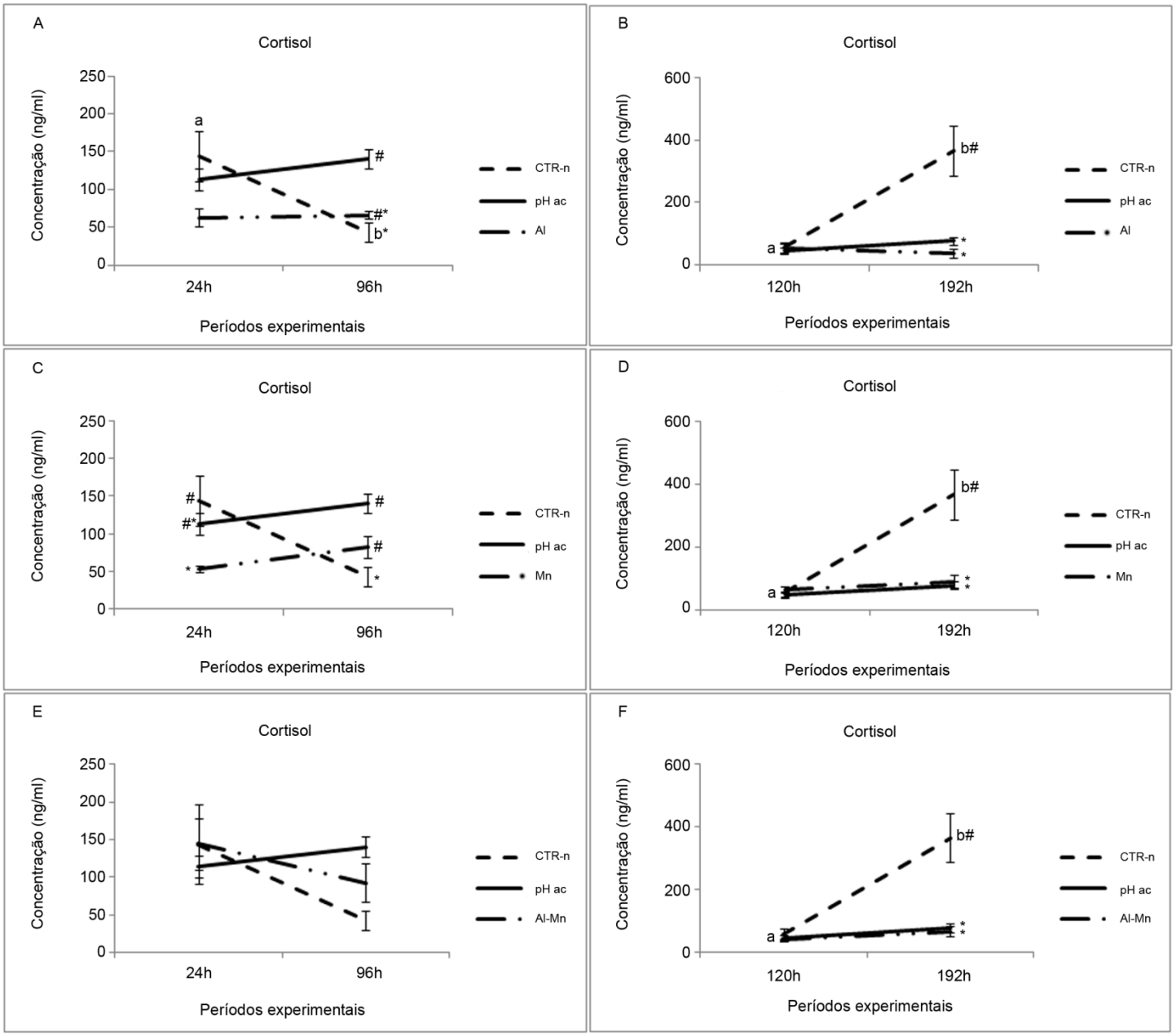

Figura 23: Concentração plasmática de cortisol em machos de *Astyanax bimaculatus* após exposição aguda (24 e 96 horas) e recuperação (120 e 192 horas). (A) Al agudo; (B) Al recuperação; (C) Mn agudo; (D) Mn recuperação; (E) Al-Mn agudo; (F) Al-Mn recuperação. Símbolos diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos em um mesmo período experimental. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os períodos experimentais em um mesmo grupo.

4.4.Concentração espermática

A concentração espermática se dá pelo número de espermatozoides presentes em 1ml de sêmen. Para isso foram realizadas diluições e cálculos para que fosse possível a contagem, a estimativa deste número e assim avaliar se os metais utilizados e o pH ácido influenciaram nesta variável. Antes do processo de contagem, algumas observações foram realizadas durante as coletas. Em alguns animais, quando realizado o processo de pressão abdominal para a extrusão do sêmen, não foi possível obter sêmen. No período de exposição aguda de 96 horas, dentre os 30 animais que foram amostrados, em 6 animais (independente do grupo experimental) não foi possível coletar sêmen mesmo após a pressão abdominal. Além disso, em outros casos, alguns animais mesmo com a extrusão do sêmen, na hora da contagem apresentaram poucos espermatozoides, pois a média normal observada era de 30 espermatozoides por quadrante da câmara hematimétrica de Neubauer, e esses animais, em específico, apresentavam menos de 10 espermatozoides por quadrante.

Um caso específico que ocorreu durante o período agudo foi a presença de um animal intersexo, uma vez que apresentava gônadas masculinas e femininas bem desenvolvidas (Figura 24). Esse animal se encontrava no grupo pH-ac, e especialmente nesse grupo, foram encontrados mais animais com poucos espermatozoides ou que não tenha sido possível coletar sêmen.

No período de recuperação não foi possível coletar sêmen em 7 animais dentre os 30 amostrados, e além disso, 5 animais apresentaram poucos espermatozoides por quadrante, com valores menores que a média, que também foi de 30 espermatozoides por quadrante.

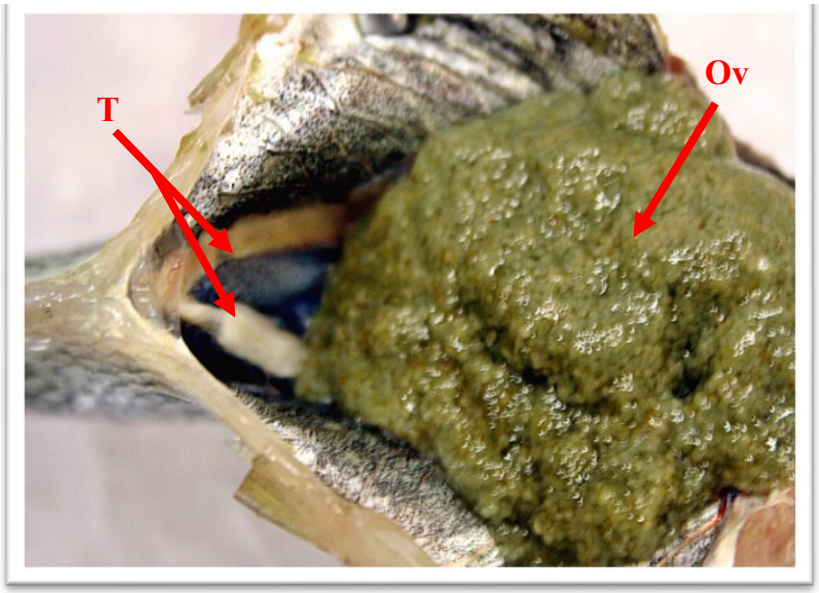

Figura 24. *Astyanax bimaculatus.* Animal intersexo. Legenda: T: testículos; Ov: ovários.

A partir da análise microscópica foi possível observar que ambas as gônadas apresentadas por esse animal se encontravam em estágio final de maturação, com a presença de estrutura que evidenciam essa situação. Do ponto de vista externo, o animal apresentava a sua morfologia masculina, com o corpo mais alongado e a aspereza da nadadeira anal, características essas específicas para machos dessa espécie. No entanto, em cortes histológicos realizados tantos nos ovários como nos testículos, mostraram a existência de estruturas como oócitos vitelogênicos e com núcleos centrais (Figuras 25 A e B), além de oócitos perinucleolares, ao passo que, os testículos desse mesmo espécime exibiram o lúmen completo por espermatozoides, além de cistos em diferentes fases de desenvolvimento espermatogênico (Figuras 25 C e D), o que mostra o seu estágio final de maturação.

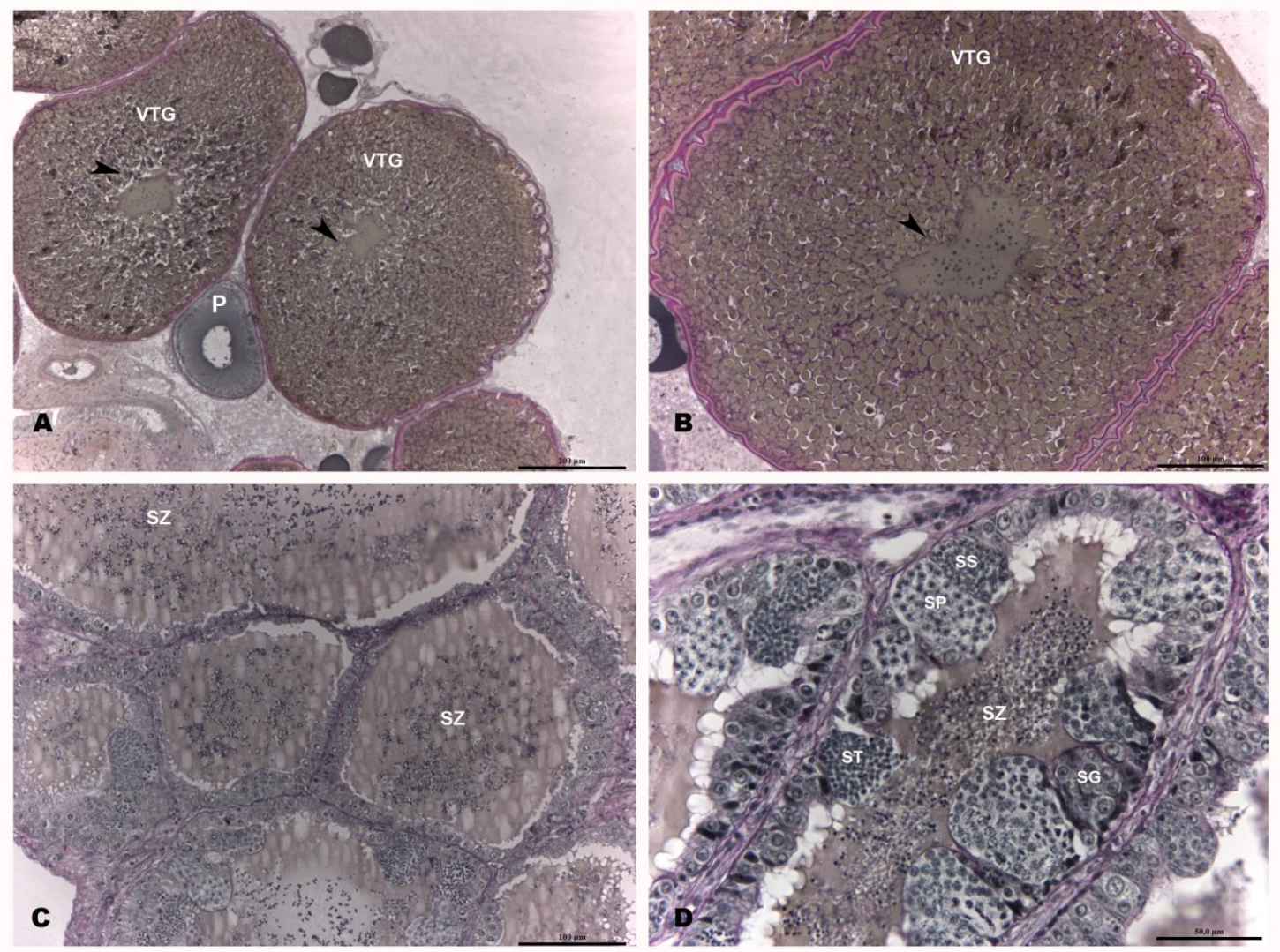

Figura 25: Secção histológica das gônadas de espécime intersexo de *Astyanax bimaculatus*. A) Ovários em fase de maturação avançada com a presença de oócitos vitelogênicos (VTG), com núcleos centrais (cabeça de seta preta) e oócitos perinucleolares (P); B) Visão detalhada de um oócito vitelogênico (VTG) com núcleo central (cabeça de seta preta); C) Testículos em fase de maturação final com a presença de lúmen completo por espermatozoides (SZ); D) Visão detalhada, evidenciando cistos de espermatogônias (SG), espermatócitos primários (SP), espermatócitos secundários (SS) e espermátides (ST). Barra: A) 200µm; B e C) 100µm; D) 50µm. Hematoxilina-eosina, PAS+hematoxilina+*Metanil Yellow*.

Após a contagem dos espermatozoides, foram constatadas algumas alterações na concentração espermática durante o período de exposição, e verificou-se uma diminuição na concentração em 96h nos animais do grupo pH-ac (P=0,020), sendo que o Al não causou nenhuma alteração significativa (Figura 26A). Quanto ao grupo de animais expostos ao Mn, houve uma diminuição na concentração espermática em 96h, assim como os animais dos grupos CTR-n e pH-ac (P=0,002) (Figura 26C). O grupo Al-Mn não apresentou nenhuma alteração durante o período de exposição aguda (Figura 26E).

Durante o período de recuperação, a concentração espermática nos testículos dos animais dos grupos pH-ac Al e Mn restabeleceram os valores em comparação ao CTR-n, demonstrando que o período de exposição em água livre de metais foi suficiente para que os animais se recuperassem do efeito da acidez da água e dos metais. No entanto, o grupo Al-Mn apresentou um aumento nos valores em 192h (P=0,017). No entanto os valores se mantiveram semelhantes ao CTR-n, indicando a capacidade de recuperação às condições iniciais (Figura 26F).

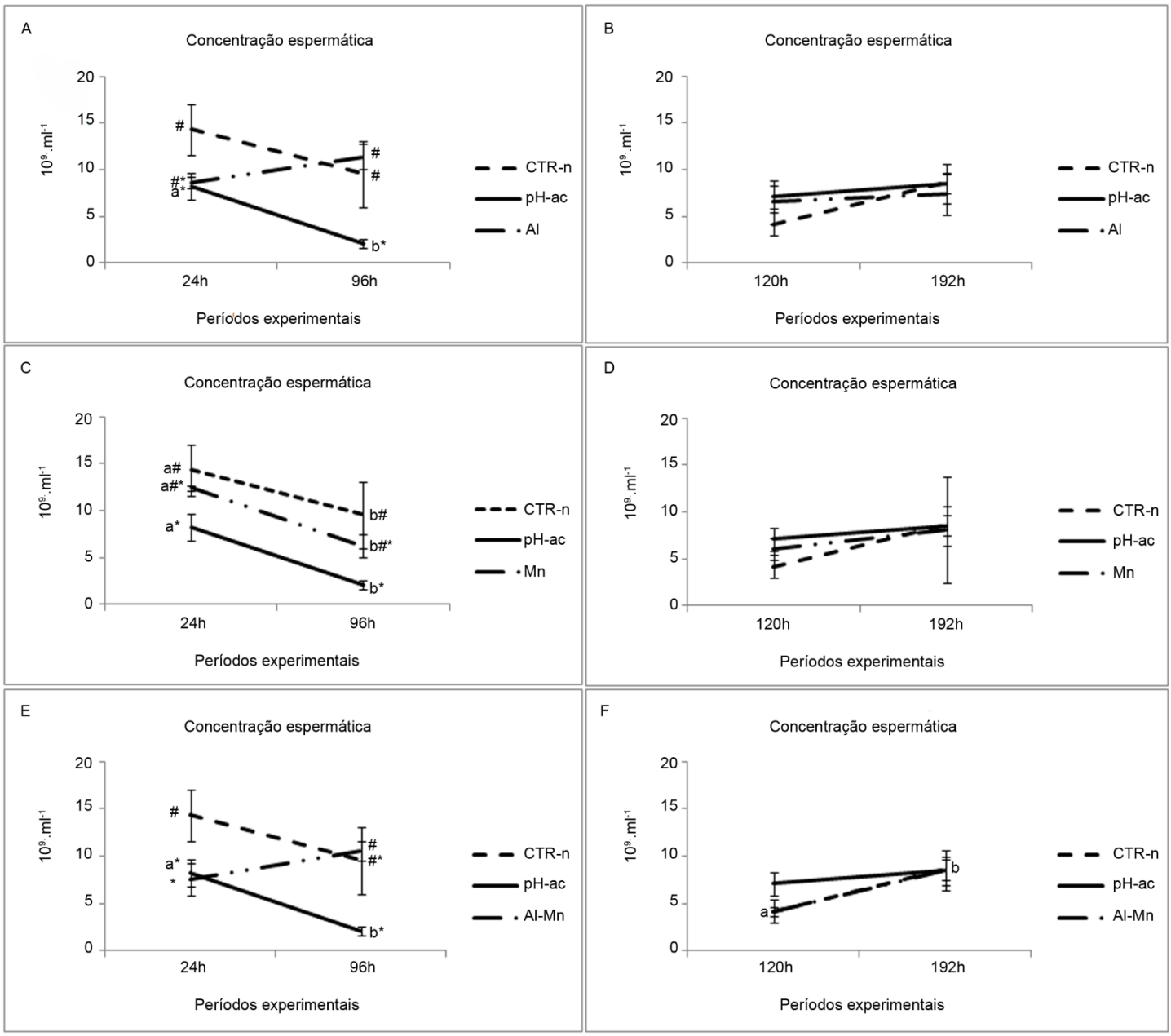

Figura 26: Concentração espermática em machos de *Astyanax bimaculatus* após exposição aguda (24 e 96 horas) e recuperação (120 e 192 horas). (A) Al agudo; (B) Al recuperação; (C) Mn agudo; (D) Mn recuperação; (E) Al-Mn agudo; (F) Al-Mn recuperação. Símbolos diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos em um mesmo período experimental. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os períodos experimentais em um mesmo grupo.

5. Discussão

5.1. Parâmetros físico-químicos da água

O pH é considerado um dos fatores mais importantes que influenciam a toxicidade de várias substâncias presentes na água, como os compostos nitrogenados (amônia, nitrato, nitrito), o cianeto e os metais (Aragão & Araújo, 2006). A solubilidade de metais, como o Al e Mn ocorre em função do pH e este é o fator abiótico mais importante no controle da toxicidade, principalmente do Al (Vuorinen *et al.*, 2003). Este fato foi observado no presente experimento, principalmente em relação ao Al, pois nos momentos em que o pH se apresentava mais baixo foram medidas as maiores concentrações de Al (após a troca de água). A partir do momento em que as características físico-químicas da água foram capazes de causar um tamponamento no valor do pH a concentração de Al tendia a diminuir. Esta diminuição na concentração pode ter ocorrido pela diminuição da solubilidade do metal na água e/ou deposição do metal nos tecidos dos animais.

Visto o papel do pH na solubilidade dos metais foi necessário o seu controle e monitoramento, garantindo assim que estes permanecessem biodisponíveis para os animais, motivo pelo qual o experimento foi conduzido em pH ácido. Para o valor de pH 5,5, determinado para esse experimento, as principais formas de Al encontrado são $AlOH^{2+}$ e $AlOH_2^{+}$ (Buckler *et al.*, 1995). Além disso, o monitoramento diário do pH foi realizado para não haver interferências nos resultados, já que o pH isoladamente foi capaz de afetar a concentração hormonal nos peixes.

A temperatura e o oxigênio dissolvido destacam-se também, sendo os principais fatores abióticos que podem interferir nos resultados de ensaios ecotoxicológicos (Aragão e Araújo, 2006). O oxigênio dissolvido influencia na toxicidade de várias substâncias dissolvidas na água, enquanto que a temperatura atua no metabolismo energético, e tem influência na solubilidade de muitas substâncias, inclusive do oxigênio, além de ser capaz de modificar a estrutura química de diversas substâncias dissolvidas (Aragão e Araújo, 2006). Portanto, é de grande importância manter sob condições ideais e controladas a concentração de oxigênio dissolvido e o valor da temperatura em estudos ecotoxicológicos, o que foi mantido no presente experimento,

para não haver interferências que potencialmente mascarassem os resultados decorrentes dos metais. As concentrações de oxigênio dissolvido foram mantidas acima de 6 $mg.L^{-1}$ durante o experimento, concentração esta considerada acima do requerimento mínimo da maioria dos teleósteos (Boyd, 1990); a temperatura se manteve estável, a 24,83ºC ± 0,14, o que é considerada ideal para peixes tropicais, já que engloba temperaturas de 22 a 28ºC (Huet, 1974).

Além disso, compostos nitrogenados, em altas concentrações podem ser deletérios para os peixes, podendo causar distúrbios fisiológicos e até a morte (Ruyet *et al*.,1997). Portanto, é necessário que haja o monitoramento e controle desses fatores para que não atuem negativamente sobre os organismos. Visto que a troca de 90% da água dos aquários era realizada diariamente, não ocorreu o acúmulo de compostos nitrogenados na água, não interferindo sobre os efeitos dos metais.

O carbono orgânico também pode atuar sobre a biodisponibilidade de metais, uma vez que contém grupos funcionais de ácido carboxílico negativamente carregados, que possuem a capacidade de se complexar a metais, incluindo o Al, dependendo do pH ambiental, o que pode alterar a biodisponibilidade dos metais (Dennis e Clair, 2012). Sugere-se que os valores encontrados na água não foram capazes de interferir sobre a conformação dos metais estudados.

5.2. Análises hormonais

As variações observadas na concentração plasmática dos esteroides gonadais, principalmente dos andrógenos evidenciam que os metais Al e Mn, além do pH ácido de forma isolada atuaram como desreguladores endócrinos em machos de *A. bimaculatus*. Adicionalmente, a manutenção dos animais por 96 horas adicionais em água livre de metais, na maioria dos casos, foi suficiente para a recuperação dos níveis iniciais destes hormônios, restabelecendo os valores encontrados para os animais do grupo CTR-n. Em experimentos conduzidos por Nilsen *et al.* (2013) em salmão do Atlântico, foram necessárias mais de duas semanas para uma recuperação total após exposição ao pH ácido e também ao Al no que diz respeito aos efeitos causados sobre funções fisiológicas. O pH ácido, uma condição necessária para que os metais estudados sejam mantidos biodisponíveis, de forma isolada foi um fator importante capaz de causar alterações nas concentrações plasmáticas de 11-KT e T, mostrando que apenas a acidificação do meio foi capaz de causar alterações na fisiologia reprodutiva dos animais. São bem estabelecidos os efeitos que a acidificação pode causar sobre os organismos e a capacidade em inibir a atividade reprodutiva de peixes (Sangalang, 1990). Haines e Baker (1986) reportaram que efeitos adversos sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução das populações de peixes têm sido diretamente atribuídos à acidificação das águas. Beamish (1974) já ressaltava que a acidificação dos ambientes é muitas vezes acompanhada pelo aumento na concentração iônica de metais pesados e o efeito de ambos é difícil de separar.

A chuva ácida tem causado redução e extinção de populações de salmão no sul da Noruega, desde o final do século XIX (Hesthagen e Hansen, 1991). Embora rios acidificados cronicamente tenham recebido mais atenção, vários estudos têm demonstrado efeitos fisiológicos graves e mortalidade de peixes nesses ambientes (Monette e McCormick , 2008). Essa condição tem causado alterações na fisiologia desses animais, como efeitos na osmorregulação, alterando os níveis de Na^+ e Cl^- e atividade da bomba Na^+/K^+, causados não apenas pela exposição ao pH ácido, mas também em conjunto à formas catiônicas de Al que se tornam biodisponíveis nessas condições (Nilsen *et al.*, 2013).

As alterações encontradas no presente trabalho sugerem que a via esteroidogênica de andrógenos sofreu alterações decorrentes da exposição aos metais e ao pH ácido, em momentos distintos do experimento. Hontela e Lacroix (2006)

ressaltam que a atividade enzimática pode ser afetada pela ação de metais, seja de forma estimulatória ou inibitória, e todos os tecidos e tipos celulares podem ser alvos de um desregulador endócrino (Lawrence *et al.*, 2003). Uma vez que a via pela qual os andrógenos sintetizados é a mesma, pode haver um aumento na atividade de enzimas envolvidas nessa via, e assim uma maior produção de T e 11-KT.

Essa produção elevada pode ser explicada pela alteração da tática reprodutiva dos animais (Vazzoler, 1996) que podem se ajustar a uma condição ambiental estressante, causada não só pelos metais mas também pelo pH ácido, e assim acelerar a maturação final dos gametas, processo que demanda altas concentrações de 11-KT, T, além de 17α20β DHP, garantindo o seu sucesso reprodutivo, como observado em fêmeas de *O. niloticus*, que apresentaram níveis mais elevados de progestágenos quando expostas ao pH ácido (Correia *et al*., 2010). O 11-KT induz a espermatogênese a partir da proliferação das espermatogônias até a fase de espermiogênese, permitindo que haja os processos de meiose até o momento da espermiação (Schulz *et al.*, 2010). No presente estudo, o aumento de 11-KT foi observado principalmente pelo efeito causado pelo pH ácido, uma vez que em exposição ao Al a concentração se manteve igual à resposta gerada pelo pH ácido. Já a T, embora menos efetiva que o 11-KT, também participa da espermatogênese e estimula a atividade hipotalâmica e hipofisária, e consequentemente, nesse caso, a ativação dos testículos (Weltzien *et al.*, 2002). Zelennikov *et al*. (1999) constataram um aumento nos níveis plasmáticos de T em juvenis de esturjão russo em exposição ao pH ácido, e atribuiu esse aumento como forma de manutenção da homeostase frente a condições estressantes do meio. O aumento de T foi constatado no grupo pH-ac em 24 horas, e quando em exposição ao Al foi observado um aumento ainda mais expressivo, sugerindo uma maior necessidade do organismo em se ajustar aos efeitos da exposição ao metal, com uma necessidade por hormônios andrógenos para finalizar a maturação.

Assim como o Al, a ação do Mn foi observada por Lee *et al.* (2006) e estes autores constataram que baixas concentrações desse metal foram capazes de induzir a produção de LH, FSH e T em machos de ratos, e induzir a maturação desses animais na fase pré-púbere, mesma situação observada para o hormônio T que teve sua concentração plasmática aumentada em *A. bimaculatus* após 96 horas de exposição ao Al e Mn. Além dos andrógenos, a concentração de E_2 também se elevou após 24 horas de exposição ao Mn, em relação aos grupos CTR-n e ao pH-ac, embora o perfil de diminuição da concentração em 96h tenha sido observado nesses três grupos. O E_2

possui uma importante participação nas fases iniciais de espermatogênese e renovação celular (Knapp e Carlisle, 2011), no entanto pelo fato desses animais se encontrarem já em uma fase final de maturação, a diminuição desse hormônio sugere uma mobilização principal dos andrógenos. Além disso, há a possibilidade de interferência dos metais e do pH ácido na enzima de conversão aromatase possibilitando o aumento da concentração de T (e 11-KT), e a consequente redução de E_2 (Lawrence *et al.*, 2003).

Diferente do observado para os andrógenos e estrógenos, o hormônio C não se alterou frente à exposição aos metais, isolados ou combinados e ao pH ácido isoladamente. Esse resultado se mostrou distinto do que é comumente observado na literatura, uma vez que, frente a uma situação de estresse, as vias de corticosteroides são ativadas, aumentando a produção desse hormônio para que respostas rápidas, como a manutenção da homeostase, sejam produzidas (Hontela e Lacroix, 2006). A concentração plasmática de C nos animais expostos aos metais se manteve igual aos animais do grupo CTR-n durante todo o período de exposição aguda, apresentando algumas variações apenas no grupo CTR-n, tanto no período agudo quanto na recuperação, podendo atribuir essas alterações a fatores como tempo de permanência nos aquários, já que neste período os animais se encontravam em água livre de metais. De alguma forma, o suposto estresse causado pela exposição aos metais não foi suficiente para induzir a resposta rápida de elevação de corticosteroides, ou ainda, a resposta pode ter ocorrido antes do período de coleta, realizado após 24 horas de exposição aos metais.

Ozaki *et al.* (2006) observaram que em baixas doses, o C é capaz de induzir a mitose de espermatogônias através do aumento na produção de 11-KT em enguias japonesas, enquanto que altas doses inibem esse processo. Os autores relacionam os efeitos estimulatórios à habilidade do C e das catecolaminas no processo de mobilização energética. Diante disso, a manutenção inalterada da concentração de C em *A. bimaculatus* sugere que a exposição aos metais não necessariamente tenha alterado o recrutamento energético diferenciado em machos de *A. bimaculatus*. Esse quadro é diferente daquele observado por fêmeas da mesma espécie, que alteraram o metabolismo de lipídios e proteínas (Vieira, 2012; Vieira *et al*., 2013) e apresentaram a concentração plasmática de C reduzidas (Correia, 2012) após a exposição ao Al e ao Mn, evidenciando que a sensibilidade das fêmeas aos metais demanda ajustes metabólicos mais pronunciados.

Em testes ecotoxicológicos, nos quais as condições são controladas para determinar especificamente os efeitos dos compostos químicos (Bertoletti, 2000), alterações nas condições da água, ausência da microbiota e alterações na alimentação podem gerar situações de estresse aos organismos, e mesmo que os metais não estejam mais atuando no período de recuperação ou no CTR-n, ou mesmo que as condições determinadas sejam adequadas para a sobrevivência dos animais, alterações como estas podem postergar os efeitos deletérios e ter estimulado a síntese desses hormônios. Porém, não só efeitos de confinamento, mas outras vias de ação podem ter desencadeado o aumento na concentração plasmática dos hormônios estudados na ausência dos metais e do pH ácido. A via esteroidogênica, na qual os andrógenos, assim como E_2 e os corticosteroides, como o C, são produzidos é a mesma e muitas relações entre estes hormônios já é conhecida, como a modulação da produção de C pelos estrógenos, produção de corticosteroides pelos testículos e até em algumas espécies, a estimulação da espermiação pelo cortisol (revisão em Milla *et al.*, 2009). Segundo Magalhães e Ferrão Filho (2008) uma situação de estresse surge quando algum fator ambiental se altera ou quando um organismo encontra-se fora de seu nicho ecológico, podendo sobreviver temporariamente a estas condições.

O período de permanência por 96 horas em água livre de metais foi suficiente, na para a recuperação dos níveis plasmáticos dos esteroides analisados na maioria das situações, visto que as concentrações hormonais, comparadas ao grupo CTR-n apresentaram valores similares a esse grupo. Essa resposta pode ser atribuída a diversos fatores relacionados às vias de síntese e/ou excreção hormonal, ou ainda processos como a sulfatação e glucoronidação podem ser ativados nesse momento, tornando os hormônios mais solúveis e assim, podem ser eliminados pela urina (Norman e Litwack, 1997).

O grupo dos teleósteos possui uma grande variedade de estratégias e táticas de sobrevivência, conferindo grande plasticidade ao ambiente em que vive e às condições impostas por esse local, sendo os Characiformes uma ordem em destaque, pois apresentam grande divergência fenotípica adaptativa, especificamente o gênero *Astyanax*, um dos mais comuns e diversificados da família Characidae com centenas de espécies (Orsi *et al*., 2004). Portanto, diante da alta plasticidade desse gênero, podem-se esperar diversas formas de respostas frente ao ambiente em que se encontram, pois, ao enfrentarem um ambiente poluído, estes podem alterar suas funções biológicas, como aqui observado. Ao se constatar que a perpetuação de uma espécie no ecossistema está

diretamente relacionada à sua capacidade reprodutiva, na presença de poluentes, esta precisa se ajustar às novas condições para permanecer no ambiente bem como garantir a sua reprodução (Kime, 1995).

Diversos estudos sugerem que a resposta ao estresse varia entre as espécies, dependendo principalmente do tempo em que esse estresse ocorre e a natureza do agente estressor (Schreck *et al.*, 2001). Essa diversidade ocorre uma vez que a resposta encontrada em um animal pode não ser a mesma em outro quando testada a mesma concentração de determinada substância potencialmente estressora, ou ainda, quando diferentes concentrações geram resultados distintos. Portanto, juntamente à plasticidade do animal, outros fatores podem atuar sobre uma resposta ao estresse. Os potenciais desreguladores endócrinos começam agir em níveis em que não há estresse ou desconforto aparente causados nos animais, podendo este sobreviver e se reproduzir tanto quanto um animal que não foi exposto a nenhum contaminante. Portanto, o estudo de potenciais contaminantes em baixos níveis de organização permite reconhecer o problema antes mesmo que este cause a morte dos organismos, e um futuro declínio de populações (Kime, 1999). Tendo em vista que os sistemas fisiológicos estão intrinsecamente relacionados, alterações no sistema endócrino podem desencadear respostas nas vias reprodutivas.

Os dados até então mostram que os metais podem ser considerados EDC´s, e são várias as vias pelos quais estes podem atuar e o pH ácido pode não só causar efeitos isoladamente como potencializar o efeito sobre as concentrações plasmáticas. O motivo pelo qual há um estímulo ou a inibição na produção de hormônios esteroides ainda é obscuro, no entanto, em vista da alta plasticidade dos peixes, particularmente desta espécie, ao testar concentrações sub-letais aos organismos, esses metais podem gerar efeitos sobre o sistema endócrino, mas não a ponto de gerar danos ao organismo como um todo (Kime e Nash, 1999). Vários estudos vêm sendo desenvolvidos para entender os efeitos de EDC´s na fisiologia dos organismos, no entanto, existe uma infinidade de fatores que influenciam nos efeitos, e nesse caso, ainda são necessárias ferramentas para elucidar os mecanismos de ação desses metais.

Nos últimos tempos, a poluição ambiental por agentes químicos, conhecidos como EDC´s tem estimulado ou bloqueado processos biológicos e estes compostos têm sido reconhecidos por interferir em vias sensíveis de hormônios que regulam as funções reprodutivas (Miura *et al.*, 1999). Quanto aos possíveis mecanismos pelos quais os metais podem atuar, Laskey e Phelps (1991) sugeriram que podem ocorrer diferentes

vias de atuação de cátions, como o cádmio, níquel, cobalto e zinco na inibição ou estimulação na produção de T. Os sítios de inibição estariam em etapas do processo anteriores à ação da P450scc (*side-chain cleavage*), enzima que quebra a cadeia lateral do colesterol, convertendo este precursor em pregnenolona. Já, segundo estes mesmos autores, os sítios de estimulação da produção de esteroides, desencadeada por estes cátions seriam nas etapas posteriores à ação da P450scc e a síntese de progesterona. Isso mostra que os cátions podem atuar em diferentes vias, inibitória/estimulatória como na membrana plasmática, adenilato ciclase, ou até mesmo na utilização de colesterol mitocondrial a partir de interações com íons cálcio, proteínas de membrana (P450scc) ou com lipídios (Mgbonyebi *et al.*, 1994).

Concluímos que o Al e o Mn, isoladamente ou combinados, assim como a acidez da água agem como EDC´s em machos de *A. bimaculatus* no período reprodutivo, principalmente estimulando a síntese de andrógenos, causando uma alteração no sistema fisiológico. O pH ácido, isoladamente, foi o principal fator que causou alterações na concentração dos hormônios esteroides. Fica claro ainda que a manutenção dos machos maduros nas condições experimentais também altera a concentração de andrógenos plasmático, independente de qualquer associação com metais ou variações de pH. Estes dados sugerem que a adoção de táticas reprodutivas alternativas desta espécie, no ambiente natural impactado, pode prejudicar de alguma forma a estratégia reprodutiva da espécie.

5.3. Concentração espermática

Os contaminantes podem alterar a qualidade do sêmen de diversas formas, seja alterando o número de espermatozoides ou mesmo a sua qualidade, podendo gerar espermatozoides defeituosos, assim como alterar o volume do líquido seminal e a motilidade dos espermatozoides, diminuindo a sua eficiência na fertilização (Kime e Nash, 1999). Por isso, optou-se por conhecer a dinâmica desta variável que poderia ser potencialmente influenciada pelos metais.

Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que os baixos valores de concentração espermática encontrado nos animais do grupo pH-ac pode ser decorrente da presença do animal intersexo presente nesse grupo, que pode ter estimulado a espermiação dos machos durante o período de exposição aos metais e assim, ter diminuído seus estoques de espermatozoides. O fato de existir um animal intersexo é

preocupante, pois não existem registros de que esse gênero possua tal característica. No entanto, registros de animais intersexo também já foram obtidos no estudo morfológico de testículos de *A. altiparanae*, inclusive com maior incidência no período do verão, quando os animais estão sexualmente maduros (Costa, 2011), assim como em *Astyanax fasciatus*, quando foram encontrados animais intersexo também no período reprodutivo, mas em regiões próximas a efluentes domésticos e agricultura, causando alterações na qualidade da água (Prado *et al.*, 2011).

A explicação mais pertinente é que a exposição desses animais a algum desregulador endócrino (Prado *et al.*, 2011) resulte em um animal com o desenvolvimento das gônadas tanto masculina quanto feminina, com a existência de gametas masculinos e femininos, o que mais uma vez pode ser resultado da alteração nos processos de aromatização da testosterona. Uma vez que se trata de um animal com gônadas femininas, este pode possuir grandes concentrações de hormônios como progestágenos, estrógenos e feromônios sexuais (Stacey, 2011), o que pode ter atuado sobre os demais animais, podendo estimular a espermiação destes.

Uma diminuição observada também no CTR-n e no grupo pH-ac pode indicar uma necessidade desses animais em adiantar a reprodução após um período de confinamento, uma vez que também pode ter gerado alguma forma de estresse nesses animais, indicando a necessidade de espermiação, assim como foi observado para alguns hormônios esteroides analisados nesse estudo, mostrando que outros fatores, principalmente abióticos, podem estar relacionados à resposta distinta também no grupo CTR-n.

Nas análises histológicas não foi possível indicar o motivo pelo qual houve uma diminuição na concentração espermática, uma vez que a maioria das lâminas indicava ou testículos em estádio avançado de maturação, com a presença de grande quantidade de espermatozoides no lúmen, ou de forma oposta, lumens vazios, indicando a espermiação desses animais, no caso, induzida para a contagem dos espermatozoides.

6. Conclusões

- Os metais Al e Mn, de forma isolada, além do pH ácido foram capazes de atuar como desreguladores endócrinos, permitindo um ajuste do animal às novas condições expostas;
- O pH ácido, isoladamente, foi o principal fator que causou alterações na concentração dos hormônios esteroides;
- O Al se mostrou mais prejudicial em relação ao Mn, causando alterações significativas na concentração plasmática de hormônios andrógenos.

7. Resumo

Os metais podem causar efeitos adversos de grande amplitude na função reprodutiva de animais, principalmente em organismos aquáticos. Eles podem alterar o sistema endócrino, atuando na esteroidogênese, afetando o processo reprodutivo dos peixes. Nosso objetivo foi investigar os efeitos dos metais alumínio (Al) e manganês (Mn) em pH ácido sobre a esteroidogênese de machos de *Astyanax bimaculatus*, sexualmente maduros, após uma exposição aguda de 96 horas e avaliar se os animais foram capazes de recuperar dos possíveis efeitos destes metais em água livre de metais. Esses animais foram expostos a uma concentração nominal de 0,5 $mg.L^{-1}$ de Al e Mn (isolados ou combinados), e os grupos experimentais foram mantidos em pH ácido (5,5) para manter os metais biodisponíveis. Foi realizada uma exposição aguda de 96 horas, com amostragens em 24h e 96h, e depois também um período de 96h em água livre de metais, com amostragens em 120h e 192h, a partir do o início do experimento. Foram determinadas as concentrações plasmáticas de testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-KT), 17β-estradiol (E_2) e cortisol (C) por ELISA. Além disso, foram realizadas análises histológicas dos testículos e avaliação da concentração espermática. Os metais estudados, além do pH ácido, foram capazes de aumentar as concentrações plasmáticas dos androgénos T e 11-KT. Também foi observado um aumento transitório de E_2 em 24h, mas apenas em animais expostos ao Mn e depois uma diminuição em 96h. A exposição ao pH ácido e metais, sozinhos ou combinados não provocou alterações nos níveis de C. Sendo assim, Al e Mn , assim como a acidez da água podem atuar como desregulador endócrino em machos de *A. bimaculatus*, principalmente por estimulação da síntese de androgénos, causando alterações no sistema fisiológico. Além disso, 96 horas foram suficientes para que os animais se recuperassem. Os testículos encontravam-se em estágio avançado de maturação, enquanto que a concentração espermática não apresentou alterações significativas que indicassem a atuação dos metais em conjunto ao pH ácido. Táticas reprodutivas podem ter sido utilizadas pela espécie para desencadear alterações na esteroidogênese testicular, principalmente acelerando o processo de espermatogênese e espermiogênese, o que pode interferir com a dinâmica reprodutiva.

8. *Abstract*

Metals can cause adverse wide range effects on reproductive function of animals, mostly in aquatic organisms. They can alter the endocrine system, acting on gonadal steroidogenesis, affecting the reproductive process of fish. We aimed to investigate the effects of the metals aluminum (Al) and manganese (Mn) in acidic pH on the steroidogenesis of *Astyanax bimaculatus* males, sexually mature, after an acute exposure of 96 hours and evaluate if the animals were able to recover of the possible effects of these metals in the water free of metals. Mature males were exposed to a concentration of 0.5 $mg.l^{-1}$ of Al and Mn (isolated or combined) and the experimental groups were maintained at acidic pH (5.5) to keep the metals bioavailable. We performed an acute exposure of 96 hours, with samplings at 24h and 96h, and then also a period of 96h in water free of metals, with samplings at 120h and 192h from the beginning of the experiment. We measured the plasma levels of testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT), 17β-estradiol (E_2) and cortisol (C) by elisaimmunoassay. Furthermore, histological analysis of testes and evaluation of the sperm concentration were performed. The metals studied, in addition to acidic pH, were able to alter the plasma concentration of the androgens T and 11KT. A transitory increase (24h) of E_2 levels was also observed, but only in animals exposed to Mn and then a decrease in 96h occurred. Exposure to acidic pH and metals, alone or combined did not trigger changes in C plasma levels. Generally, Al and Mn as well as the acidity of water can act as endocrine disruptor in *A. bimaculatus* males, mainly by stimulating the androgens synthesis, causing changes on physiological system. Furthermore, 96 hours in water free of metals were enough for the animals to recover from the effects of the metals. The testes were in the advanced stage of maturation, while sperm concentration was not significantly changed to suggest any influence of metals together with acidic pH in altering this variable. Reproductive tactic could be used by the species to trigger changes in testicular steroidogenesis, mainly accelerating the process of spermatogenesis and spermiogenesis, what may interfere with the reproductive dynamics.

9. Referências Bibliográficas

AMUTHA, C., SUBRAMANIAN, P. 2013. Cadmium alters the reproductive endocrine disruption and enhancement of growth in the early and adult stages of *Oreochromis mossambicus. Fish Physiology and Biochemistry* 39, 351-361.

ARAGÃO, M. A. & ARAÚJO, P. A. 2006. Métodos de Ensaios de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: P. A. ZAGATTO & E. BERTOLETTI (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática :Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, 117-152.

ARJONA, F. J., CHACOFF, L. V., MARTÍN DEL RIO, M. P., FLIK, G., MANCERA, J. M., KLAREN, P. H. M. 2008. The involvement of thyroid hormones and cortisol in the osmotic acclimation of *Solea senegalensis*. *General and Comparative Endocrinology* 155, 796–803.

ARUKWE, A. 2001. Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction. *Marine Pollution Bulletin* 42 (8), 643-655.

BANERJEE, A., KHAN, I. A. 2008. Molecular cloning of FSH and LH b subunits and their regulation by estrogen in Atlantic croaker. *General and Comparative Endocrinology* 155, 827-837.

BEAMISH, R. J. 1974. Loss of fish populations from unexploited remote lakes in Ontario, Canada as a consequence of atmospheric fallout of acid. *Water Research* 8, 85 -95.

BEHMER, O. A., TOLOSA, E. M. C., NETO, A. G. F. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, São Paulo, Livraria Editora Ltda. 239p.

BERTOLETTI, E. 2000. Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces: Cyprinidae). 117 p. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) - Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.

BOYD, C.E., 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Alabama, USA.

BRODEUR, J. C., DANIEL, C., RICARD, A. C., HONTELA, A. 1998. In vitro response to ACTH of the interregnal tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 42, 103-113.

BRODEUR, J. C., OKLAND, F., FINSTAD, B., DIXON, G., MCKINLEY, R. S. 2001. Effects of subchronic exposure to aluminium acidic water on bioenergetics of

Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 226-234.

BUCKLER, D. R., CLEVELAND, L., LITTLE, E. E., BRUMBAUGH, W. G. 1995. Survival, sublethal responses, and tissue residues of Atlantic salmon exposed to acidic pH and aluminum. *Aquatic Toxicology* 31, 203-216.

CALOW, P. 1993. *Handbook of Ecotoxicology*. Oxford: Blackwell Sciences v. 1, 478p.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. 2012. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente.

CHENG, J., FU, J. L., ZHOU, Z, C. 2003. The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Toxicology* 187, 139 -148.

CORREIA, T. G. 2008. Influência do alumínio e do pH ácido sobre a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos continentais. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 204p.

CORREIA, T. G. 2012. Evidências de desregulação endócrina causada pela exposição aquática ao Alumínio e ao Manganês em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758). Tese de Doutorado. 140p. Programa em Fisiologia Geral, IBUSP. 140p.

CORREIA, T. G., NARCIZO, A. M., BIANCHINI, A., MOREIRA, R. G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* Part C 151, 61–66.

COSTA, F. G. 2011. Testículo de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000). Estudo Morfológico, Ultraestrutural e Imuno-histoquímico. Tese de Doutorado. Programa em Biologia Celular e Tecidual, ICBUSP, 28p.

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).

DENNIS, I. F, CLAIR, T. A. 2012. The distribution of dissolved aluminum in Atlantic salmon (*Salmo salar*) rivers of Atlantic Canada and its potential effect on aquatic populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 69, 1174-1183.

DEPLEDGE, M. H., AAGAARD A., GYORKOST, P. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* vol. 31, 19-27.

EXLEY, C., CHAPPELL, J. S., BIRCHALL, J. D. 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *Journal of Theoretical Biology* 151, 417-428.

HAINES, T. A., BAKER, P. 1986. Evidence of fish population responses to acidification in the eastern United States. *Water Air & Soil Pollution* 31, 605-629.

HEATH, A. G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. Boca Raton; CRC Press, 359p.

HESTHAGEN, T., HANSEN, L.P. 1991. Estimates of the annual loss of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway due to acidification. *Aquaculture and Fishery Management* 22, 85-91.

HONTELA, A., LACROIX, A. 2006. Heavy Metals. In: NORRIS, D., CARR, J. A. 2006. Endocrine disruption: biological bases for health effects in wildlife and humans. Nova York: Oxford University Press. 493p.

HUET, M. 1974. Tratado de Piscicultura. Madrid: Mundiprensa.

HWANG, U. K., KAGAWA, N., MUGYIA, Y. 2000. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol - 17β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 119, 69 - 76.

IAVICOLI, I, FONTANA, L, BERGAMASCHI, A. 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health* Part B, 12:206–223.

KALEMBKIEWICZ, J., SITARZ-PALCZAK, E., ZAPALA, L. 2008. A study of the chemical forms or species of manganese found in coal fly ash and soil. *Microchemical Journal* 90, 37 – 43.

KARELS, A. E., SOIMASUO, M., LAPPIVAARA, J., LEPPANEN, H., ALTONEN, T. MELLANEN, P., OIKARI, A. O. J. 1998. Effects of ECF- bleached Kraft Mill effluent on reproductive steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach. *Ecotoxicology* 7, 123-132.

KIME, D. E. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Fish Biology and Fisheries* 5, 52-96.

KIME, D. E. 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Science of the Total Environment* 225, 3–11.

KIME, D. E., EBRAHIMI, M., NYSTEN, K., ROELANTS, I., RURANGWA, E., MOORE, H. D. M., OLLEVIER, F. 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic Toxicology* 36, 223-227.

KIME, D. E., NASH, J.P. 1999. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *The Science of the Total Environment* 233, 123-129.

KNAPP, R., CARLISLE, S. L. 2011. Testicular Function and Hormonal Regulation in Fishes. In: NORRIS, D. O., LOPEZ, K. H. 2011. *Hormones and Reproduction of vertebrates: fishes*, Elsevier, 43-63.

KORF, H. W. 2006. The pineal organ. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G. (Eds) *Fish Endocrinology* v2, USA. Science Publishers. 541- 567.

LAFUENTE, A. 2013. The hypothalamic–pituitary–gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food and Chemical Toxicology* 59, 395-404.

LASKEY J. W., PHELPS, P. 1991. Effect of cadmium and other metal cations on in vivo Leydig cell testosterone production. *Toxicology and Applied Pharmacology* 108, 296–306.

LAWRENCE, A.J., ARUKWE, A., MOORE, M., SAYER, M., THAIN, J. 2003. Molecular/cellular Processes and the physiological Response to Pollution. In: LAWRENCE, A. J., HEMINGWAY, K. L. Effects of pollution on fish: Molecular effects and Population Responses. Oxford: Blackwell Publishing. 83-133.

LEE, B., PINE, M., JOHNSON, L., RETTORI, V., HINEY, J. K., DEES, W. L. 2006. Manganese acts centrally to activate reproductive hormone secretion and pubertal development in male rats. *Reproductive Toxicology* 22, 580–585.

LIMA, L. C., RIBEIRO, L. P., LEITE, R. C., MELO, D. C. 2006. Estresse em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 30 (3/4), 113 – 117.

MAGALHÃES, D. P., FERRÃO FILHO, A. D. 2008. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* 12(3), 355-381.

MASSON, N. GUÉROLD, F., DANGLES, O. 2002. Use of blood parameters in fish to assess acidic stress and chloride pollution in French running waters. *Chemosphere* 47, 467-473.

MATTHIESSEN, P., JOHNSON, I. 2007. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environmental Pollution* 146, 9-18.

MGBONYEBI, O. P., SMOTHERS, C. T., MROTEK, J. J. 1994. Modulation of adrenal cell functions by cadmium salts: 3. Sites affected by CdCl2 during stimulated steroid synthesis. *Cell Biology and Toxicology* 10, 35–43.

MILLA, S., WANG, N., MANDIKI, S.N.M., KESTEMONT, P. 2009. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology* part A 153, 242-251.

MIURA, T., MIURA, C., OHTA, T., NADER, M. R., TODO, T., YAMAUCHI, K. 1999. Estradiol-17β Stimulates the Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Males. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 230-234.

MONETTE, M.T., McCORMICK, S. D. 2008. Impacts of short-term acid and aluminum exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) physiology: A direct comparison of parr and smolts. *Aquatic Toxicology* 86, 216-226.

NARCIZO, A.M. 2009. Avaliação da exposição aguda ao alumínio e alumínio em pH ácido na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis niloticus*. Dissertação de Mestrado. Programa em Fisiologia Geral, IBUSP. 82p.

NARCIZO, A.M. 2014. Efeitos in vitro do alumínio como desregulador endócrino sobre a hipófise e ovários de *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Teste de Doutorado. Programa em Fisiologia Geral, IBUSP. 68p.

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

NILSEN, T. O., EBBENSON, L. O. E., HANDELAND, S. O., KROGLUND, F., FINSTAD, B., ANGOTZI, A. R., STEFANSSON, S. O. 2013. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts require more than two weeks to recover from acidic water and aluminum exposure. *Aquatic Toxicology* 142-143, 33-44.

NORMAN, A. W., LITWACK, G. (Eds). 1997. Hormones. California, Academic Press, 557p.

ORSI, M. L., CARVALHO, E. D. FORESTI, F. 2004. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21(2), 207-218.

OZAKI, Y., HIGUCHI, M., MIURA, C., YAMAGUCHI, S., TOZAWA, T., MIURA, T. 2006. Roles of 11β-hydroxyteroid dehydrogenase in fish spermatogenesis. *Endocrinology* 147, 5139-5146.

PARTRIDGE, G. J., LYMBERY, A. J. 2009. Effects of manganese on juvenile mulloway (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity-Implications for inland mariculture. *Aquaculture* 290, 311-316.

PAVANELLI, C.S. CARAMASCHI, E.P. 1997. Composition of the ichthyofauna of two small tributaries of the Paraná river, Porto Roci, Paraná State, Brazil. *Ichthyological Exploration Freshwater* 8(1), 23-31.

PINE, M., LEE, B., DEARTH, R., HINEY, J. K., DEES, W. L. 2005. Manganese acts centrally to stimulate Luteinizing Hormone secretion: a potential influence on female pubertal development. *Toxicological Sciences* 85, 880-885.

POLÉO, A. B. S., OXVENAD, S. A., OSTBYE, K., ANDERSEN, R. A., OUGHTON, D. H. and VSLLESTAD, L. A. 1995. Survival of crucian carp, *Carassius carassius***,** exposed to a high low molecular weight inorganic aluminium challenge. *Aquatic Sciences* 57, 350-359.

PLAA, G.L. 1982. Present status: toxic substance in the environmental. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 60, 1010-1016.

PRADO, P. S., SOUZA, C.C., BAZZOLI, N., RIZZO, E. 2011. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1879-1887.

PRESTIFILIPPO, J. P., FERNÁNDEZ-SOLARI, J., MOHN, C., LAURENTIIS, A., MCCANN, S. M., DEES, W. L., RETTORI, V. 2007. Effect of manganese on Luteinizing Hormone–Releasing Hormone secretion in adult male rats. *Toxicological Sciences* 97(1), 75-80.

QUINTERO-HUNTER, I., GRIER, H.J., MUSCATO, M. 1991. Enhancement of histological detail using yellow as countersatin in period acid Schiff´s hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotechnic and Histochemistry* 66, 169-172.

ROCHA, M, J., ROCHA, E. 2006. Morphofunctional aspects of reproduction form synchronus to asynchronus fishes – An overview. 570 – 624. In: REINECKE, M., ZACCONE, G. & KAPPOR, B. G. 2006. *Fish Endocrinology. Science Publishers* V. 02, 871p.

RUYET, J. P. L.; GALLAND, R.; ROUX, A. L.; CHARTOIS, H. 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154, 155-171.

SAMPAIO, W. M. S., ALMEIDA, F. B. 2009. Lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Bicho da vez*, Museu de Zoologia João Moojen, Universidade de Viçosa 10, 1-3.

SANCHES, E.A. 2010. Reprodução em peixes de água doce e sua aplicação na Piscicultura. Disciplina pós-graduação, CAUNESP, 18p.

SANDOY S., LANGAKER, R. M. 2001. Atlantic salmon and acidification in Southern Norway: a disaster in the 20th century, but a hope for the future? *Water Soil and Air Pollution* 130, 1343-1348.

SANGALANG, G.B., FREEMAN, H.S., UTHE, J.F., SPERRY, L.S., 1990. Effects of diet or liming on steroid hormone metabolism and reproduction in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) held in an acidic river. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 47, 2422–2430.

SAXENA, D. K., MURTHY, R. C., SINGH, C. 1989. Zinc protects testicular injury induced by concurrent exposure to cadmium and lead in rats. *Research Communications in Chemical Patology and Pharmacology* 64, 317-219.

SCHRECK, C. B., CONTRERAS-SANCHEZ, W., FITZPATRICK, M. S. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197, 3-24.

SCHULZ, R. W., FRANÇA, L. R., LAYERE, J. J., LEGAC, F., CHIARINI-GARCIA, H., NOBREGA, R. H., MIURA, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 390-411.

SEMEZIN, E., CRITTO, A., CARLON, C., RUTGERS, M., MARCOMINI, A. 2007. Development of a site-specific ecological risk assessment for contaminated sites: part II. A multicriteria based system for the selection of bioavailability as assessment tools. *Science of the Total Environment* 379, 34-35.

SMITH, S. E., MEDLICOTT, M., ELLIS, G. H. 1944. Manganese deficiency in the rabbit. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 4, 281–289.

STACEY, N. 2011. Hormonally Derived Sex Pheromones in Fishes. In: NORRIS, D. O., LOPEZ, K. H. 2011. *Hormones and Reproduction of vertebrates: fishes*, Elsevier, 169-192.

TEIEN, H. C., SALBU, B., KROGLUND, F., HEIER, L, S., ROSSELAND, B. O. 2007. The influence of colloidal material on aluminium speciation and estimated acid neutralising capacity (ANC). *Applied Geochemistry* 22, 1202-1208.

VAZZOLER, A.E.A.M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá, EDUEM, 169p.

VIEIRA, M. C., TORRONTERAS, R., CÓRDOBA, F., CANALEJO, A. 2012. Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 212 – 217.

VIEIRA, V. A. R. O. 2012. Avaliação da toxicidade de metais no metabolismo de fêmeas vitelogênicas de *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae). Tese de Doutorado. Programa em Fisiologia Geral, IBUSP, 158p.

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. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part C 157, 1-8.

VUORINEN, P. J., KEINANEN, M., SEPPO, P., TIGERSTEDT, C. 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and Gill histology of vendace (*Coregonus albula L.*) in long-term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 255-276. *Toxicology in Vitro* 25, 294-300.

WARING, C. P., BROWN, J. A., COLLINS, J. E., PRUNET, P. 1996. Plasma prolactin, cortisol, and thyroid responses on the Brown Trout (*Salmo trutta*) exposed to lethal and sublethal aluminium in acidic soft waters. *General and Comparative Endocrinology* 102, 377-385.

WENDELAAR BONGA, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591–625.

WELTZIEN, F. A., TARANGER, G. L., KARLSEN, O., NORBERG, B. 2002. Spermatogenesis and related plasma androgen levels in Atlantic halibut

(*Hippoglossus hippoglossus L.) Comparative and Biochemistry Physiology* Part A 13, 567-575.

ZAGATTO, A. P., BERTOLETTI, E. (Eds) 2006. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima, 464p.

ZELENNIKOV, O.V., MOSYAGINA, M. V., FEDOROV, K. E. 1999. Oogenesis inhibition, plasma steroid levels, and morphometric changes in the hypophysis in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt) exposed to low environmental pH. *Aquatic Toxicology* 46, 33–42.

ZHOU, Q., ZHANG, J., FU, J., SHI, J., JIANG, G. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* 606, 135–150.

ZOHAR, Y., MUÑOZ-CUETO, J. A., ELIZUR, A., KAH, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 438-455.