

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA SOBRE PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO E VIABILIDADE
MITOCONDRIAL DE JUNDIÁS EXPOSTOS AO
MANGANÊS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Geisa Sorezina Dolci

Santa Maria, 2012.

INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E VIABILIDADE MITOCONDRIAL DE JUNDIÁS EXPOSTOS AO MANGANÊS

por

Geisa Sorezina Dolci

Dissertação de Mestrado apresentada no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em toxicologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilise Escobar Bürger
Co-orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO E VIABILIDADE MITOCONDRIAL DE JUNDIÁS
EXPOSTOS AO MANGANÊS**

elaborada por
Geisa Sorezina Dolci

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marilise Escobar Bürger, Dra.
(Presidente/Orientadora)
(UFSM)

Adriana Regina Chippari Gomes, Dra.
(UVV)

Carlos Fernando de Mello, Dr.
(UFSM)

Tatiana Emanuelli, Dra.
(UFSM)

Santa Maria, fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Marilise, pela orientação neste trabalho, pelo exemplo de profissional e mãe dedicada, sempre atenta a idéias inovadoras, pelo esclarecimento nos momentos de angústia, por todos os ensinamentos durante esses dois anos de curso.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Bernardo, pelo exemplo de serenidade, generosidade, simplicidade, e além do exemplo de profissionalismo, pelos ensinamentos e atenção ao longo do curso.

Agradeço ao laboratório colaborador representado pelos professores Valderi L. Dressler e Érico M. M. Flores e pelo doutorando Matheus A. G. Nunes pela dedicação e rapidez dos resultados.

À CAPES, pela bolsa concedida, ajuda sem a qual não seria possível à realização desse sonho.

Ao centro de estudos de Adaptação da Biota Aquática da Amazônia (Adapta) por possibilitar esse estudo.

Aos meus pais e familiares, pela compreensão de minha ausência, por todo incentivo e amor, por todas as grandes lições de vida. Pelo exemplo de humildade, sinceridade e honestidade.

Aos meus amigos, aqueles do tempo de escola, que mesmo presenteados com minha ausência, nunca desistiram de nossa sincera amizade, além de todos aqueles que estiveram presentes durante esses dois anos.

Aos amigos companheiros de laboratório, peças fundamentais na execução do trabalho, sempre dispostos a ajudar. Em especial, à Deborah e ao “tio Heco”, alunos de iniciação científica, muito presentes nos experimentos e à tia “Dali”, pessoas muito especiais para mim. Tenho certeza que a amizade de vocês foi presente divino. Obrigada pelas demonstrações de carinho, incentivo e companheirismo.

Aos alunos do Laboratório de Fisiologia de Peixes da UFSM, em especial a bióloga Ana Paula Riffel (meu braço direito durante os experimentos) e Luciane Gressler, pelos cuidados veterinários demonstrados aos meus peixinhos.

Aos peixes que doaram a sua vida para tornar possível esse estudo, minha gratidão.

E por último e mais importante, a Deus por colocar em meu caminho tantas pessoas maravilhosas com quem tive (e espero continuar tendo) a oportunidade de aprender e crescer como pessoa e como profissional.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E VIABILIDADE MITOCONDRIAL DE JUNDIÁS EXPOSTOS AO MANGANÊS

AUTORA: GEISA SOREZINA DOLCI

ORIENTADORA: MARILISE ESCOBAR BÜRGER

CO-ORIENTADOR: BERNARDO BALDISSEROTTO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 1º de fevereiro de 2012.

A contaminação do meio aquático por metais tem sido um problema crescente para à vida de diferentes espécies, mesmo depois de interrompida sua emissão no ambiente. Entre os metais de relevância, o manganês (Mn) apresenta importância por estar relacionado a uma série de atividades tais como exploração de petróleo, extrativismo em jazidas de carvão mineral, utilização de fertilizantes na agricultura, entre outros. Nos organismos vivos, o Mn constitui um oligoelemento essencial para uma série de funções vitais, e envolve desde a regulação da energia até coagulação sanguínea. Por outro lado, quando em concentrações elevadas, o Mn pode causar danos irreversíveis aos organismos afetando principalmente o sistema nervoso central (SNC). A toxicidade do Mn dissolvido na água pode variar entre as espécies aquáticas, a bioacumulação do metal em peixes marinhos ou de água doce tem sido encontrada em torno de 0,2 até 19,0 mg/kg de peso seco. No presente estudo, jundiás (*Rhamdia quelen*) foram expostos a diferentes concentrações de Mn (4,2; 8,4 e 16,2 mg/L), sob dois diferentes níveis de oxigênio dissolvido: normóxia (7,48±0,28 mg/L) e hipóxia (3,88±0,41 mg/L), durante 15 dias. Ao final do protocolo, a bioacumulação de Mn bem como, parâmetros de estresse oxidativo e a viabilidade mitocondrial foram avaliados em diferentes tecidos vitais.

Em condições de hipóxia, a maior concentração de Mn (16,2 mg/L) mostrou os menores níveis de lipoperoxidação (LPO) em rim e encéfalo dos jundiás, enquanto os níveis de glutatona reduzida (GSH) encefálico foram aumentados na menor concentração de Mn (4,2 mg/L) e a atividade da catalase renal foi reduzida nesta mesma concentração de metal, em relação à normoxia. A menor concentração de Mn (4,2 mg/L) em hipóxia proporcionou maior viabilidade mitocondrial das brânquias, em relação à normóxia. O hematócrito dos jundiás expostos às duas maiores concentrações de Mn (8,4 e 16,2 mg/L) foi reduzido em condições de normóxia, enquanto sob hipóxia, estes valores foram semelhantes ao grupo sem a presença do metal. Sob normóxia, a bioacumulação de Mn em fígado, rim e brânquias foi maior que sob hipóxia, excetuando o plasma. A partir desses resultados é possível sugerir que a hipóxia pode ter estimulado o desenvolvimento de mecanismos adaptativos ou de hormesis nos jundiás, em presença de Mn na água, principalmente porque neste nível de oxigênio, a bioacumulação do metal ocorreu em menor grau. Contribuindo com este resultado, sob hipóxia, os indicadores de danos oxidativos foram mais baixos que os observados sob normóxia, os quais foram acompanhados de alterações do sistema antioxidante representado pela GSH e catalase. Neste sentido, nossos resultados apontam para uma melhor sobrevivência da espécie em estudo, sob hipóxia, quando exposta ao Mn. Estes achados indicam a necessidade da continuidade dos estudos, em busca dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de adaptação aqui sugeridos.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*. Manganese. Dissolved oxygen. Oxidative stress. Mitochondrial viability. Hormesis.

ABSTRACT

Master dissertation
Post-Graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

AUTHOR: GEISA SOREZINA DOLCI

ADVISOR: MARILISE BÜRGER

CO-ADVISOR: BERNARDO BALDISSEROTTO

Date and place of defense: February, 1st, 2012, Santa Maria.

Metals environment aquatic contamination has been a growing problem with serious consequences to life of different species over time, even after interrupted their emission into the environment. Among relevance metals, manganese (Mn) has shown importance to be related to several activities such as oil exploration, coal deposits extraction, fertilizer use in agriculture, among others. In living organisms, Mn is an essential trace element for a number of vital functions, and involves energy regulation by blood clotting. On the other hand, high concentrations of Mn can cause irreversible damage to living organisms primarily affecting central nervous system (CNS). Thus, waterborne Mn toxicity can switch from aquatic species, while metal bioaccumulation in marine fish or freshwater has been found around 0.2 to 19.0 mg/kg dry weight. In this study, silver catfish (*Rhamdia quelen*) were exposed to different Mn concentrations (4.2; 8.4 e 16.2 mg/L), under two different dissolved oxygen levels, normoxia (7.48 ± 0.28) and hypoxia (3.88 ± 0.41) for 15 days. At the end of protocol, Mn bioaccumulation as well parameters of oxidative stress and mitochondrial viability were evaluated in different tissues. In hypoxic conditions, the highest Mn concentration (16.2 mg/L) showed the lowest silver catfish kidney and brain lipoperoxidation (LPO) levels, while brain reduced glutathione (GSH) levels were increased in lower Mn concentration (4.2 mg/L) and kidney catalase activity was reduced in the same metal concentration, in relation to normoxia. Lowest Mn concentration (4.2 mg/L) in hypoxia showed higher gills mitochondrial viability, compared to normoxia. Hematocrit of silver catfish exposed to two highest Mn concentration (8.4 and 16.2 mg/L) was reduced in normoxia conditions while under hypoxia, these values were similar to control. Plasma except, Mn bioaccumulation in liver, kidney and gills were higher in normoxia than hypoxia. From these results is possible to suggest that hypoxia stimulates the development of adaptive mechanisms and/or hormesis in silver catfish exposed to Mn, mainly because the lower metal bioaccumulation occurred in this oxygen level. Contributing with this, under hypoxia, oxidative damage indicators were lower than those observed in normoxia, which were accompanied by changes in antioxidant system represented by GSH and catalase. In conclusion, our results show in the first time that silver catfish exposed to Mn contamination is able to show a better survival under hypoxia. These findings indicate need for continuing studies in search of molecular mechanisms involved in the adaptation and or hormesis processes, which were suggested here.

Key words: *Rhamdia quelen*. Manganese. Dissolved oxygen. Oxidative stress. Mitochondrial viability. Hormesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 – Comportamento de metais essenciais (A) e não essenciais (B) no desenvolvimento de organismos vivos.....	16
FIGURA 2 – Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	17
FIGURA 3 – Episódio de contaminação ocorrido em 2010 no rio dos Sinos, em Novo Hamburgo, RS, Brasil.....	19
FIGURA 4 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O) com formação de várias espécies reativas de oxigênio durante o referido processo.....	20
FIGURA 5 – Reação de dismutação, ou seja, o substrato atua tanto como redutor quanto oxidante. Esta reação também pode ocorrer na ausência de catalase, embora mais lentamente, devido à presença de metais traços no meio (pela reação de Fenton)....	21
FIGURA 6 – Reação de Fenton.....	21
FIGURA 7 – Ácido ascórbico.....	22
FIGURA 8 – α -tocoferol.....	22
FIGURA 9 – β -caroteno.....	23
FIGURA 10 – Redução do MTT a Formazan.....	24
FIGURA 11 - Estrutura dos citocromos da cadeia transportadora de elétrons (Heme Fe-Protoporfirina).....	24
FIGURA 12 – Formação de EROs e sua posterior degradação pelos sistemas enzimáticos especializados no espaço entre membranas e na matriz mitocondrial, principal local gerador de EROs, os quais são degradados principalmente pela GPx.....	25

MANUSCRITO

FIGURE 1 – Levels of lipid peroxidation, GSH and and catalase activity in brain (A, B and C, respectively) and kidney (D, E and F, respectively) of silver catfish co-exposed to manganese and either normoxia or hypoxia for 15 days.....	54
FIGURE 2 – Mitochondrial viability of silver catfish liver (A) and gills (B) co-exposed to manganese and either normoxia or hypoxia for 15 days.....	55
FIGURE 3 – Multiple regressions between Mn bioaccumulation and Mn waterborne levels in silver catfish liver (A), kidney (B), gills (C) and plasma (D) co-exposed to Mn 0, 4.2, 8.4 and 16.2 mg.L ⁻¹ for 15 days under normoxia or hypoxia.....	56

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

TABELA 1 – Monitoramento dos parâmetros de qualidade da água, onde, O ₂ D = oxigênio dissolvido.....	30
---	----

MANUSCRITO

TABLE 1 – Final body weight (W) and hematocrit (% cell volume) of silver catfish exposed to manganese concentrations under normoxia (N) and hypoxia (H).....	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANDA: Agência de Notícias de Direitos Animais

ATSDR: (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) Agência de registro de doenças e substâncias tóxicas

CL_{50Mn-96h}: concentração letal de manganês

EO: estresse oxidativo

EROs: espécies reativas de oxigênio

GR: glutatona redutase

GSH: glutatona reduzida

LPO: loperoxidação

MTT: 3-(brometo de 4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

pH: potencial hidrogeniônico

SNC: sistema nervoso central

TBARs: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SOD: superóxido dismutase

Fepam: Fundação Estadual de Proteção Ambiental

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

RSNOs: S-nitrosotióis

GPx: glutatona peroxidase

GST: Glutatona-S-transferase

GSSG: glutatona oxidada

NADPH: fosfato de adenina dinucleotídeo oxidase

LDH: lactato desidrogenase

SDH: succinato desidrogenase

HIF: fator de hipóxia induzível

LISTA DE SÍMBOLOS

As: arsênio

Ca²⁺: íon de cálcio divalente

Cd: cádmio

Cr: cromo

Cu²⁺: íon de cobre divalente

Cu: cobre elementar

Cu⁺: íon de cobre monovalente

Fe: ferro elementar

Fe²⁺: ferro divalente

Fe³⁺: ferro trivalente

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

Hg: mercúrio

Mn: manganês

Mn²⁺: íon de manganês divalente

MnO₂: dióxido de manganês

MnSO₄. 6H₂O: sulfato de manganês hexahidratado

NH₃: amônia

NH₄: amônio

NO⁻: nitroxil

NO : óxido nítrico

NO⁺: nitrosônio

O₂: oxigênio molecular

O²⁻: superóxido

[•]O₂⁻: radical superóxido

O₂D: oxigênio dissolvido

OH⁻: ânion hidroxila

[•]OH⁻: radical hidroxil

OONO⁻ : peroxinitrito

Pb: chumbo

Sb: antimônio

Se: selênio

Sn: estanho

Te: telúrio

Tl: tálio

V: vanádio

W: tungstênio

Zn: zinco elementar

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
LISTA DE SÍMBOLOS.....	11
APRESENTAÇÃO.....	14
AGRADECIMENTOS.....	3
EPIÍGRAFE.....	5
1 – INTRODUÇÃO	15
1.1-O manganês.....	15
1.2-O manganês no ambiente aquático.....	16
1.3-Manganês e estresse oxidativo.....	19
1.4-Níveis de oxigênio dissolvido e o estresse oxidativo	26
1.5- Estratégias experimentais utilizadas no estudo.....	28
2 – OBJETIVOS	31
2.1-Objetivo geral.....	31
2.2-Objetivos específicos.....	31
3 – JUSTIFICATIVA.....	32
4 – MANUSCRITO	33
5 – DISCUSSÃO	57
6 – CONCLUSÕES	64
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação encontra-se estruturada em seções dispostas da seguinte forma: Introdução, Objetivos, Justificativa, Manuscrito científico, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências encontram-se inseridos no próprio artigo na seção **MANUSCRITO** e representa a íntegra deste estudo.

No item **INTRODUÇÃO** encontra-se descrita uma breve revisão bibliográfica sobre o tema trabalhado nesta dissertação.

Ao final encontram-se os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, nos quais comentários gerais sobre o manuscrito contido no estudo foram realizados.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO**.

1-INTRODUÇÃO

1.1 – O Manganês

Existem cerca de vinte elementos considerados potencialmente tóxicos para a saúde, incluindo mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As), manganês (Mn), tálio (Tl), cromo (Cr), selênio (Se), telúrio (Te), antimônio (Sb), estanho (Sn), tungstênio (W) e vanádio (V). Destes, os dez primeiros constituem-se nos de maior utilização industrial e, conseqüentemente, são os mais estudados do ponto de vista toxicológico (TAVARES e CARVALHO, 1992).

Inserido nesta realidade, o manganês (Mn) merece atenção por estar relacionado a várias atividades, tais como exploração do petróleo, na qual é adicionado como antidetonante à gasolina (SANTOS et al., 2008), extrativismo nas jazidas de carvão mineral (CROSSGROVE e ZHENG, 2004) extenso uso de agrotóxicos, (BECKER et al., 2009), bem como contaminação direta de rios (AUCOUR et al., 2003).

O manganês é um elemento metálico de transição, do antigamente denominado grupo VIIb (hoje grupo 7), com número atômico 25. Foi descoberto em 1774, pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele. A primeira descrição da utilização do Mn remete ao período do Paleolítico, quando o homem já utilizava o dióxido de manganês (MnO_2) como pigmento em pinturas rupestres (CHALMIN et al, 2006). A *posteriori*, na Grécia antiga, os espartanos começaram a utilizar o Mn em ligas metálicas de ferro (Fe) para a fabricação de armas (ALESSIO; CHAMPAGNA; LUCCCHINI, 2007), enquanto os egípcios e os romanos utilizavam minérios de Mn na decoração de vidro e na modificação de sua tonalidade (SAYRE e SMITH, 1961; MCCRAY, 1998).

Atualmente, uma das principais utilizações do Mn consiste na produção industrial de aço, uma vez que este metal aumenta a resistência à corrosão e dá maior durabilidade a essa liga (CROSSGROVE e ZHENG, 2004; VERHOEVEN, 2007).

1.2 – O manganês no ambiente aquático

O Mn constitui-se, em sua forma elementar, em um dos metais mais abundantes na crosta terrestre, estando apenas atrás do ferro, possuindo papel relevante para os organismos vivos. Neste sentido, desempenha funções importantes como nutriente essencial, atuando em atividades vitais como funcionamento do sistema imunológico, regulação da energia celular, funcionamento dos ossos, crescimento do tecido conjuntivo e coagulação sanguínea (ERIKSON e ASCHNER, 2003). Por outro lado, elevadas concentrações de Mn podem causar danos irreversíveis aos organismos (GULEC, 2011), afetando principalmente o sistema nervoso central (SNC) (ASCHNER; ERIKSON; DORMAN, 2005; TÜNZEN, 2003).

Enquanto oligoelemento essencial, o Mn pode atuar como um co-fator nutricional envolvido na prevenção da lipoperoxidação (LPO), já que está presente na superóxido dismutase (SOD) mitocondrial, enquanto outros metais como Cu e Zn estão presentes na SOD citosólica (TATE; MICELI; NEWSOME, 1999; MARET, 2000; POWELL, 2000). Entretanto, em concentrações elevadas, o Mn pode assumir um caráter de metal tóxico, causando danos a proteínas (OWESON et al., 2008), mitocôndrias entre outras unidades biológicas, podendo, desse modo, levar à morte celular.

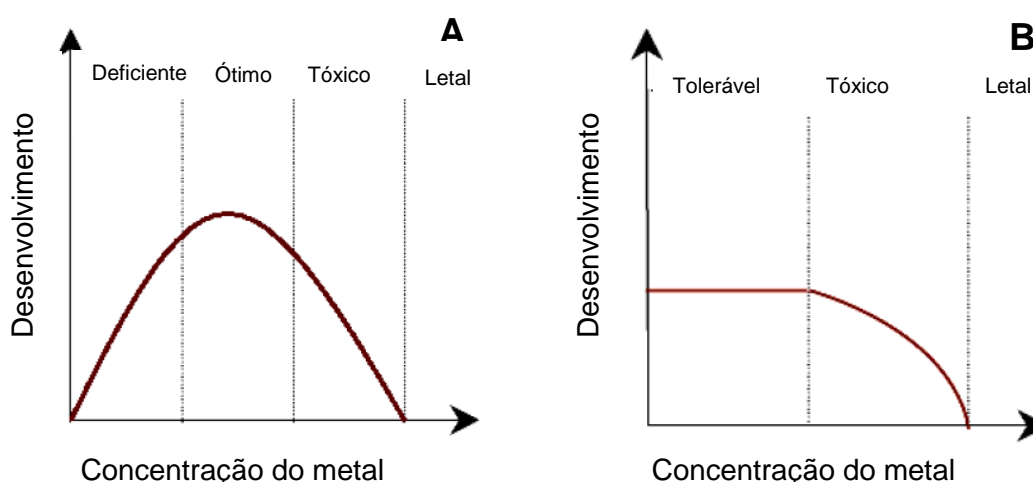


Figura 1. Comportamento de metais essenciais (A) e não essenciais (B) no desenvolvimento de organismos vivos. (adaptado de Forstner e Wittmann, 1983)

Neste contexto, o jundiá (*Rhamdia quelen*) constitui-se em uma espécie nativa brasileira bem adaptada a diferentes ambientes e amplamente utilizada em viveiros de piscicultura (GOMES et al., 2000). Essa espécie suporta temperaturas de inverno e cresce bem durante o verão, atingindo cerca de 600,0 a 800,0 gramas de peso em oito meses quando em densidades de 2-4 peixes/m² (BARCELLOS et al., 2004). Segundo RADÜNZ NETO (1981), este peixe possui boa aceitação no mercado consumidor, boa produtividade em açudes e apresenta alto potencial de comercialização, tornando-se uma ótima opção para o fomento da piscicultura.



Figura 2. Jundiá (*Rhamdia quelen*). (adaptado de: http://www.vivaterra.org.br/peixes_doce_2.htm)

Os peixes em geral possuem defesas eficazes contra ingestão de metais, embora não possuam mecanismos capazes de tolerar íons metálicos livres contidos na água que são constantemente bombeados através de suas brânquias (FLORENCE; MORRISON; STAUBER, 1992), podendo ocorrer toxicidade, quer diretamente ou pela passagem através da superfície das brânquias, exercendo efeitos adversos internamente (SIMKISS e TAYLOR, 1989). Além disso, a complexidade da exposição dos organismos à contaminação por metais-traço não se restringe apenas à espécie metálica e a concentração da exposição, mas também à forma como esta exposição ocorre e o tempo de duração.

Nesse contexto, a descarga de metais no ambiente aquático pode levar a diferentes respostas físicas, químicas e biológicas que podem ser subdivididos em duas categorias distintas: i) efeitos do ambiente no metal e ii) efeitos do metal no ambiente. A primeira baseia-se no fato de que as condições nas águas receptoras podem conduzir a uma mudança na especiação e na toxicidade dos metais, que incluem diferentes formas químicas do metal, qualidade da água utilizada, concentrações de possíveis quelantes além de sólidos em suspensão (MOORE E

RAMAMOORTHY, 1984). A segunda categoria está baseada na qualidade das respostas biológicas que são dependentes de condições ambientais, tais como o tempo de residência hidrodinâmica e os processos de transporte (HATJE et al, 2003).

Dessa forma, os níveis tóxicos de Mn dissolvido na água variam para as diferentes espécies aquáticas (HOWE; MALCOLM; DOBSON, 1999). Recentemente foram encontrados níveis de Mn de 0,4 a 10,0 ug/L em áreas de mar aberto (ZERI et al., 2000). Por outro lado, concentrações de Mn em áreas consideradas livres de fontes antropogênicas variam de 10,0 a 10.000,0 ug/L. Entretanto concentrações do metal na superfície de águas naturais raramente excedem 1.000 ug/L, sendo normalmente menores que 200,0 ug/L (REIMER, 1999). Níveis elevados de Mn na água (acima de 1.000,0 ug/L) têm sido detectados em depósitos de resíduos tóxicos nos Estados Unidos, sugerindo que, em alguns casos, resíduos de fontes industriais podem levar a significantes contaminações conforme a Agência de Registros de Doenças e Substâncias Tóxicas (ATSDR, 2000).

No Brasil, episódios de contaminação vêm se repetindo no Vale do rio dos Sinos, na região Sul, decorrente de contaminação por metais, entre eles o Mn, provenientes de descarte industrial inadequado (MENDES, 2010) bem como pelo uso de fungicidas contendo o metal conforme Agência de Notícias de Direitos Animais (ANDA, 2010). Concentrações de Mn normalmente encontradas em tecidos de diferentes peixes marinhos, bem como de água doce, variam de menos de 0,2 a 19,0 mg/kg de peso seco (GREICHUS et al., 1977; SINDAYIAGAYA et al., 1994; HEINY e TATE, 1997), embora em concentrações de 54,0 mg/kg de peso seco, já seja evidenciada contaminação ambiental (SAAD et al., 1981).

Em caso específico de contaminação ambiental ocorrido no rio dos Sinos, análises feitas pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental (Fepam) indicaram que uma carga de produtos químicos foi despejada no rio, ocasionando a grande mortalidade de peixes (estimativas de cerca de dez mil peixes mortos na região entre São Leopoldo e Novo Hamburgo, Brasil), principalmente devido à hemorragia aguda apresentada em função do contato com poluente (MENDES, 2010).



Figura 3. Episódio de contaminação ocorrido em 2010 no rio dos Sinos, em Novo Hamburgo, RS, Brasil. (Zero Hora, 10/11/2010).

1.3 – Manganês e estresse oxidativo

Apesar de vários relatos indicarem que o estresse oxidativo (EO) desempenha um papel importante na toxicidade do Mn, o seu exato mecanismo não está completamente esclarecido, embora se acredite que as mitocôndrias sejam as principais estruturas celulares envolvidas nos danos neurodegenerativos induzidos pelo referido metal, principalmente por causar uma disfunção nos gânglios da base (LIU et al., 2006).

Devido a sua atividade redox, o Mn pode atuar como gerador de EROs (ZHANG; ZHOU; FU, 2003), contribuindo para a formação natural de subprodutos do metabolismo do oxigênio via fosforilação oxidativa (STOREY, 2004), favorecendo dessa forma o desenvolvimento de estresse oxidativo e nitrosativo em hidrobiontes. As EROs incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), enquanto as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) incluem o óxido nítrico (NO), nitroxil (NO^-), nitrosônio (NO^+), S-nitrosotióis (RSNOs) e peroxinitrito ($OONO^-$) (NATHAN, 2003), sendo que ambas espécies (EROs e ERNs) podem ser genericamente denominadas EROs.

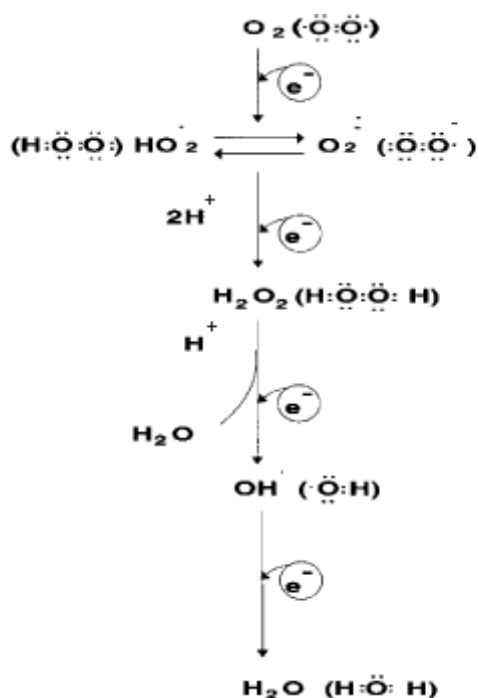


Figura 4. Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O) com formação de várias espécies reativas de oxigênio durante o referido processo. (adaptado de Cohen, 1989)

Normalmente, no EO, que pode ser medido através de testes específicos de LPO tais como medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) (OHKAWA; OHISHI, YAGI, 1979), ocorre a prevalência da geração de EROs em detrimento de sua degradação (SIES, 1991), que é realizada por sistemas antioxidantes especialmente capacitados para prevenção de apoptose, visando a manutenção da integridade celular, tais como compostos de baixo peso molecular como a glutatona na sua forma reduzida (GSH), ácido ascórbico e ácido úrico, tocoferóis e proteínas, além de enzimas antioxidantes como SOD e catalase, bem como glutatona peroxidase (GPx), Glutaciona-S-transferase (GST) e glutatona redutase (GR) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; HERMES-LIMA, 2004).

Na inativação de um agente pró-oxidante ocorre redução de glutatona oxidada (GSSG) à GSH por meio da GR na presença de NADPH, formando o ciclo redox (LU, 2000). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, a GSH pode ser recuperada, entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, ocorre o desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, depletando os níveis de GSH o que

caracteriza o estresse oxidativo (CNUBBEN, et al., 2001; LEIER, et al., 1996). Esse processo pode sofrer variações dependendo do período de permanência do estressor para os indivíduos de uma mesma espécie (CURTIS et al., 2007).

Outra enzima importante constitui-se na catalase, presente nos peroxissomas de eucariontes, sendo a principal enzima envolvida na neutralização do H_2O_2 citosólico, (decorrente do metabolismo celular dos organismos aeróbicos, além de ser uma componente essencial de células do sistema imunitário por atuar como agente antibacteriano) prevenindo dessa forma o seu acúmulo dentro das células. O H_2O_2 não é um radical livre, porém participa do processo de formação do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), que é extremamente reativo e responsável por gerar lesão em alguns sistemas orgânicos (NORDBERG e ARNER, 2001).

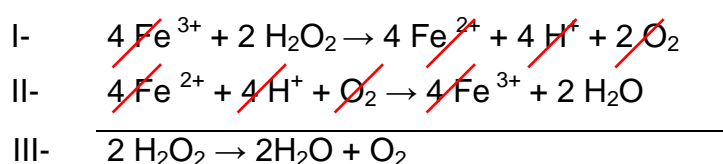


Figura 5. Reação de dismutação, ou seja, o substrato atua tanto como redutor quanto oxidante. Esta reação também pode ocorrer na ausência de catalase, embora mais lentamente, devido à presença de metais traços no meio (pela reação de Fenton). (adaptado de Keilin e Hartree, 1938)

O radical $\cdot\text{OH}$ constitui-se na espécie mais reativa conhecida. Na Figura 6, encontra-se representada a reação de Fenton, na qual ocorre a decomposição do H_2O_2 em um radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e um ânion hidróxido (OH^-). Esta reação é catalisada pelo Fe^{2+} , sendo este regenerado através da reação de redução do Fe^{3+} pelo radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$).

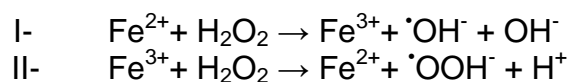


Figura 6. Reação de Fenton. (adaptado de Kremer, 2003)

Frente aos diversos danos gerados em decorrência do estresse, o ácido ascórbico ou ascorbato é outro importante agente antioxidante, atuando diretamente nas membranas celulares, impedindo a iniciação da LPO (ou indiretamente regenerando a forma reduzida e antioxidante da vitamina E, que atua

na face lipofílica da membrana). Porém, conforme observado por MC GREGOR e BIESALSKI (2006) o ácido ascórbico pode funcionar como pró-oxidante quando em doses elevadas, ou ainda quando participa na redução de metais de transição (principalmente em intoxicações, quando esses estão em quantidades elevadas), tais como íons de cobre (Cu^{2+} a Cu^+) e íons férricos (Fe^{3+}) para ferrosos (Fe^{2+}), durante a conversão de ascorbato para dehidroascorbato *in vitro*. Nesse processo ocorreria formação de ânion superóxido, além de outras EROs (SATOH e SAKAGAMI, 1997; ODIN, 1997).

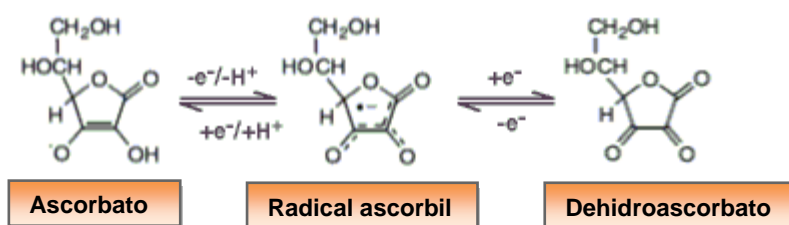


Figura 7. Ácido ascórbico. (adaptado de Harrison e May, 2009)

Conforme anteriormente citado, a vitamina E (α -tocoferol) constitui-se no principal antioxidante contra a LPO (PRYOR, 2000), atuando também como um estabilizador de membrana celular (MEYDANI; FIELDING; FOTOUHI, 1996; TIIDUS e HOUSTON, 1995) restringindo a sua mobilidade (DIPLOCK e LUCY, J. A., 1973).

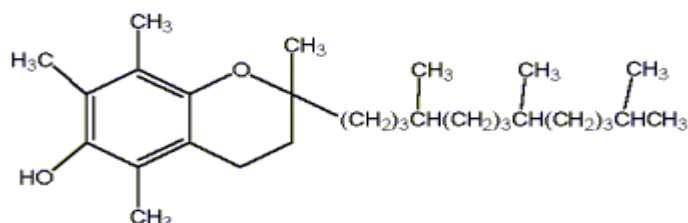


Figura 8. α -tocoferol. (adaptado de Gunstone; HARWOOD; PADLEY, 1994)

Além desses, é necessário ressaltar aqui a importância do β -caroteno. A prevenção da peroxidação lipídica por carotenóides tem sido sugerida principalmente por sua capacidade de “*quenching*”, ou seja, extinguir o oxigênio

singlete (STAHL e SIES, 1996), além da sua capacidade “scavenger” (varredor) de radicais peroxila, especialmente em baixas tensões de oxigênio (BURTON e INGOLD, 1984).

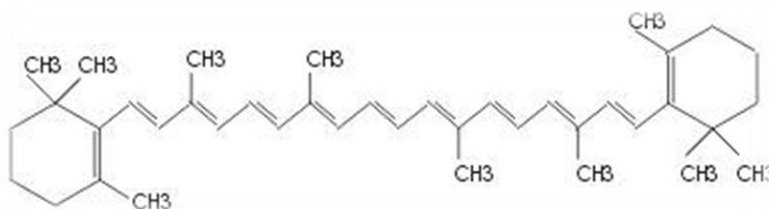


Figura 9. β -caroteno. (adaptado de Sies e Stahl, 1995)

Além disso, as mitocôndrias, presentes em organismos aeróbios, constituem-se em organelas celulares essenciais para a regulação da energia celular nesses organismos. Assim, utilizando técnicas de centrifugação diferencial, torna-se possível realizar o isolamento dessas organelas a fim de melhor estudá-las (BRUSTOVETSKY e DUBINSKY, 2000). Neste estudo, ao analisar a viabilidade mitocondrial como indicativo de dano mitocondrial, e conseqüentemente celular, se faz possível observar o grau que determinadas substâncias, no caso o Mn, interferem no funcionamento das desidrogenases mitocondriais como a succinato desidrogenase (SDH), através do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio (MTT) (MOSMANN, 1983). Neste ensaio ocorre a redução do MTT (amarelo) à Formazan (roxo) pela ação enzimática, constituindo assim uma medida de viabilidade celular. Como células não viáveis não possuem essa capacidade, se pode constatar em maior ou menor escala, prejuízos nas membranas e subseqüente morte celular.

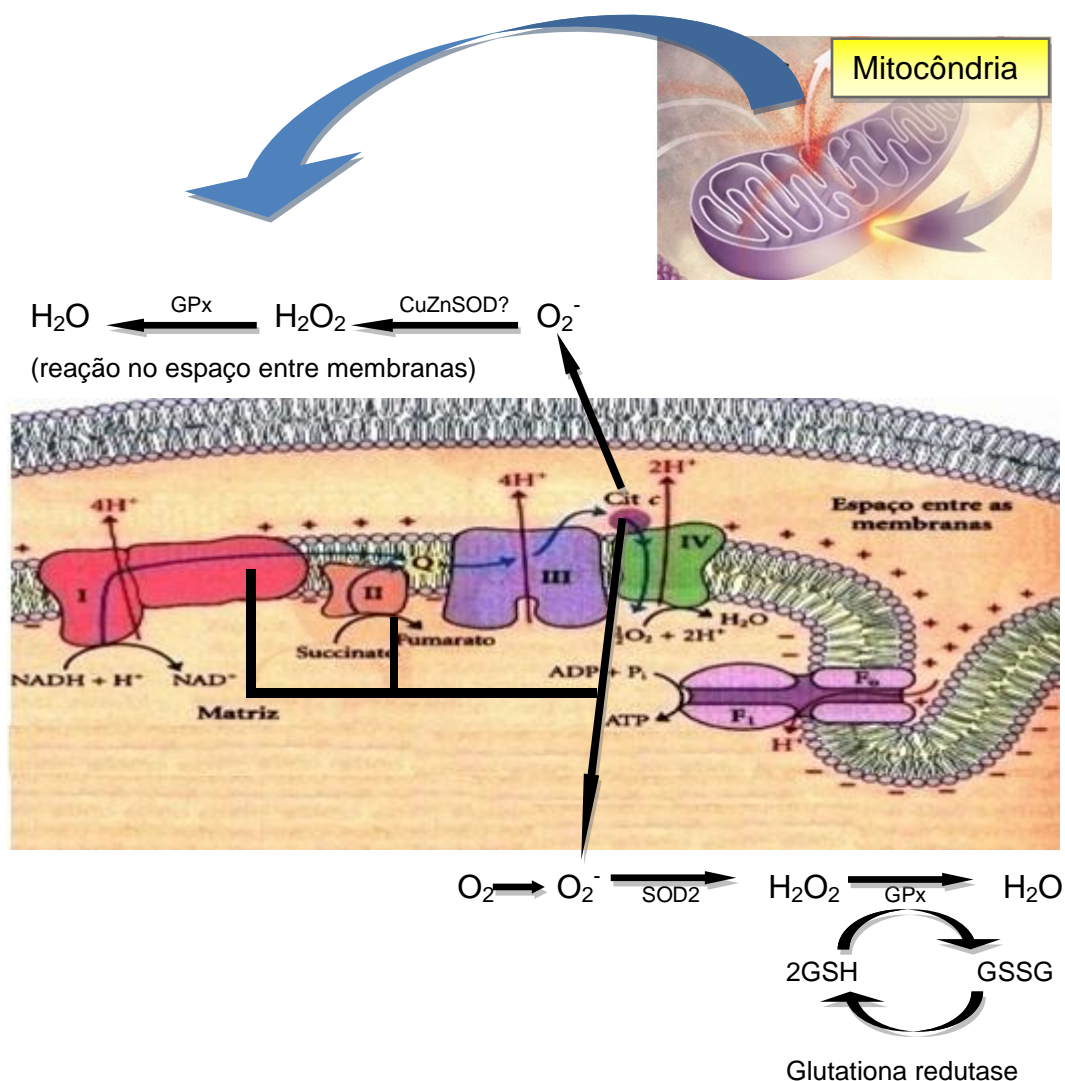


Figura 12. Formação de EROs e sua posterior degradação pelos sistemas enzimáticos especializados no espaço entre membranas e na matriz mitocondrial, principal local gerador de EROs, os quais são degradados principalmente pela GPx. (adaptado de Nelson e Cox, 2011).

O aumento da formação de EROs e a subsequente mudança na transição da permeabilidade mitocondrial refletem um processo dependente de Ca^{2+} caracterizado pela abertura do poro de transição da permeabilidade na membrana mitocondrial interna. Este processo resulta em um aumento da permeabilidade a prótons, íons e solutos (ZORATTI e SZABO, 1995; RAMA RAO e NORENBORG, 2004), levando ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna. Por sua vez, o inchaço coloidal osmótico segue com o movimento de metabólitos através da membrana interna, ocorrendo incompleta fosforilação oxidativa, cessando a síntese de ATP, havendo ainda mais geração de EROs, causando assim um ciclo vicioso.

Além disso, neste estudo utilizou-se a medida do hematócrito, pois segundo TAVARES-DIAS e MORAES (2003) se constitui num bom indicador de efeitos para os diversos fatores ambientais a que os peixes estão sujeitos, pois é o índice do eritrograma com menor coeficiente de variação. Assim, a quantificação de danos oxidativos e os níveis de defesas contra danos celulares, têm o potencial de serem usados como biomarcadores de contaminação aquática (AHMAD; PACHECO; SANTOS, 2006).

1.4 – Níveis de oxigênio dissolvido e o estresse oxidativo

Todos os organismos aeróbicos dependem da presença de oxigênio no ambiente, utilizando-o primeiramente para a geração de energia através da fosforilação oxidativa na mitocôndria. Neste processo ocorre a redução do oxigênio molecular à água pelo sistema das oxidases presentes nos citocromos, que usam 90% do oxigênio consumido pelo organismo (STOREY, 1996), gerando os produtos responsáveis pelo metabolismo do oxigênio ou EROs. Mudanças na tensão de oxigênio podem contribuir tanto para o desempenho da função fisiológica normal quanto para patologias importantes (BING; APSTEIN; BROOKS, 1975; HESS e MANSON, 1984; KOCH, 2002; MC DONOUGH e SPITZER, 1983).

A concentração de oxigênio dissolvido na água depende da quantidade de matéria orgânica presente, da temperatura, da difusão da luz, e salinidade (DAVIS, 1975; MATSUO e VAL, 2003; CHIPPARI-GOMES et al., 2003). A quantidade de oxigênio contida em um determinado volume de água é apenas 1/30 da quantidade contida no mesmo volume de ar (DEJOURS, 1975). Conseqüentemente, até mesmo o consumo modesto de oxigênio por processos biológicos ou não biológicos pode rapidamente diminuir a tensão de oxigênio no ambiente aquático. Essa situação pode ainda ser agravada quando a superfície da coluna de água é coberta por gelo ou vegetação, limitando a difusão do oxigênio da atmosfera, ou ainda quando a coluna de água é verticalmente estratificada devido a diferentes gradientes térmicos ou salinidade, limitando a mistura das águas superficiais e massas de águas profundas (NIKINMAA E REES, 2005).

Outro fator que contribui para o aumento da poluição orgânica em cursos de água localizados em grandes centros urbanos, e conseqüentemente, diminui o oxigênio aquático, constitui-se na poluição dos recursos hídricos por atividades antropogênicas, que vão desde o lançamento de esgotos domésticos até resíduos industriais (IBGE, 2003, 2008), que promove, além da diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido, efeitos deletérios constantes à saúde dos organismos (TAVARES e CARVALHO, 1992; JORDÃO et al., 2005).

Nesse contexto, organismos aquáticos sofrem constantemente com modificações ambientais que podem atuar como fatores estressores fazendo com que as espécies desenvolvam mecanismos de adaptação que permitam a sua sobrevivência nesse ambiente. Considerando que o oxigênio constitui-se num gerador de EROs *per se* (DAVIES, 2000; SIES, 1986), situações de hipóxia crônica ou hiperóxia, podem atuar como importantes estressores ambientais constituindo-se em um fator limitante para o crescimento das espécies (WILHELM FILHO et al., 2005). Os níveis de oxigênio requeridos para a maioria dos peixes são ao redor de 5 – 6 mg/L (BOYD e TUCKER, 1992; BALDISSEROTTO, 2002). Estudos recentes de Braun et al. (2008) e Wilhelm Filho et al. (2005) observaram que níveis de hipóxia severa (~2 mg/L) a moderada (~4 mg/L) podem levar ao aumento da LPO e da atividade da SOD em jundiás, indicando uma resposta compensatória desta espécie frente a essas condições.

Desse modo, as espécies aquáticas são constantemente expostas a variados níveis de oxigênio dissolvido, tanto sazonal quanto diariamente. Em águas doces superficiais os níveis naturais de oxigênio variam amplamente ao longo do período de um dia desde baixos níveis durante a noite para níveis altamente saturados durante o dia (ZERNOV, 1934) existindo, portanto, uma alta taxa de tolerância ao oxigênio entre os peixes. Espécies adaptadas ao frio normalmente necessitam altos níveis de oxigênio, enquanto espécies adaptadas ao calor podem sobreviver desde condições de anóxia até hiperóxia (LOVE, 1980; LUSHCHACK et al., 2001; LUSHCHACK e BAGNYUKOVA, 2006a, 2006b). Jundiás teoricamente podem sobreviver a temperaturas tão baixas como 3°C e a partir de 31-32 °C ocorre mortalidade (CHIPPARI-GOMES; GOMES; BALDISSEROTTO, 1999).

A tolerância dos peixes frente a diminuições nos níveis de oxigênio envolve grande número de adaptações fisiológicas incluindo depressão nas taxas

metabólicas, reorganização do fluxo sangüíneo, principalmente no cérebro e coração, e vias de produção de energia efetivas (NILSSON e RENSHAW, 2004). Além disso, podem ocorrer modificações importantes no perfil hematológico dos peixes frente a condições estressoras (SILVEIRA e RIGORES, 1989), contribuindo o estudo deste parâmetro para uma melhor compreensão da adaptação da espécie frente a determinadas condições de estresse ambiental.

Desse modo, torna-se relevante o estudo de metais traços, tais como o Mn, investigando o seu comportamento frente à diferentes níveis de oxigênio dissolvido, uma vez que a variação nestes níveis pode ocorrer tanto naturalmente em ambientes aquáticos, bem como em decorrência da ação antropogênica, além, é claro, do tipo de ecossistema predominante no local.

1.5 – Estratégias experimentais utilizadas no estudo

A partir de experimentos prévios *in vitro* e *in vivo* em nosso laboratório, foi primeiramente estabelecida a concentração letal de manganês ($CL_{50Mn-96h}$). Para obtenção desse dado, foram utilizados cento e setenta jundiás ($11,52 \pm 0,64$ g; $11,25 \pm 0,41$ cm) obtidos a partir de viveiros da Universidade Federal de Santa Maria, que foram inicialmente aclimatados por uma semana, em tanques de 250 L (densidade ~ 28 peixes/tanque sob temperatura controlada ($24\text{ }^{\circ}\text{C}$), e posteriormente redistribuídos aleatoriamente ($n = 5$) em triplicata para as exposições, exceto na concentração ausente em Mn (duplicata) em 12 tanques com capacidade de 20 L, em hipóxia ($2,26 \pm 0,06$ mg/L; pH: $6,97 \pm 0,16$) e normóxia ($6,96 \pm 0,08$ mg/L; pH: $7,12 \pm 0,09$), nos diferentes níveis de manganês dissolvido: 0; 852,5; 1.125,5; 1.341,0; 1.563,5 e 1.710,5 mg/L, durante 96 horas. O valor de $CL_{50Mn-96h}$ encontrado foi de 1.383,48 mg/L de Mn (método de Spearman Karber) para jundiás expostos em normóxia. Em hipóxia não foi observada $CL_{50Mn-96h}$ nas concentrações testadas.

Assim, após definidas as concentrações de manganês utilizadas nesse estudo (0, 4,2; 8,4 e 16,2 mg de Mn/L), baseadas em relatos da literatura (OWESON et al., 2010), mimetizando situações que normalmente ocorrem em

eventos de contaminação pelo Mn, foi utilizado o sal sulfato de Mn hexahidratado [MnSO₄. 6H₂O] (VETEC® Rio de Janeiro, RJ, Brazil) como possível agente tóxico.

Para este segundo experimento, utilizaram-se cento e sessenta jundiás obtidos a partir de viveiros da Universidade Federal de Santa Maria (36,85 ± 1,40 g; 16,03 ± 1,4 cm) que foram distribuídos aleatoriamente em 6 tanques de 250 L (densidade ~ 25 peixes/tanque) onde permaneceram para período de aclimação de uma semana, sob temperatura controlada (24° C) e fotoperíodo normal, sendo posteriormente redistribuídos aleatoriamente em tanques de 20 L (n = 4), em quadruplicata para as exposições, mantidos sob as mesmas condições de temperatura, tendo porém, os níveis de oxigênio dissolvido ajustados, em normóxia (7,48 ± 0,28; pH 7,88 ± 0,05) com auxílio de aeradores (Air pump, AC 2000 – RESUN[®], Pressão: 0.014MPa, capacidade 3 l/min – 220V ~60Hz 5W) e em hipóxia (3,88 ± 0,41; pH 7,44 ± 0,10) obtida naturalmente pela queda dos níveis de oxigênio na água dos tanques até o valor desejado. Após arraçoamento, estes tanques eram limpos diariamente por sifonagem e reabastecidos com níveis pré-ajustados de Mn, bem como de oxigênio (hipóxia obtida através de injeção de nitrogênio). Ao fim de cada exposição, os resíduos Mn foram quimicamente tratados e devidamente descartados. Os peixes foram expostos durante 15 dias e então, no dia 16, eutanasiados por secção medular para realização das análises (no dia 16, excetuando a medida de atividade da catalase e os tecidos para a determinação da bioacumulação de Mn que foram congeladas a -80° C até o momento da análise). Durante a realização do experimento, foram analisados os parâmetros de qualidade da água, cujos valores permaneceram dentro do esperado (Tabela 1).

Tabela 1. Monitoramento dos parâmetros de qualidade da água, onde, O₂D = oxigênio dissolvido. Médias ± Erro Padrão Médio (E.P.M.), obtidas ao final dos 15 dias de exposição (resultados obtidos experimentalmente).

	mg Mn L ⁻¹							
	0		4.2		8.4		16.2	
	N	H	N	H	N	H	N	H
pH	7.93 ± 0.05	7.41 ± 0.04	7.91 ± 0.045	7.48 ± 0.04	7.84 ± 0.06	7.32 ± 0.03	7.82 ± 0.06	7.58 ± 0.07
O₂D(mg L⁻¹)	7.46 ± 0.05	4.04 ± 0.09	7.37 ± 0.067	4.33 ± 0.12	7.20 ± 0.05	3.47 ± 0.14	7.10 ± 0.05	3.59 ± 0.09
Dureza (mg L⁻¹CaCO₃)	22.00 ± 2.00	21.45 ± 1.5	21.95 ± 1.95	14.47 ± 3.27	13.87 ± 3.87	11.65 ± 1.65	20.30 ± 1.70	19.00 ± 1.00
Alcalinidade (mg L⁻¹CaCO₃)	81.25 ± 7.95	77.12 ± 3.97	77.25 ± 7.24	78.87 ± 7.68	78.75 ± 5.83	79.37 ± 6.80	76.00 ± 3.97	76.75 ± 5.48
NH₃ + NH₄ (mg mL⁻¹)	1.00 ± 0.78	1.00 ± 0.78	0.99 ± 0.78	0.99 ± 0.78	0.99 ± 0.78	0.99 ± 0.78	0.99 ± 0.78	0.99 ± 0.78
NH₃ (mg mL⁻¹)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Nitrato (mg mL⁻¹)	0.08 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.05 ± 0.07	0.67 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.42 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.41 ± 0.01

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Avaliar a influência da hipóxia e/ou normóxia sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, viabilidade mitocondrial e bioacumulação de manganês em diferentes tecidos de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao Mn.

2.2. – Objetivos específicos

- Estabelecer a concentração tóxica (CL₅₀) 96 horas do sulfato de Mn em jundiás sob condições de normóxia e hipóxia;
- Avaliar os possíveis danos teciduais causados pela exposição às diferentes concentrações de Mn em encéfalo e rim de jundiás expostos ao metal em condições de normóxia/hipóxia, através da determinação de marcadores de estresse oxidativo e das defesas antioxidantes;
- Avaliar a viabilidade mitocondrial em brânquias e fígado de jundiás expostos ao Mn em condições de normóxia/hipóxia;
- Verificar a bioacumulação de Mn em tecidos vitais de jundiás expostos a diferentes concentrações deste metal, após os 15 dias de exposição ao Mn sob normóxia e hipóxia;
- Avaliar o hematócrito em sangue total de jundiás expostos ao Mn e condições de normóxia/hipóxia.

3 – JUSTIFICATIVA

Considerando o jundiá (*Rhamdia quelen*) uma espécie nativa brasileira adaptada a diferentes ambientes e o Mn um mineral fartamente encontrado em locais relacionados a atividades de extrativismo, bem como atividades ligadas ao uso de agrotóxicos e fertilizantes, além da presença do metal em áreas próximas à piscicultura pelo descarte inadequado de resíduos por empresas e indústrias, tem ocorrido uma série de desequilíbrios aquáticos sob o ponto de vista ecotoxicológico. Neste sentido, o presente estudo foi delineado para investigar os mecanismos envolvidos na adaptação do jundiá frente ao Mn associadamente a condições de normóxia e hipóxia, além de melhor compreender os possíveis danos causados pelo metal frente a essas condições.

4 – MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscrito, o qual se encontra aqui inserido. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências, encontram-se no próprio artigo, estando dispostos da mesma forma que o mesmo foi submetido para publicação.

MANUSCRITO

Exposure of silver catfish (*Rhamdia quelen*) to manganese contamination can be controlled by low levels of oxygen in the water: hormesis and adaptation mechanisms

Dolci, G. S.^a, Dias, V. T.^c, Roversi, K.^c, Roversi, Kr.^c, Pase, C. S.^c, M., Teixeira, A.M.^a, Benvegnú, D.M.^a, Trevizol, F.^a, Barcelos, R.C.S.,^a Riffel, A.P.K.^a, Nunes, M.A.G.^b, Dressler, V.L.^b, Flores, E.M.M.^b; Baldisserotto, B.^c, Bürger, M. E.^c.

^aPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia; Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas (UFSM), RS, Brasil.

^cDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde (UFSM), RS, Brasil.

*Corresponding author:

Prof. Bürger, M.E.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria- RS, Brazil.

CEP 97105-900 Santa Maria, RS, BRAZIL

Phone/FAX: +055-55 3220 7686

E-mail: mariliseeb@yahoo.com.br

Abstract

The aim of this study was to compare the toxic effects of manganese (Mn) on silver catfish exposed to different levels of dissolved oxygen. Silver catfish were exposed to increasing concentrations of Mn (0, 4.2, 8.4 and 16.2 mg L⁻¹) under either normoxia (100% saturation) or hypoxia (16% saturation) for 15 days. Under normoxia, Mn exposure increased lipid peroxidation (LP) in brain and kidney; it increased reduced glutathione (GSH) levels in brain and decreased catalase activity in both tissues. Hypoxia was able to prevent Mn-induced LP in brain and to reduce this oxidative parameter in kidney; GSH level was increased in brain, while catalase activity was reduced in both tissues. Viability of isolated mitochondria of liver and gills was reduced by Mn exposure under both levels of dissolved oxygen, but this effect was more prominent in normoxia. As expected, liver, kidney and gills showed an increase of Mn uptake according to waterborne levels, and these parameters presented positive correlation. The highest waterborne Mn (8.4 and 16.2 mg L⁻¹) resulted in greater accumulation under normoxia, indicating that hypoxia can stimulate mechanisms capable of reducing Mn bioaccumulation in tissues (though not in blood). Hypoxia can be considered a stress factor and Mn an aquatic anthropogenic contaminant, therefore we hypothesized that, these two conditions together are able to invoke a defense mechanism in juvenile silver catfish, acting in a compensatory form, which may be related to adaptation and/or hormesis.

Keywords: Hypoxia, metal contamination, mitochondrial viability, lipid peroxidation, antioxidant system

Introduction

Silver catfish (*Rhamdia quelen*) is a Brazilian native species widely used in fishponds, whose cultivation has been increasing steadily. Human interference in the aquatic environment has led to fish mortality due to inadequate sewage treatment and release of industrial waste into waters. In this context, manganese (Mn) is related to such activities as use of pesticides, coal extraction (Crossgrove and Zheng, 2004) and oil exploration. In this sense, formation water from oil and gas production, rich in salts and metals, may affect Na influx in fishes and reduce rivers' biodiversity (Baldisserotto et al., 2011). Despite being present as an essential mineral in minimum amounts, high concentrations of Mn can cause damage in organs and systems, including the central nervous system (CNS). In this sense, dissolved Mn can be readily taken up by benthic fauna mainly via gill transport, allowing its bioaccumulation. Excessive loads of dissolved organic matter lead to greater demand for oxygen, reducing dissolved oxygen levels in water streams, with direct consequences for most species (Winemiller et al., 2008). In fact, Mn uptake by aquatic invertebrates and fish is influenced by environmental factors such as water temperature, salinity, and hardness (Stubblefield et al., 1997), while dissolved oxygen levels do not seem to exert significant effect (Baden et al., 1995). On the other hand, low dissolved oxygen levels can be a stress factor to aquatic organisms (Oweson et al., 2010) and reflect changes on the behavior, growth and survival of species, which were observed in silver catfish (Braun et al., 2006) and other fishes. Although several reports indicate that oxidative stress (OS) plays an important role in both Mn toxicity and hypoxia, its exact mechanism is not completely understood, mainly when these two factors occur concurrently. In fact, Mn is a redox-active metal that acts as a reactive oxygen species (ROS) generator (Zhang et al., 2003), facilitating the development of OS for hydrobionts. The generation of by-products of oxygen metabolism by aerobic organisms occurs naturally from energy production via oxidative phosphorylation (Storey, 2004). ROS include superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^\cdot), among others (Halliwell and Gutteridge, 1999), which may damage cellular components, particularly proteins, lipids, and nucleic acids, often leading to cumulative injury that can lead to cell death. Normally, OS is a consequence of the prevalence of ROS generation on their degradation (Sies, 1991), which is carried out by antioxidant systems specially

developed to maintain cellular integrity. The antioxidant system consist of low-molecular weight compounds such as glutathione (GSH), ascorbic and uric acids, tocopherols and proteins, also including such enzymes as superoxide dismutase (SOD) and catalase, among others (Hermes-Lima, 2004).

Whereas Mn toxicity in fish has been little studied (Falfushynska, et al., 2011; Pinsino et al., 2010), the influence of low dissolved oxygen has received more attention (Braun et al., 2008; Nikinmaa and Rees, 2005; Oweson et al., 2010; Sollid et al., 2003). However, few studies combine these two conditions able to generate OS and death of aquatic animals. Here we propose to evaluate the toxicity of different waterborne Mn levels in silver catfish under normoxia and hypoxia, mimicking environmental variations of dissolved oxygen levels.

1. **Material and methods**

2.1. *Fish*

One hundred and sixty silver catfish obtained from fishponds at the Universidade Federal de Santa Maria (16.03±1.4 cm) were kept in continuously aerated 20 L aquaria (n=4 each), fed once a day (42% crude protein, Supra, Alisul Alimentos SA, Carazinho, Brazil) and maintained under normal photoperiod (14 h light/10 h darkness) in controlled temperature (around 24°C). The animals were maintained and used in accordance with the guidelines of the National Council for Control of Animal Experiments (CONCEA), following international norms of animal care and approved by local ethical committee under N^o. 105/2010.

2.2. *Reagents*

Reagents of high purity were used. Manganese in the salt form [MnSO₄.6H₂O] manganese sulfate hexahydrate (Vetec®, Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

2.3. *Treatments*

Letal concentration experiments (LC_{50Mn-96h}) were performed by our laboratory considering the different waterborne manganese levels (0, 852.5, 1125.5, 1341.0, 1563.5 and 1710.5 mg L⁻¹) and literature data reports (Oweson et al., 2010). LC_{50-96h} value of 1383.48 mg L⁻¹ (confidence interval: 1211.19 - 1580.27 mg.L⁻¹) was observed in normoxia without changes under hypoxia (Spearman Karber method).

After one week of adaptation, silver catfish were randomly exposed for 15 days to four waterborne manganese levels (in mg L⁻¹): 0, 4.2, 8.4 and 16.2, in normoxia (7.48±0.28; pH 7.88±0.05) or hypoxia (3.88±0.41; pH 7.44±0.10), totaling eight treatments in quadruplicate. After 15 days of exposure, animals were anesthetized with eugenol (60 mg L⁻¹) and euthanized by section of spinal cord. Blood obtained by caudal puncture and brain, kidney, liver and gill were collected for further analysis.

2.4. Water parameters

Dissolved oxygen (DO) and temperature were measured with an YSI oxygen meter (Model Y5512; YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA). The pH was determined with DMPH-2 pH meter (Digimed, São Paulo, SP, Brazil) and total ammonia nitrogen (TAN) levels by nesslerization according to Eaton et al. (2005). Un-ionized ammonia (NH₃) levels were calculated according to Colt (2002). Water hardness was analyzed by the EDTA titrimetric method. Alkalinity was determined according to Boyd & Tucker (1992).

Water tanks were cleaned daily by siphoning and replaced with pre-adjusted Mn levels [MnSO₄ · 6H₂O]. At the end of each exposure, Mn wastes were chemically treated and properly disposed.

2.5. Analysis

2.5.1. Hematocrit

Hematocrit was determined by the microhematocrit method described by Goldenfarb et al. (1971).

2.5.2. Oxidative stress (OS) parameters determination

Brains and kidneys collected from silver catfish were homogenized in buffer TRIS-HCl 10 mM (pH:7.4), centrifuged (5000 rpm, 15 min). For lipid peroxidation (LP) the supernatant was determined by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described by Ohkawa et al. (1979). Reduced glutathione levels (GSH) were determined in supernatant after reaction with DTNB [5,5'-bis-Dithio-(2-nitrobenzoic acid)], according to Ellman (1959) with modifications (Jacques-Silva et al., 2001). Catalase activity was determined in supernatant according to Aebi (1984).

2.5.3. Mitochondrial viability determination

Mitochondria isolation was performed according to Brustovetsky and Dubinsky (2000) and mitochondrial viability was assessed according to Mosmann (1983).

2.5.4. Sample Mn determination

2.5.4.1. Water samples

Aquaria water samples (5 mL) were collected on even days of the experiment and stored for further analysis.

2.5.4.2. Plasma and tissues samples

Plasma (0.5 mL) was collected after blood centrifugation (3000 rpm, 15 min). Digestion of plasma, liver, kidney, brain and gill was performed by conventional heating block (Velp Scientifica, Model DK, Italy) with open glass vessels. The procedure was carried out with concentrate nitric acid (14 Mol L^{-1}) (Merck, Darmstadt, Germany). H_2O_2 was added and the digests were heated up to 80°C for 1 h. After cooling, digests were diluted with purified water (Milli-Q system, Millipore Corp., Bedford, USA) for further analysis.

2.5.4.3. Mn samples determination

Waterborne Mn levels and Mn bioaccumulation in plasma and tissues were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES, Model Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germany), which was equipped with axial view configuration and a cross flow nebulizer coupled to a Scott type double pass nebulization spray chamber. The wavelength for Mn determination was 257.611 nm and the radiofrequency power was 1400 W. The flow rate for plasma generation, auxiliary and nebulization gas were 20.1 and $0.9 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively. Argon (99.996%, White Martins–Praxair, São Paulo, SP, Brazil) was used for plasma generation, for nebulization and as auxiliary gas. For accuracy evaluation, a certified reference material (CRM) of dogfish muscle tissue (DORM-2) from The National Research Council, Canada, was used.

2.6. Statistics

All statistics were performed using Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, USA). Data were analyzed by two-way ANOVA (Mn x dissolved oxygen levels) followed by Duncan's multiple range test, when appropriate. $P < 0.05$ was regarded as statistically significant.

3. Results

3.1. Water parameters

All of the assessed parameters (pH; DO₂; hardness, alkalinity; NH₄; NH₃; nitrite) showed similar values, showing no variations throughout the experiment (data not shown).

3.2. Hematocrit and final body weight

Silver catfish co-exposed to Mn and either normoxia or hypoxia did not show significant differences in body weight at the end of the treatments. Duncan's test showed a reduction of hematocrit value in fish under normoxia exposed to Mn 8.4 mg L⁻¹ and Mn 16.2 mg L⁻¹, in relation to both Mn 0 mg L⁻¹ and Mn 4.2 mg L⁻¹. Under hypoxia, different concentrations of Mn did not change the hematocrit. Comparing the influence of O₂ levels, normoxia was able to decrease hematocrit of silver catfish exposed to both Mn 8.4 mg L⁻¹ and Mn 16.2 mg L⁻¹ (Table 1).

3.3. Oxidative stress parameters

3.3.1. Brain

Post hoc test showed a significant increase of TBARS levels with the highest Mn concentration (Mn 16.2 mg L⁻¹) in brain of silver catfish under normoxia in relation to all other groups of same oxygen level. Under hypoxia, no differences between the different concentrations of Mn were observed. In fact, normoxia increased TBARS levels in brain of silver catfish exposed to Mn 16.2 mg L⁻¹, as compared to hypoxia at the same Mn concentration (Figure 1A).

Post hoc test showed increased GSH levels in brain of silver catfish under normoxia exposed to Mn 8.4 mg L⁻¹ and Mn 16.2 mg L⁻¹ in relation to Mn 4.2 mg L⁻¹ and Mn 0

mg L⁻¹. In fact, the group treated with the highest Mn concentration showed higher GSH level. Under hypoxia, Mn concentrations of 0 to 8.4 mg L⁻¹ showed no differences in GSH levels, while the highest Mn concentration (Mn 16.2 mg L⁻¹) increased GSH levels as compared to other groups. Hypoxia was able to increase GSH levels in brain of catfish exposed to Mn 0 and Mn 4.2 mg L⁻¹, but not in those exposed to Mn 8.4 and Mn 16.2 mg L⁻¹, in relation to the same Mn concentrations under normoxia (Figure 1B).

Under normoxia, catalase activity was reduced in brain of silver catfish exposed to Mn 8.4 mg L⁻¹ and Mn 16.4 mg L⁻¹, when compared to Mn 0 mg L⁻¹. Under hypoxia, enzyme activity was not modified by Mn concentrations. Comparisons between dissolved oxygen levels showed that hypoxia did not affect catalase activity in either Mn concentration (Figure 1C).

3.3.2. *Kidney*

Under normoxia, increased TBARS levels were observed in kidney of silver catfish exposed to all Mn concentrations as compared to Mn 0 mg L⁻¹ group. Under hypoxia, only the highest Mn concentration increased TBARS levels in relation to other concentrations (Mn 4.2 and 8.4 mg L⁻¹). Hypoxia was able to reduce TBARS levels of Mn 4.2 mg L⁻¹ and Mn 16.2 mg L⁻¹ in relation to normoxia at the same Mn concentrations (Figure 1D).

No significant effects of dissolved oxygen level, Mn concentration or their interaction in kidney of silver catfish were observed (Figure 1E).

Under normoxia, post hoc test showed that all Mn concentrations reduced kidney catalase activity in relation to Mn 0 mg L⁻¹, and the highest concentration (Mn 16.2 mg L⁻¹) also reduced CAT activity in relation to Mn 4.2 mg L⁻¹, but not to Mn 8.4 mg L⁻¹. Under hypoxia, silver catfish exposed to Mn 16.2 mg L⁻¹ showed lower kidney catalase activity when compared to Mn 0 and Mn 4.2 mg L⁻¹. In fact, as compared to normoxia, hypoxia decreased CAT activity in kidney of silver catfish not exposed to Mn (Mn 0 mg L⁻¹) and exposed to Mn 4.2 mg L⁻¹, but not in those exposed to Mn 8.4 mg L⁻¹ and Mn 16.2 mg L⁻¹ (Figure 1F).

3.4. Mitochondrial viability

Under normoxia and hypoxia, all Mn concentrations decreased liver mitochondrial viability in relation to Mn 0 mg L⁻¹ group. In fact, hypoxia was able to increase liver mitochondrial viability of silver catfish exposed to Mn 0 mg L⁻¹, in relation to normoxia (Figure 2A).

Under normoxia, all Mn concentrations decreased gills mitochondrial viability in relation to Mn 0 mg L⁻¹ group, while in hypoxia such viability was reduced by Mn 8.4 mg L⁻¹ and 16.2 mg L⁻¹, when compared to Mn 0 mg L⁻¹ and 4.2 mg L⁻¹, respectively. In fact, hypoxia was able to increase gills mitochondrial viability of silver catfish exposed to Mn 4.2 mg L⁻¹, in relation to normoxia (Figure 2B).

3.5. Mn bioaccumulation

Under normoxia, all Mn concentrations caused an increase of its bioaccumulation in silver catfish liver as compared to Mn 0 mg L⁻¹, whereas under hypoxia the two highest Mn concentrations (8.4 and 16.2 mg L⁻¹) increased its bioaccumulation in relation to Mn 0 mg L⁻¹ and Mn 4.2 mg L⁻¹. Comparing oxygen levels, normoxia was able to significantly increase Mn bioaccumulation in relation to hypoxia in liver of silver catfish exposed to Mn 16.2 mg L⁻¹ (Figure 3A).

Under normoxia, all experimental groups showed higher bioaccumulation of Mn in kidney in relation to control (0 mg L⁻¹). Under hypoxia, only Mn 16.2 mg L⁻¹ increased Mn bioaccumulation as compared to control. After exposition to Mn 8.4 mg L⁻¹, normoxia was able to significantly increase Mn bioaccumulation in kidney of silver catfish in relation to hypoxia at the same Mn concentration (Figure 3B).

Under normoxia and hypoxia, all Mn groups increased Mn bioaccumulation of gills in relation to control, while the highest Mn concentration (16.2 mg L⁻¹) also increased Mn bioaccumulation in relation to Mn 4.2 mg L⁻¹. Normoxia was able to significantly increase Mn accumulation in silver catfish gills at all Mn concentrations in relation to hypoxia (Figure 3C).

Under both normoxia and hypoxia, post hoc test showed a significant increase of Mn bioaccumulation in plasma of silver catfish exposed to all Mn concentrations as compared to Mn 0 mg L⁻¹. In fact, Mn 16.2 mg L⁻¹ caused higher Mn bioaccumulation than those observed at Mn 8.4 mg L⁻¹ and Mn 4.2 mg L⁻¹ in both dissolved oxygen levels. Hypoxia was able to increase Mn concentration in plasma when compared to normoxia at the same Mn concentration (16.2 mg L⁻¹) (Figure 3D).

4. Discussion

Silver catfish co-exposed to Mn and normoxia showed higher LP in brain and kidney; hematocrit was reduced when the two highest Mn concentrations were associated with normoxia, while hypoxia did not change this hematological parameter at the same concentrations of the metal. The effects of Mn on hematologic parameters in fish were reported (Barnhoorn and van Vuuren, 2001), reinforcing the high toxicity of the metal on aquatic organisms. On the other hand, low oxygen levels increased hematocrit values, erythrocyte swelling and new red blood cell formation (Nikinmaa and Tervonen, 2004). In this sense, hemoglobin is the circulating oxygen-transport protein in fishes and other vertebrates, and its components can have greater diversity due to different oxygen concentrations. Moreover, anaerobic metabolism developed during fish hypoxia seems to be related to increase of hematocrit and higher levels of red blood cells (Affonso et al., 2002). Although these studies showed compensatory mechanisms to overcome the low rate of bioavailable oxygen in the aquatic environment, here hypoxia did not increase hematocrit in catfish, but was capable of preventing damages of Mn exposition under normoxia, representing a protective factor of the lack of oxygen on hematopoiesis.

The mechanism of Mn toxicity is not fully understood, but its accumulation in the mitochondrial matrix showed inhibitory effects on oxidative phosphorylation (Gavin et al., 1992), reflecting its toxicity on organelle viability. As observed here, Mn showed its toxic effects on mitochondria of liver and gills in silver catfish, which showed lower viability under normoxia. Several mechanisms may be involved in Mn cell toxicity, including substitution of Fe²⁺ in cytochromes of the cellular respiratory

chain (Missy et al., 2000), which lead to ROS generation , as well as a direct inhibitory effect of metal on mitochondrial enzymes (Singh et al., 1979).

Alongside this, groups co-treated with Mn and normoxia also showed higher metal uptake, reinforcing a causal relationship. Mn bioaccumulation was higher under normoxia in liver, kidney and gills, but not in plasma of silver catfish. In fact, plasma corresponds to a passage to deposit tissue and has no storage function like the other evaluated tissues (Van der Putte and Pärt, 1982). In addition, as expected, positive correlations between waterborne Mn levels and its bioaccumulation in tissues were also observed, confirming Mn toxicity.

Two hypotheses can be proposed to explain the lower toxicity of Mn when silver catfish were co-exposed to hypoxia: i) development of tolerance and cellular adaptation of fish to hypoxia; ii) development of hormesis due to environmental stressors. Indeed, an adaptation process was described as the ability of cells to adapt to low oxygen levels through activation of HIF (hypoxia-inducible factor) (Oweson et al., 2010), whose expression was demonstrated in different organisms throughout evolution (Wu, 2002; Nikinmaa and Rees, 2005). Furthermore, adaptation and tolerance to hypoxia were reported in fish (Schurmann and Steffensen, 1992), but a high variability of responses was observed at different temperatures and exposure duration (Plante et al., 1998). Interestingly, a study showed the influence of hypoxia on morphological changes of gills, whose increased respiratory surface was related to higher oxygen uptake (Sollid et al., 2003). This capacity to change physiological functions, which might reduce the toxicity of toxic substances to fish, may have occurred in our study, observed by lower Mn bioaccumulation in organs of silver catfish exposed to hypoxia when compared to those exposed to normoxia. However, Mn levels in plasma were higher under hypoxia, showing that no change occurred in metal uptake. This finding leads us to think that other pharmacokinetic mechanisms involved in the distribution and bioaccumulation of Mn may have been adaptively modified by this species, but this possibility deserves to be investigated in the future.

The second hypothesis suggests that fish exposed to environmental stressors are able to trigger defense mechanisms, which would act much more efficiently than in fish not previously exposed to stressors. This hypothesis has been used to explain the antioxidant defenses in mammals, but can also be used for fish,

as previously reported by Bengtsson (1979). This author proposed the development of hormesis during exposure of fishes to low concentrations of environmental pollutants. Another study showed an enhanced growth rate of crustacean larvae exposed to petroleum pollutants for short periods as compared to unexposed ones, whose response was considered by the authors as hormesis (Laughlin et al., 1981), whereas low levels of stress showed positive effects on fish reproduction against greater stress, which presented negative effects (Schreck, 2010). These data led the authors to the concept of hormesis, which is a useful way to think about the effect of stressors on fishes. So, hormesis is not a innovative term employed in environmental contaminants and fishes, and can be defined as a physiological response that helps the organism to react to the continuous presence of a small stimulus such as low concentrations of ROS or stress, which can induce an increase in the antioxidant defenses, promoting compensatory processes following an initial disruption in homeostasis (hormesis hypothesis) (Calabrese and Baldwin, 2002). Furthermore, this hypothesis has been extended to such situations as ROS generation and may be applied here because LP and bioaccumulation was lower in silver catfish co-exposed to Mn and hypoxia than in those co-exposed to Mn and normoxia.

The lower levels of LP, larger mitochondrial survival, and largely unchanged hematocrit observed in silver catfish under hypoxia may all indicate the development of mechanisms of adaptation and tolerance to a hostile environment, as well as the development of other defense mechanisms (Hamdoun and Epel, 2007) resulting from hormesis. It was suggested that increased dissolved oxygen levels may be able to increase ROS generation due to leakage of electrons from the electron-transport chains to join with molecular oxygen. In fact, under hyperoxia different fish species present oxidative stress development (Lushchak et al., 2005). Similar findings (Viarengo et al., 1995) led to the idea that low oxygen levels can minimize ROS production in aquatic organisms. Moreover, hypoxia also induced OS, but this condition has been often accompanied by increase of enzymatic antioxidant defenses (Braun et al., 2008), and therefore is consistent with the hormesis hypothesis proposed above. Interestingly, Hermes-Lima et al. (1998) proposed an idea of "preparation to OS" that seems to be similar to hormesis. A recent study showed that Mn-induced toxicity was related to metal accumulation

and misregulated homeostasis of sea urchin embryos, stimulating protective agents against apoptosis (Pinsino et al., 2010). Concerning antioxidant defenses, catalase activity in brain and kidney was slightly modified by the treatments, whereas GSH levels in brain were more clearly improved with increasing concentrations of Mn under hypoxia, reinforcing the hypothesis that low levels of oxygen can stimulate antioxidant defenses, which may be involved in minimizing metal toxicity.

5. Conclusion

Our study shows for the first time that under hypoxia, Mn toxicity in silver catfish is able to favor the development of adaptive mechanisms and/or hormesis, which can reduce accumulation and toxicity of the metal and activate antioxidant defenses in order to minimize oxidative damages and cell death. More studies on the cellular mechanisms involved in tolerance and adaptation as well in the hormesis suggested here should be conducted.

Acknowledgements

The authors (M.E.B.; B.B.; F.E.M.M.; C.S.P. and G.S.D.) are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), (K.R.) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Center for studies of Adaptations of Aquatic Biota of the Amazon (Adapta) for fellowships and financial support.

6. References

- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Meth. Enzymol. 105, 121–126.
- Affonso, E.G., Polez, V.L.P., Corrêa, C.F., Mazon, A.F., Araújo, M.R.R., Moraes, G., Rantin, F.T., 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hipoxia. Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol. 133, 375–382.
- Baden, S.P., Eriksson, S.P., Weeks, J.M., 1995. Uptake, accumulation and regulation of manganese during experimental hypoxia and anoxia in the decapod *Nephrops norvegicus* (L.). Mar. Pollut. Bull. 31, 93–102.
- Baldisserotto, B., Garcia, L.O., Benaduce, A. P., Duarte, R.M., Nascimento, T.L., Gomes, L.C., Chippari Gomes, A.R., Val, A.L., 2011. Arch. Environ. Contamin. Toxicol. Article in press: doi: 10.1007/s00244-011-9673-z
- Barnhoorn, I., van Vuuren, J.H.J., 2001. Sublethal effects of manganese on the haematology and osmoregulation of *Oreochromis mossambicus* after acute exposure. Afric. J. Aquat. Sci. 26(1), 1–7.
- Bengtsson, B.E. 1979. Increased growth in minnows exposed to PCBs. Ambio, 8(4), 169–170.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, USA.
- Braun, N., Lima, R.L., Dalla Flora, F., Lang, M.E., Bauermann, L.F., Loro, V.L., Baldisserotto, B., 2008. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. Ciência Animal Brasileira 9(3), 811–814.
- Braun, N. Lima, R.L., Moraes, B. Loro, V.L., 2006. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. Aquacult. Res. 37, 1524–1531.
- Brustovetsky, N., Dubinsky, J. M., 2000. Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium. J. Neurosci. 20, 103–113.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2002. Defining hormesis. Hum. Exp. Toxicol. 21, 91–97.

- Colt, J., 2002. List of spreadsheets prepared as a complement (Available in <http://www.fisheries.org/afs/hatchery.html>). In: Wedemeyer G.A. (ed) Fish hatchery management, 2ndedn. Amer Fish Soc Pub.
- Crossgrove, J., Zheng, W., 2004. Manganese toxicity upon overexposure NMR. *Biomed.* 17, 544–553.
- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st edn. Amer Public Health Assn, USA.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Stoliar, O.B., Nam, Y.K., 2011. Various responses to copper and manganese exposure of *Carassius auratus gibelio* from two populations. *Comp. Biochem. Physiol. Part. C: Toxicol. Pharmacol.* Article in Press: [doi:10.1016/j.cbpc.2011.06.001](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.06.001)
- Gavin, C.E., Gunter, K.K., Gunter, T.E., 1992. Manganese sequestration by mitochondria and inhibition of oxidative phosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115, 1–5.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Path.* 56, 35–39.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hamdoun, A., Epel, D., 2007. Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 1745–1750.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In Storey, K.B. (Ed), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Wiley-Liss, Hoboken, pp. 319–368.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. Part. B: Biochem. Mol. Biol.* 120, 437–448.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Appl. Toxicol.* 88, 119–125.

- Laughlin, R.B.Jr., Ng, J., Guard, H.E., 1981. Hormesis: a response to low environmental concentrations of petroleum hydrocarbons. *Science*. 211, 705–707.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T. V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptative response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1670–1680.
- Missy, P., Joyeux, M., Lanhers, M.C., Cunat, L., Burnel, D., 2000. Effects of subchronic exposure to manganese chloride on tissue distribution of three essential elements in rats. *Int. J. Toxicol.* 19, 313–321.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol. Meth.* 65(1-2), 55–63 .
- Nikinmaa, M., Rees, B.B., 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, 1079–1090.
- Nikinmaa, M. Tervonen, V., 2004. Regulation of blood haemoglobin concentration in hypoxic fish. In: *Proceedings of the 7th International Symposium on Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality*, edited by Rupp., G.L. and White, M.D., Athens, G.A.: U.S. Environmental Protection Agency, Ecosys. Res. Divis. Pp. 243–252.
- Ohkawa, H., Ohishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Oweson, C., Li, C., Söderhäll, I., Hernroth, B., 2010. Effects of manganese and hypoxia on coelomocyte renewal in the echinoderm *Asterias rubens* (L.) *Aquat. Toxicol.* 100, 84–90.
- Pinsino, A., Matranga, V., Trinchella, F., Roccheri, M.C., 2010. Sea urchin embryos as an in vivo model for the assessment of manganese toxicity: developmental and stress response effects. *Ecotoxicology.* 19, 555–562.
- Plante, S., Chabot, D., Dutil, J.D., 1998. Hypoxia tolerance in Atlantic cod. *J. Fish. Biol.* 53, 1342–1356.
- Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: The role of allostasis an hormesis. *Gen. Comp. Endocrin.* 165(3), 549–556.

- Schurmann, H., Steffensen, J.F., 1992. Lethal oxygen levels at different temperature during hypoxia of the Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Fish. Biol. 41, 927–934.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: introduction. In: Sies, H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Academic Press, San Diego, pp. 21–48.
- Singh, S., Shukla, G.S., Srivastava, R.S., Chandra, S.V., 1979. The interaction between ethanol and manganese in rat brain. Arch. Toxicol. 41, 307–316.
- Sollid, J., De Angelis, P., Gundersen, K., Nilsson, G.E., 2003. Hypoxia induces adaptative and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. J. Exp. Biol. 206, 3667–3673.
- Storey, K.B., 2004. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Wiley-Liss and Hoboken, New Jersey, pp. 319–368.
- Stubblefield, W.A., Brinkman, S.F., Davies, P.H., Garrison, T.D., Hockett, J.R., McIntyre, M. W., 1997. Effects of water hardness on the toxicity of manganese to developing Brown trout (*Salmo trutta*). Environ. Toxicol. Chem. 16(10), 2082–2089.
- Van Der Putte, I., Pärt, P., 1982. Oxygen and chromium transfer in perfused gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to hexavalent chromium at two different pH levels. Aquatic. Toxicol. 2, 31–45.
- Viarengo, A., Canesi, L., Garcia Martinez, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., 1995. Prooxidant process and antioxidant defense systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). Comp. Biochem. Physiol. Part. B: Biochem. Mol. Biol. 111, 119–126.
- Winemiller, K. O., Agostinho, A. A., Caramaschi, E. P., 2008. Fish Ecology in Tropical Streams, in: Tropical stream ecology, 1st ed. Elsevier, London, pp. 107–140.
- Wu, R.S.S., 2002. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. Mar. Poll. Bull. 45, 35–45.
- Zhang, S., Zhou, Z., Fu, J., 2003. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. Environ. Res. 93, 149–157.

LEGENDS FOR TABLES

Table 1:

Final body weight (W) and hematocrit (% cell volume) of silver catfish exposed to manganese concentrations under normoxia (N) and hypoxia (H). Values expressed as mean \pm S.E.M.*Indicates significant difference from normoxia in the same Mn concentration; Different lowercase in the columns indicates significant difference among Mn concentrations in the same dissolved oxygen level.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1:

Levels of lipid peroxidation, GSH and catalase activity in brain (A, B and C, respectively) and kidney (D, E and F, respectively) of silver catfish co-exposed to manganese and either normoxia or hypoxia for 15 days. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Lowercase indicates significant difference between the different concentrations of Mn and the same dissolved oxygen level ($P<0.05$); *Indicates difference between normoxia and hypoxia in the same Mn concentration ($P<0.05$).

Figure 2:

Mitochondrial viability of silver catfish liver (A) and gills (B) co-exposed to manganese and either normoxia or hypoxia for 15 days. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Lowercase indicates significant difference between the different Mn concentrations and the same dissolved oxygen level ($P<0.05$); *Indicates difference between normoxia and hypoxia in the same Mn concentration ($P<0.05$).

Figure 3:

Multiple regressions between Mn bioaccumulation and Mn waterborne levels in silver catfish liver (A), kidney (B), gills (C) and plasma (D) co-exposed to Mn 0, 4.2, 8.4 and 16.2 mg.L⁻¹ for 15 days under normoxia or hypoxia. The r^2 values for liver, kidney, gills and plasma were: 0.71 and 0.69; 0.70 and 0.84; 0.83 and 0.78; 0.80 and 0.68 in normoxia and hypoxia, respectively.

Table 1:

Mn (mg L ⁻¹)	W (g)		Hematocrit (%)	
	N	H	N	H
0	53.00 ± 5.00	33.00 ± 1.00	28.75 ± 3.83 ^a	27.90 ± 1.79
4.2	29.5 ± 2.47	45.50 ± 8.83	27.00 ± 1.76 ^a	27.80 ± 1.32
8.4	40.50 ± 0.35	43.00 ± 0.70	19.30 ± 1.81 ^b	29.50 ± 2.53*
16.2	36.00 ± 2.82	42.00 ± 0.70	20.70 ± 1.73 ^b	26.90 ± 2.10*

Figure 1:

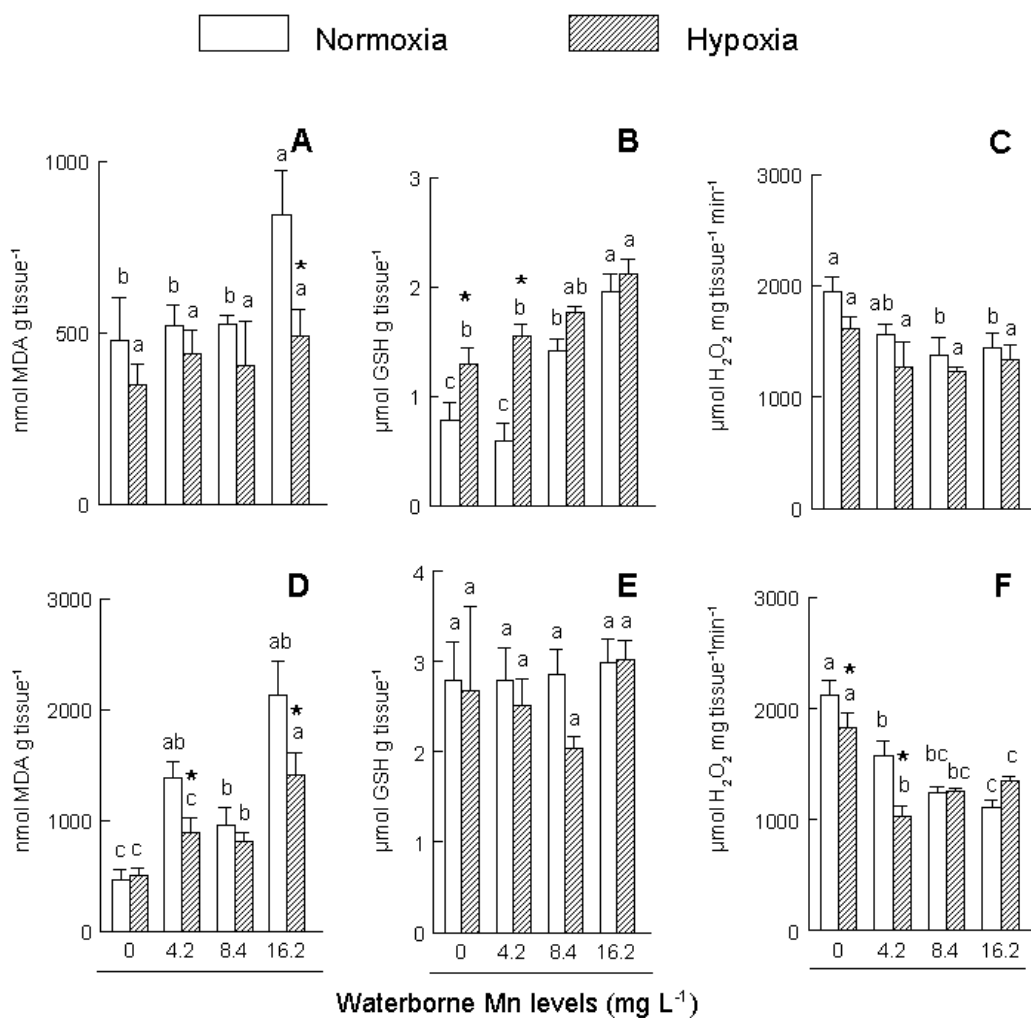


Figure 2:

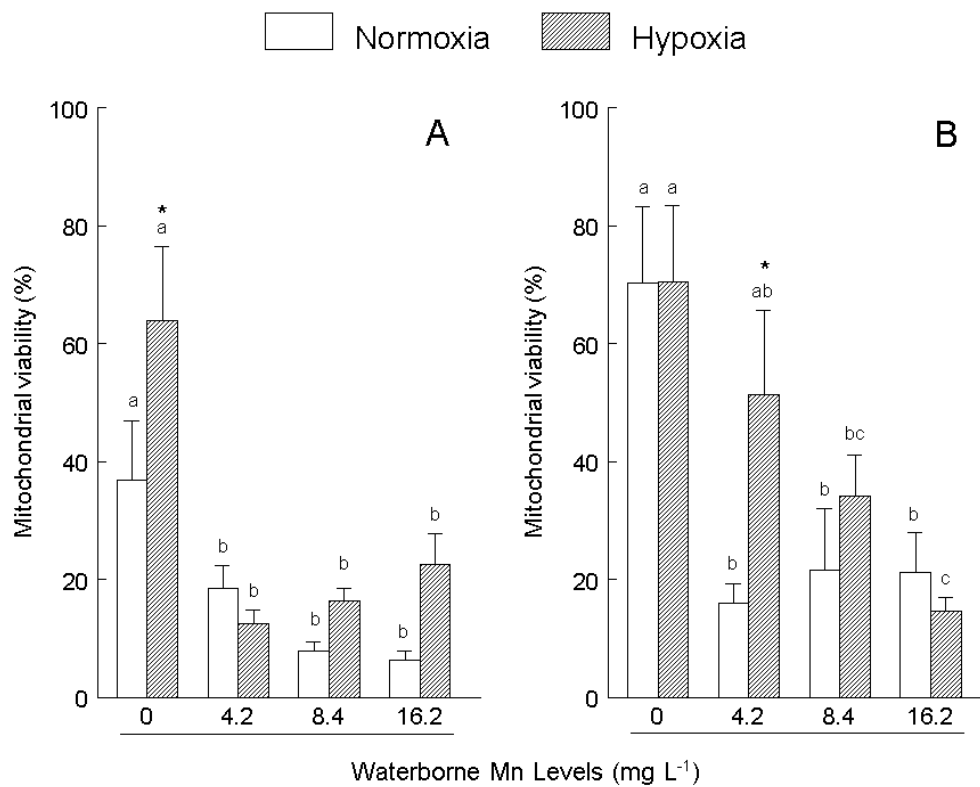
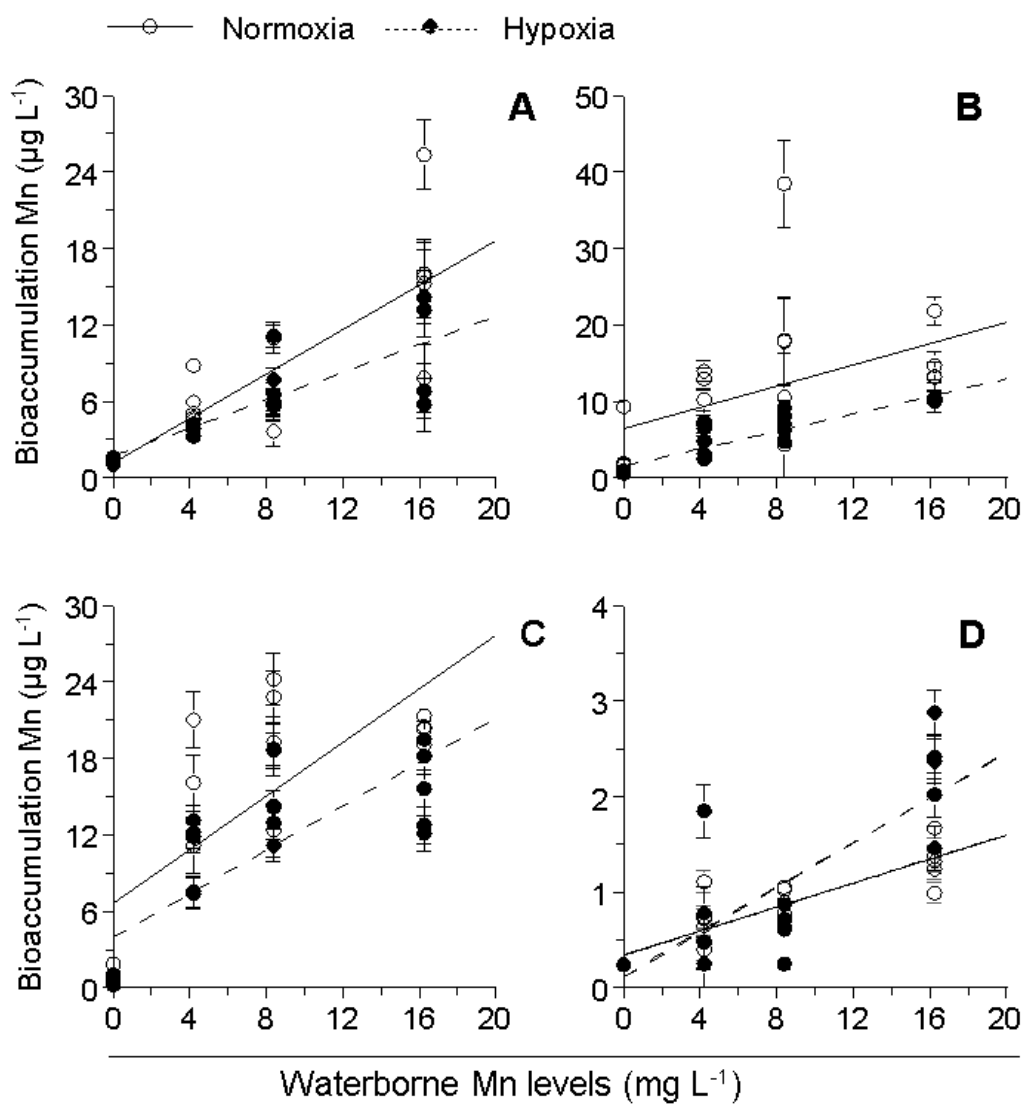


Figure 3:



4 – DISCUSSÃO

Entre os diversos poluentes que geralmente ocorrem em ambientes aquáticos, os metais têm recebido atenção especial por se tratarem de contaminantes conservativos, não biodegradados ou biotransformados, permanecendo como contaminantes do ecossistema e de cadeias alimentares específicas (SMITH, 1993). O aumento de metais nos ecossistemas aquáticos tem despertado interesse, principalmente da comunidade científica, pelo destino desses contaminantes, bem como pela sua distribuição nas cadeias alimentares (REINFELDER et al., 1998).

Nesse contexto, o Mn permanece ainda muito disponível no meio ambiente, devido principalmente à ação antropogênica ligado a atividades agrícolas, pelo uso de fertilizantes e pesticidas contendo o metal em sua composição (BECKER et al., 2009), fato que pode afetar direta ou indiretamente comunidades ribeirinhas próximas a essas áreas.

Além disso, tendo em vista do crescimento da aquicultura mundial, que em 2008 atingiu a importância de 90 milhões de toneladas, compreendendo 80 milhões de toneladas de águas marinhas e um recorde de 10 milhões de toneladas de águas continentais segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2010), mostra-se relevante o estudo de substâncias contaminantes, além de medidas eficazes, que além de contribuírem para a redução desse processo, melhorem a qualidade da produção aquícola mundial.

No Brasil, a aquicultura continental representa 19,6% da produção total de pescado mostrando um crescimento de 10,2% em 2007 em relação ao ano de 2006, sendo que desses, 18,3% na região Norte, 22,0 % na região Nordeste, 2,6% na região Sul, e 18,5% na Centro-Oeste, com exceção da região Sudeste que apresentou decréscimo de 1,3% em 2007 (IBAMA, 2007). A região Sul produziu 64.483,5 toneladas de pescado em 2007 (valor total estimado de R\$ 249.535.100,0), constituindo a maior parcela de contribuição na produção nacional com 30,6%. As espécies mais representativas dessa produção, constituídas pela tilápia e carpa, tiveram suas maiores produções concentradas nos estados do Ceará, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (IBAMA, 2007).

Nesse estudo, optou-se por utilizar a espécie jundiá (*Rhamdia quelen*) por ser um peixe de água doce bastante apreciado para consumo humano na Argentina, Brasil e Uruguai e com um mercado importante neste subcontinente (SALHI et al., 2004) além de representar um grande potencial para o desenvolvimento da piscicultura brasileira, sendo muito promissor considerando a sua facilidade de reprodução e boa conversão alimentar (RADÜNZ NETO, 2004).

Dessa forma, pela determinação da concentração letal de Mn ($CL_{50Mn-96h}$) em jundiás expostos à normóxia ($CL_{50Mn-96h} = 1.383,48$ mg/L), foi possível observar a grande resistência dessa espécie à elevadas concentrações de Mn (superiores a 1.710,5 mg/L Mn), sob hipóxia, uma vez que as concentrações utilizadas nos testes de mortalidade foram superiores às que normalmente ocorrem em locais de exposição ao metal (BALZER, 1982), bem como em episódios de contaminação, ou uso de agrotóxicos e fertilizantes.

Neste estudo não foi observada alteração do hematócrito nas diferentes concentrações de Mn testadas (4,2; 8,4 e 16,2 mg/L) sob condições de hipóxia, embora o mesmo parâmetro tenha se apresentado reduzido nas maiores concentrações de Mn (8,4 e 16,2 mg/L), sob condições de normóxia. Acredita-se que este achado poderia estar fortemente relacionado com o fato de que a hipóxia contribui para o aumento do número de eritrócitos, bem como aumento do volume plasmático por aumentar a proliferação celular (JENSEN; NIKIMAA; WEBER, 1993) concordando com este estudo, que apresentou diminuição do hematócrito, sob normóxia, nas duas maiores concentrações de Mn (8,4 e 16,2 mg/L). Além disso, os níveis de LPO encefálico e renal mostraram-se aumentados na maior concentração de Mn utilizada (16,2 mg/L), sob normóxia, demonstrando a presença de danos oxidativos nesta concentração. Porém sob hipóxia, nesta mesma concentração de Mn (16,2 mg/L), houve uma redução da LPO encefálica até os níveis do controle, enquanto que a LPO renal apresentou-se reduzida, embora não tenha atingido os níveis basais.

Partindo da premissa que os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações quando comparado ao substrato oxidável, têm a capacidade de atrasar ou inibir a oxidação deste substrato de maneira eficaz, a fim de manter o equilíbrio entre os pró-oxidantes e os agentes antioxidantes (SIES e STAHL, 1995), as espécies reativas podem ser geradas tanto endogenamente como conseqüência

direta no metabolismo do oxigênio ou em situações não fisiológicas como exposição a xenobióticos que provocam redução incompleta do oxigênio (KASAHARA et al., 2002).

Desse modo, para proteger-se, a célula dispõe de um sistema de defesa que pode atuar como detoxificador do agente antes que este cause lesão (constituído por GSH, SOD, catalase, GPx e vitamina E (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), ou então um sistema que minimize efeitos deletérios, constituído por ácido ascórbico, GR e GPx, entre outros (GUPTA et al., 2004; JIANG et al., 2008). Nesse estudo, os níveis de GSH foram mais elevados no encéfalo de jundiás expostos a mais alta concentração de Mn (16,2 mg/L), sob hipóxia, quando comparados às demais concentrações de Mn neste mesmo nível de oxigênio dissolvido. Porém, quando comparados os níveis de oxigênio, a hipóxia mostrou um aumento dos níveis de GSH, em relação à normóxia, apenas na mais baixa concentração testada de Mn (4,2 mg/L), sugerindo assim, uma proteção frente a baixos níveis de um agente tóxico como o Mn, aqui demonstrado pelo aumento dos níveis de GSH, embora essa proteção tenha sido insuficiente à medida que as concentrações de Mn foram aumentadas.

Quanto à atividade da catalase, não houve diferença significativa no encéfalo de jundiás expostos ao Mn sob hipóxia moderada, embora tenha sido observada uma diminuição nos níveis da atividade da enzima em jundiás expostos às diferentes concentrações de Mn testadas (8,4 e 16,2 mg/L), sob normóxia. Isso estaria de acordo com o que alguns pesquisadores têm proposto ao assumir que o EO severo poderia suprimir a atividade de enzimas antioxidantes devido a danos oxidativos e à perda dos mecanismos compensatórios (ATLI et al., 2006; ZHANG, et al., 2004), uma vez que sua atividade quase não variou nas diferentes concentrações do metal.

Por outro lado quando foram analisados os níveis de GSH em rim de jundiás, nenhuma diferença significativa entre as concentrações de Mn testadas foi observada, como também entre os níveis de oxigênio. Pelos resultados dos níveis de GSH observados nesse tecido pode-se concluir que o mesmo não constitui o principal sítio de metabolização e distribuição de xenobióticos em peixes, sendo o fígado o principal responsável por tal função (BAGNYUKOVA et al., 2006)

possuindo uma maior atividade da GST quando comparado com outros tecidos (LUSHCHAK et al., 2005).

Porém, quando a atividade da catalase renal foi analisada, observou-se, sob normóxia, diminuição na atividade da enzima nas concentrações de 4,2; 8,4 e 16,2 mg/L de Mn quando comparadas ao controle (0 mg/L Mn), embora a concentração intermediária tenha apresentado diferença do grupo com ausência de Mn, mas não dos dois extremos. Tal comportamento foi observado também no rim de jundiás expostos ao Mn em condições de hipóxia. Entretanto, quando comparados os níveis de oxigênio, foi observada diferença apenas em jundiás expostos à menor concentração testada de Mn (4,2 mg/L), sob hipóxia.

Por outro lado, conforme Salehi et al. (2003) níveis muito elevados de Mn seriam necessários para produzir sintomas neurológicos em roedores, sugerindo que estes estariam menos suscetíveis aos efeitos neurotóxicos do Mn. Assim, quanto à análise da viabilidade mitocondrial, o Mn provocou acentuada diminuição na viabilidade de mitocôndrias isoladas de fígado de jundiás, para todas as concentrações testadas do metal, em ambos os níveis de oxigênio. Segundo Singh et al. (1979), isso estaria relacionado à diminuição da atividade das desidrogenases mitocondriais, o que levaria ao dano celular e apoptose, uma vez que o teste de redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, portanto, à viabilidade mitocondrial e celular. No que se refere a brânquias de jundiás, foi observada redução da viabilidade mitocondrial em todas as concentrações testadas de Mn, em ambos os níveis de oxigênio. A hipóxia mostrou capacidade de aumentar a viabilidade mitocondrial (e conseqüentemente celular), frente à menor concentração do metal (4,2 mg de Mn/L) utilizada, sugerindo assim uma proteção nas brânquias, nessa condição.

A apoptose é um tipo de morte celular programada observada em diversas situações fisiológicas bem como em patologias relacionadas com doenças neurodegenerativas, infecções, intoxicação, entre outras. Esse processo caracteriza-se por alterações morfológicas, pela participação das caspases (grupo de proteases com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas após um resíduo de ácido aspártico) (ALNEMRI et al., 1996), liberação do citocromo c mitocondrial e fragmentação nuclear (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHERIGON, 1998). Nos diferentes processos de morte celular a participação das

mitocôndrias é fundamental, embora sua importância continue sendo pesquisada a fim de melhor compreender os processos de morte celular por outras vias. Estudos mais recentes mostraram que a transição de permeabilidade mitocondrial estaria presente na morte celular por apoptose (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 1998; LEMASTERS et al., 1998).

Quanto à bioacumulação de Mn em fígado, sob normóxia, foi possível observar que foi maior em todas as concentrações em relação ao controle (0 mg/L). Sob hipóxia esse aumento foi observado somente nas duas maiores concentrações (8,4 e 16,2 mg/L) do metal. No rim, sob normóxia, ocorreu uma maior bioacumulação para todas as concentrações de Mn testadas em relação ao controle (0 mg/L), porém sob hipóxia, somente na maior concentração de Mn utilizada (16,2 mg/L) foi observado aumento da bioacumulação. Com relação a brânquias, em ambos os níveis de oxigênio houve aumento da bioacumulação quando comparados ao controle (0 mg/L de Mn). Quanto ao plasma, todas as concentrações de Mn testadas foram capazes de aumentar a bioacumulação, com o aumento das concentrações de Mn, para ambos os níveis de oxigênio. Entretanto, sob hipóxia, os níveis de bioacumulação foram maiores que em normóxia na maior concentração testada de Mn (16,2 mg/L).

Este resultado pode ser explicado pelo fato de que o plasma constitui-se em um tecido de passagem, a partir do qual ocorre a redistribuição de substâncias e xenobióticos para os demais órgãos e tecidos, não possuindo, portanto, função de armazenamento (VAN DER PUTTE; PÄRT, 1982). Além disso, a natureza e extensão destas respostas biológicas dependem amplamente da concentração da espécie metálica presente além de processos físicos e químicos na água. Assim, segundo SHENKIN (1995), alguns organismos apresentariam tolerância a alguns metais em processos bioquímicos, até certo limite, que uma vez atingido se iniciaria o desenvolvimento de efeitos tóxicos. Caso a concentração do metal aumentasse nesse meio, o organismo passaria a não tolerar a presença daquele metal, decorrendo o óbito.

Ainda, quanto ao teor de oxigênio dissolvido, preponderante na aquicultura, sabe-se que um teor igual ou abaixo de 4 mg/L por longos períodos poderia provocar estresse, doenças, diminuição no crescimento e morte em jundiás (LUCHINI, 1992). Pode-se afirmar que estes relatos corroboram com os valores de

oxigênio dissolvido verificados neste estudo ($7,48 \pm 0,28$ para normóxia e $3,88 \pm 0,41$ para hipóxia) posto que os valores experimentais encontraram-se dentro da faixa limite, sendo possível considerar então que tal aspecto não influenciou negativamente no desempenho desta espécie.

Ainda, outra descoberta de grande relevância, se constitui no fator de hipóxia-induzível (HIF) (do inglês *Hypoxia-inducible factor*) que é responsável pela codificação de proteínas com relevantes funções fisiológicas conforme proposto por Terova et al. (2008) e Oweson et al. (2010). O HIF-1 constitui-se num heterodímero composto de uma subunidade HIF-1a regulada por oxigênio e uma subunidade HIF-1b expressa constitutivamente (WANG et al., 1995; SEMENZA, 2007). A expressão desse fator, que já foi demonstrada em diferentes organismos ao longo da evolução (WU, 2002; NIKINMAA e REES, 2005), conferiria às espécies providas de tal fator em sua expressão gênica uma maior proteção à ambientes hipóxicos. Como o jundiá constitui-se em uma espécie com capacidade de adaptação a diferentes ambientes seria provável a expressão desse fator na espécie.

Além disso, neste estudo foi observado certo grau de adaptação quando os jundiás foram submetidos à hipóxia (SCHURMANN e STEFFENSEN, 1992; SOLLID et al., 2003) em relação aos efeitos provocados pela normóxia, uma vez que a toxicidade do Mn foi mais baixa durante a exposição ao metal sob hipóxia, fato que induziria a pensar no conceito de hormesis, já proposto por outros autores (BENGTSSON, 1979; LAUGHLIN; NG; GUARD, 1981) e que é conceituado, segundo Calabrese e Baldwin (2002), como uma resposta fisiológica que ajuda o organismo a reagir à presença contínua de um pequeno estímulo, tais como baixas concentrações de EROs ou outro tipo de estresse, como fatores ambientais, que poderiam induzir um aumento nas defesas antioxidantes, promovendo mecanismos de compensação após uma ruptura inicial da homeostase.

Ainda, torna-se relevante salientar que esse conceito pode ser aqui aplicado, uma vez que os níveis de LPO e bioacumulação encontrados apresentaram-se maiores em jundiás co-expostos ao Mn e normóxia, que para os co-expostos ao Mn e hipóxia e, além disso, os níveis menores de LPO somados ao hematócrito praticamente inalterado, bem como maior sobrevivência mitocondrial em jundiás expostos à hipóxia, reforçaria a idéia do desenvolvimento desse mecanismo de defesa frente ao estresse, uma vez que outros estudos (LUSHCHAK et al., 2005) já

relataram que em situações de hiperóxia diferentes espécies são capazes de desenvolver EO, principalmente pela grande disponibilidade de oxigênio no meio.

6 – CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos foi possível chegar às seguintes conclusões:

1. Jundiás apresentariam uma proteção frente a concentrações elevadas de Mn, uma vez que tal espécie revelou uma $CL_{50Mn-96h}$ de 1. 383,48 mg/L, somente sob normóxia, não sendo observada letalidade para peixes expostos à hipóxia nas concentrações testadas.
2. O Mn quando combinado à normóxia levaria ao desenvolvimento de EO pelo aumento da lipoperoxidação em encéfalo e rim de jundiás, bem como redução da viabilidade mitocondrial e celular em fígado e brânquias da mesma espécie.
3. A hipóxia moderada representaria uma proteção em jundiás expostos ao Mn, nas concentrações testadas, por diminuir a lipoperoxidação em encéfalo e rim observada em normóxia, além de melhorar a viabilidade mitocondrial e celular de brânquias na menor concentração testada do metal (4,2 mg/L).
4. A situação de hipóxia moderada levaria a uma menor bioacumulação de Mn em diferentes tecidos de jundiás, aqui representados pelo fígado, rim e brânquias, excetuando-se o plasma, por este último constituir-se num tecido de passagem, não respeitando essa relação.
5. Jundiás apresentariam uma maior adaptação frente a condições de hipóxia moderada, uma vez que os valores de hematócrito não foram modificados sob hipóxia, nas concentrações testadas do metal. Além disso, o estudo mostra, pela primeira vez, que sob hipóxia, a toxicidade do Mn em jundiás favoreceria o desenvolvimento do mecanismo de hormesis, o que poderia ativar mecanismos de defesas antioxidantes, tais como GSH e catalase, a fim de minimizar os danos oxidativos e morte celular.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere*. v.65, n.6, p.952-962, 2006.

ALESSIO, L.; CAMPAGNA, M.; LUCCHINI, R. From lead to manganese through mercury: mythology, science, and lessons for prevention. *American Journal of Industrial Medicine* v. 50, n. 11, p. 779-787, 2007.

ALNEMRI et. al., Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. v. 87, n. 2, p. 171-171, 1996.

ANDA. Agência de Notícias de Direitos Animais. Manganês pode ter provocado mortandade de peixes no Rio dos Sinos, RS. 22/12/2010. Disponível em: <http://www.anda.jor.br/22/12/2010/manganes-pode-ter-provocado-mortandade-de-peixes-no-sinos>. Acesso em 04/04/2011.

ASCHNER, M.; ERIKSON, K.M.; DORMAN, D.C. Manganese dosimetry: Species differences and implications for neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 1-32. *Toxic Effects of metals*, Em: Cassaret and Doulls, Curtis D. Klassen, *Toxicology, the basic science of poisons*. Mc.Graw Hill, 7th ed, Kansas, p. 955-956, 2005.

ATLI et. al. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. v. 143, p. 218-224, 2006.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Manganese. Sep. 2000 Public Health Service, Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.html>. Acesso em 10/09/2011.

AUCOUR et al. The Amazon River: behavior of metals (Fe, Al, Mn) and dissolved organic matter in the initial mixing at the Rio Negro/Solimões confluence. *Chemical Geology*. v. 197, p. 271-285, 2003.

BAGNYUKOVA et al. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*. v. 78, p. 325-331, 2006.

BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002.

BALZER, W. On the distribution of iron and manganese at the sediment/water interface: thermodynamic versus kinetic control. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. v. 46, p. 1153–1161, 1982.

BARCELLOS et al. Nursery rearing of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture*. v. 232, p. 383-394, 2004.

BECKER, A. G.; MORAES, B.S.; MENEZES, C. C. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p. 1734-1739, 2009.

BENGTSSON, B.E. Increased growth in minnows exposed to PCBs. *Ambio*, v. 8, n.4, p. 169-170, 1979.

BING, O.H.; APSTEIN, C.S.; BROOKS, W.W. Factors influencing tolerance of cardiac muscle to hypoxia. *Recent Advances in Studies in Cardiac Structure and Metabolism*. v. 10, p. 343-354, 1975.

BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, USA, 1992.

BRAUN et al. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Ciência Animal Brasileira* v. 9, n. 3, p. 811-814, 2008.

BROWN, S.; TAYLOR, N.M. Could mitochondrial dysfunction play a role in manganese toxicity? *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 7, p. 49-57, 1999.

BRUSTOVETSKY, N.; DUBINSKY, J. M. Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium. *Journal of Neuroscience*. v. 20, p.103-113, 2000.

BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, v. 224, p. 569-573, 1984.

CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Defining hormesis. *Hum. Exp. Toxicology*. v. 21, p. 91-97, 2002.

CHALMIN et.al. Minerals discovered in paleolithic black pigments by transmission electron microscopy and micro-X-ray absorption near-edge structure. *Applied Physics A*. v. 83, n. 12, v. 213-218, 2006.

CHIPPARI-GOMES et al. Hypoxia tolerance and adaptations in fishes: the case of Amazon Cichlids. In: VAL, A. L. & KAPOOR, B. G. (Eds). *Fish adaptations*. New Hampshire, Science Publisheres, p.37-49, 2003.

CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperatures for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Journal of Applied Aquaculture*. v.9, n.4, p.11-21, 1999.

CNUBBEN et al. The interplay of glutathione-released process in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 10, p. 141-152, 2001.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Annals of Intern Medicine*, v.111, p.918-931, 1989.

CROSSGROVE, J.; ZHENG, W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR in Biomedicine*, v. 17, p. 544-553, 2004.

CURTIS et al. Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.104, n. 9, p. 3450-3455, 2007.

DAVIES, K.J.A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*. v. 61, p. 1-31, 2000.

DAVIS, J. C. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *Journal fish research board Canada*. v.32, p. 2295-2332, 1975.

DEJOURS, P. *Principles of Comparative Respiratory Physiology*. Amsterdam, North-Holland, 1975.

DIPLOCK, A. T.; LUCY, J. A. *FEBS Letters* . v. 29, p. 205-210, 1973.

ERIKSON, K.M.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochemistry International* v. 43, p. 475-480, 2003.

FAO. *Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação*. Em: *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, 197 p., 2010.

FIGURA de jundiá. Disponível em: http://www.vivaterra.org.br/peixes_doce_2.htm. Acesso em 17/12/2010.

FLORENCE, T. M.; MORRISON, G. M.; STAUBER, J. L. Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. *The Science of the Total Environment* v. 125, p. 1-13, 1992.

FORSTNER, U.; WITTMANN, G.T.W. *Metal pollution in the aquatic environment*. Springer-Verlag, Berlin, p. 30-61, 1983.

GAVIN, C.E.; GUNTER, K.K.; GUNTER, T.E. Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *Biochemical Journal*. v. 266, p. 329-334, 1990.

GAVIN, C.E.; GUNTER, K.K.; GUNTER, T.E. Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity. *Neurotoxicology*. v. 20 n. 2/3, p. 445-453, 1999.

GOMES, L.C. *Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae)* *Ciência Rural*. v.30, n.1, 179-185, 2000.

GREICHUS et al. Insecticides, polychlorinated biphenyls and metals in african lake ecosystems. III. Lake Nakuru, Kenya. v.19, n. 1, p. 454-461, 1977.

GULEC et al. Some haematological and biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) in Munzur River, Tunceli, Turkey. Asian Journal of Chemistry. v. 23, n. 2, p. 910-912, 2011.

GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; PADLEY, F.B. The Lipid Handbook. Ed 2. Chapman & Hall, London, v.97, n.7/8, p. 315-316, 1994.

GUPTA et al. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. Molecules and Cells. v. 17, p. 132-139, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford, 1999.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. Free Radicals in Biology and Med. New York, Oxford University Press , 2007.

HARRISON, F.E.; MAY, J. M. Vitamin C Function in the Brain: Vital Role of the Ascorbate Transporter (SVCT2) Free Radical Biology & Medicine. v.46, n.6, p. 719-730, 2009.

HATJE et al. Disolved Trace Metal Distributions in Port Jackson Estuary (Sydney Harbour), Australia. Marine Pollution Bulletin v.46, p.719-730, 2003.

HEINY, J.S.; TATE, C.M. Concentration, distribution, and comparison of selected trace elements in bed sediment and fish tissue in the South Platte River Basin, USA, 1992-1993. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 32, p. 246-259, 1997.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. Em: Storey, K.B. (Ed), Functional Metabolism: Regulation and Adaptation, Wiley-Liss, Hoboken, 319-368 p., 2004.

HESS, M.L; MANSON, N.H. Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. Journal of Mollecular and Cellular Cardiology. v.16, p. 969-985, 1984.

HOWE, P.D.; MALCOLM, H.M.; DOBSON, S. Effects on organisms in the laboratory and field. In: Manganese and its compounds, Environmental aspects, CICAD 63, WHO Library, United Kingdom, 18-26 p., 1999.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. Coordenação Geral de Autorização de Uso e Gestão da Fauna e Recursos Pesqueiros – CGFAP. Em: Estatística da pesca 2007 – Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília, 113p., 2007.

Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/download/239/>. Acesso em 20/12/2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil. Em: Pesquisa de Informações Básicas Municipais. Perfil dos municípios brasileiros 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/perfilmunic/2008/munic2008.pdf>. Acesso em: 20/12/2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil. Em: IBGE investiga o meio ambiente de 5.560 municípios brasileiros. 2003. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=363&id_pagina=1 Acesso em 20/12/2011.

JENSEN, F.B., NIKINMAA M; WEBER, R.E. Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. Em: Rankin JD, Jensen FB (eds) Fish Ecophysiology. Chapman and Hall, London, 161-179 p., 1993.

JIANG et al. Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexanedione. Chinese Medical Journal, v. 121, p. 1204-1209, 2008.

JORDÃO et al. Influence of domestic and industrial waste discharges on water quality at Minas Gerais State, Brazil. Journal of Brazilian Chemical Society. v. 16, n. 2, p. 241-250, 2005.

KASAHARA et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl) phthalate. The Biochemical Journal, v. 365, p. 849-856, 2002.

KEILIN, D.; HARTREE, E.F. On the Mechanism of the Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase. Proc. R. Soc. Lond. B. v. 124, p. 397-405, 1938. Disponível em: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/124/837/397.full.pdf> Acesso em 06/01/12.

KOCH, C.J. Measurement of absolute oxygen levels in cells and tissues using oxygen sensors and 2-nitroimidazole EF5. Methods in Enzymology. v. 352, p.3-31, 2002.

KREMER, M. L. The Fenton Reaction. Dependence of the Rate on pH. The Journal of Physical Chemistry A., v. 107, p. 1734-1741, 2003.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The Mitochondrial eath/Life Regulation In Apoptosis and Necrosis. Annual Review of Physiology. v. 60, p. 619-642, 1998.

LAUGHLIN, R.B.Jr.; NG, J.; GUARD, H.E. Hormesis: a response to low environmental concentrations of petroleum hydrocarbons. Science. v. 211, p. 705-707, 1981.

LEIER et al. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochemical Journal*, v. 314, p. 433-437, 1996.

LEMASTERS et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* v. 1366, p. 177-196, 1998.

LICCIONE, J.J.; MAINES, M.D. Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in rat striatum to manganese. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 247, p. 156-161, 1988.

LIU et al. Manganese-Induced Neurotoxicity: The Role of Astroglial-Derived Nitric Oxide in Striatal Interneuron Degeneration. *Toxicological Sciences*. v. 91, n. 2, p. 521-531, 2006.

LOVE, M.R. *The Chemical Biology of Fishes*, vol. II. Academic Press, London, 1980.

LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. *Current Topics in Cellular Regulation*. v. 36, p.95 -116, 2000.

LOVE, M. R., *The chemical Biology of Fishes*. v. 2 Academic Press, London, 1980.

LUCHINI, L. *Manual para El cultivo del bagre sudamericano (Rhamdia sapo)*. Buenos Aires, INIDEP. 63 p., 1992.

LUSHCHAK et al. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v. 37, p. 1670-1680, 2005.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues: 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C* v. 143, p. 30-35, 2006a.

LUSHCHAK, V.I., BAGNYUKOVA, T.V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues: 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. v. 143, p. 36-41, 2006b.

LUSHCHAK et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology*. v. 280, p. 100-107, 2001.

MARET, W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox site. *Journal of Nutrition*. v. 130, p. 1455-1458, 2000.

MATSUO A. Y. O.; VAL, A. L. Fish adaptations to Amazonian blackwaters. Em: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds). *Fish adaptations*. New Hampshire, Science Publishers, 37-49 p., 2003.

MCCRAY, W. P. Glassmaking in renaissance Italy: The innovation of venetian cristallo. *Journal of the Minerals, Metals and Materials Society* v. 50, n. 5, p. 14, 1998.

MC DONOUGH, K.H.; SPITZER, J.J. Effects of hypoxia and reoxygenation on adult rat heart cell metabolism. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. v. 173, p.519-526, 1983.

MCGREGOR, G.P.; BIESALSKI, H.K. Rationale and impact of vitamin C in clinical nutrition. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. v. 9, n.6, p.697-703, 2006.

MENDES, L. Produto químico pode ter causado morte de peixes. Milhares de peixes foram encontrados mortos nesta quarta-feira em São Leopoldo. **Zero Hora**, Porto Alegre, 10/11/ 2010. Disponível em: <<http://zerohora.clicrbs.com.br/rs/geral/noticia/2010/11/produto-quimico-pode-ter-causado-morte-de-peixes-3104537.html>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

MEYDANI, M.; FIELDING, R.A.; FOTOUHI, N. Vitamin E. Em: *Sports Nutrition Vitamins and Trace Minerals*. Edited by Ira Wolinsky and Judy A. Driskell. New York: CRC Press, 119-131 p., 1996.

MISSY et al. Effects of subchronic exposure to manganese chloride on tissue distribution of three essential elements in rats. *International Journal of Toxicology*. v.19, p. 313-321, 2000.

MOORE, J.W.W.; RAMAMOORTHY, S. *Heavy Metals in Natural Waters: Applied Monitoring and Impact Assessment*. Springer Verlag, New York. 268 p., 1984.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.

NATHAN, C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 111, p. 769-778, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 5 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIKINMAA, M.; REES, B.B. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Americal journal os Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. v. 288, p. 1079-1090, 2005.

NILSSON, G.E.; RENSHAW, G.M.C. Hypoxic survival strategies in two lshes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *The Journal of Experimental Biology*. v. 207, p. 3131-3139, 2004.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology e Medicine*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOVA mortandade de peixes no Rio dos Sinos. 01/10/2010. Disponível em: <http://sosriosdobrasil.blogspot.com/2010/12/nova-mortandade-de-peixes-no-rio-dos.html>. Acesso em 03/11/2010.

ODIN, A.P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutation Research*, Amsterdam, v.386, n.1, p.39-67, 1997.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. v. 95, p. 351-358, 1979.

OWESON et al. Manganese effects on haematopoietic cells and circulating coelomocytes of *Asterias rubens* (L.). *Aquatic Toxicology*. v. 89, n. 2, p. 75-81, 2008.

POWELL, S.R. The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition*. v. 130, p. 1447–1454, 2000.

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Radical Biology & Medicine*. v. 28, p. 141-164, 2000.

RADÜNZ NETO, J. Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas de jundiá *Rhamdia quelen*. Santa Maria, 1981. 77 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1981.

RADÜNZ NETO, J. Manejo Alimentar – Nutrição. In: BALDISSEROTTO, B. e RADÜNZ NETO, J. Criação de Jundiá. Santa Maria: Editora UFSM, p. 143-160, 2004.

RAMA RAO, K.V.; NORENBURG, M.D. Manganese induces the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 279, p. 32333-32338, 2004.

REIMER, P.S. Environmental effects of manganese and proposed freshwater guidelines to protect aquatic life in British Columbia [MSc thesis]. Vancouver, B.C., University of British Columbia, 1999.

REINFELDER et al. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model Approach. *The Science of the Total Environment*. v 219 p.117-135, 1998.

SAAD et al. Occurrence and distribution of chemical pollutants in Lake Maryut, Egypt. II: Heavy metals. *Water, Air and Soil Pollution*, v.16, p.401-407, 1981.

SALEHI et al. 2003. Bioaccumulation and locomotor effects of manganese phosphate/sulfate mixture in Sprague-Dawley rats following subchronic (90 days)

inhalation exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 191, p. 264-271, 2003.

SALHI et al. Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. *Aquaculture*. v. 231, p. 435-444, 2004.

SANTOS et al. Antioxidants prevent the cytotoxicity of manganese in RBE4 cells. *Brain Research*, v. 1236, p. 200-205, 2008.

SATOH, K.; SAKAGAMI, H. Effect of metal ions on radical intensity and cytotoxic activity of ascorbate". *Anticancer research*. v.17, n. 2A, p. 1125-1129, 1997.

SAYRE, E. V.; SMITH, R. W. Compositional Categories of Ancient Glass. *Science*. v. 133, n. 3467, p.1824-1826, 1961.

SCHURMANN, H.; STEFFENSEN, J. F. Lethal oxygen levels at different temperatures and the preferred temperature during hypoxia of the Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Biology*. v. 41, p. 927-934, 1992.

SEMENZA, G.L. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) pathway. *Science*. v. 2007, n. 407, p.8, 2007.

SHENKIN, A. Adult micronutrient requirements. Artificial nutrition support in clinical practice. Em: Payne-James J, Grimble G, Silk D, editors. *Artificial nutrition support in clinical practice*. London, England: Edward Arnold Publishers; p. 151-166, 1995.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International*. 25 Ed, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H. Oxidative stress: introduction. Em: Sies, H. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, San Diego, 21-48 p., 1991.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.62, n.6 p.1315-1321, 1995.

SILVEIRA, R.; RIGORES, C. Características hematológicas normales de *Oreochromis aureus* em cultivo. *Revista Latina Acuicultura*. v. 39, p. 54-56, 1989.

SIMKISS, K.; TAYLOR, M.G. Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *Aquatic Sciences*. v. 1, p. 173-188, 1989.

SINDAYIGAYA et al. Cooper, zinc, manganese, iron, lead, cadmium, mercury and arsenic in fish from Lake Tanganyika, Burundi. *Science of the Environment*, v. 144, p. 103-115, 1994.

SINGH, et al. The interaction between ethanol and manganese in rat brain. *Archives of Toxicology*. v. 41, p. 307-316, 1979.

SMITH, R.P. A Primer of Environmental Toxicology. Lea & Febiger .p 142-150, 1993.

SOLLID et al. Hypoxia induces adaptative and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. The Journal of Experimental Biology. v. 206, p. 3667-3673, 2003.

STAHL, W.; SIES, H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? Archives of Biochemistry and Biophysics. v. 336, p. 1-9, 1996.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 29, p. 1715 - 1733, 1996.

STOREY, K.B. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Wiley-Liss and Hoboken, New Jersey, 319-368 p., 2004.

TATE, D.J.; MICELI, M.V.; NEWSOME, D.A. Zinc protects against oxidative damage in cultured human retinal pigment epithelial cells. Free Radical Biology & Medicine. v. 26, p. 704-713, 1999.

TAVARES, T.M.; CARVALHO, F.M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: Exemplos do Recôncavo Baiano. Química Nova, v. 15, n. 2, p. 147-155, 1992.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas *Tilapia rendalli*- Boulenger, 1896 (OSTEICHTHYES: CICHLIDAE) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. Bioscience Journal, v. 19, n. 1, p. 103-110, 2003.

TEROVA et al. Acute and chronic hypoxia affects HIF-1a mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture. v.279, p.150-159, 2008.

TIIDUS, P. M.; HOUSTON, M.E. Vitamin E Status and Response to Exercise Training. Sports Medicine. v. 20, n. 1, p.12-23, 1995.

TÜNZEN, M. Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry Food Chemistry. v. 80, p. 119-123, 2003.

VAN DER PUTTE, I., PÄRT, P. Oxygen and chromium transfer in perfused gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to hexavalent chromium at two different pH levels. Aquatic Toxicology. v. 2, p. 31-45, 1982.

VERHOEVEN, J. D. Steel metallurgy for the non-metallurgist. Materials Park, Ohio, ASM International. 56-57 p., 2007.

WANG et al. Hypoxiainducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. Proceedings of The National Academi of Sciences. v. 92, p. 5510-5514, 1995.

WILHELM FILHO et al. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses in the cichlid fish acar (Geophagus brasiliensis) Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v. 34, n. 5, p. 719-726., 2001.

WILHELM FILHO et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). Aquaculture. v. 244, p. 349-357, 2005.

WU, R.S.S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. Marine Pollution Bulletin. v. 45, p. 35-45, 2002.

ZERI et al. A comparative approach of dissolved trace element Exchange in two interconnected basins: Black Sea and Aegean Sea. Marine Pollution Bulletin. v. 40, n. 8, p. 666-673, 2000.

ZERNOV, S.A. General Hydrobiology. State Publisher of Biological and Medical Literature, Moscow, Leningrad, 1934.

ZHANG et al. Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. Chemosphere. v. 55, p. 167-174, 2004.

ZHANG, S.; ZHOU; Z.; FU J. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. Environmental Research. v. 93, p. 149-157, 2003.

ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. Biochimica et Biophysica Acta. v. 1241, p. 139-176; 1995.