

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

***ASTYANAX LACUSTRIS* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) COMO  
BIOINDICADOR DE EFEITOS RELACIONADOS À PRESENÇA  
DE MANGANÊS NO ECOSISTEMA AQUÁTICO**

**KARLA GIAVARINI GNOCCHI**

**VILA VELHA**

**DEZEMBRO/2019**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

***ASTYANAX LACUSTRIS* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) COMO  
BIOINDICADOR DE EFEITOS RELACIONADOS À PRESENÇA  
DE MANGANÊS NO ECOSISTEMA AQUÁTICO**

Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutor em Ecologia.

**KARLA GIAVARINI GNOCCHI**

**VILA VELHA**

**DEZEMBRO/2019**

G571a Gnocchi, Karla Giavarini.  
Astyanax lacustres (Teleostei: Characidae) como  
bioindicador de efeitos relacionados à presença de manganês  
no ecossistema aquático / Karla Giavarini Gnocchi. – 2019.  
137 f. : il.

Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes.  
Tese (Doutorado em Ecologia de Ecossistemas) -  
Universidade Vila Velha, 2019  
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Astyanax (Peixes). 3. Peixes – Poluição.  
4. Manganês. I. Chippari-Gomes, Adriana Regina.  
II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

**KARLA GIAVARINI GNOCCHI**

**ASTYANAX LACUSTRIS (TELEOSTEI: CHARACIDAE) COMO  
BIOINDICADOR DE EFEITOS RELACIONADOS À PRESENÇA  
DE MANGANÊS NO ECOSISTEMA AQUÁTICO**

Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutor em Ecologia.

Aprovada em 20 de dezembro de 2019

Banca Examinadora:

*Rafael M. Duarte*

---

**Rafael Mendonça Duarte (UNESP)**

*Silvia Tamie Matsumoto*

---

**Silvia Tamie Matsumoto (UFES)**

*Cecilia Waichert*

---

**Cecilia Waichert Monteiro (UVV)**

*Adriana Regina Chippari Gomes*

---

**Adriana Regina Chippari Gomes (UVV)**

**Orientadora**

***Dedico à minha melhor surpresa, ao meu maior amor, à minha maior alegria... MEU FILHO!***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me dado forças para que eu pudesse, mesmo diante de todas as dificuldades, chegar até aqui. Agradeço a Ele pelos momentos passados e por todos aqueles que estão por vir. Por ter me acompanhado e por ter me sustentado ao longo da minha trajetória acadêmica. Obrigada por tudo!

Agradeço à minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Adriana Regina Chippari Gomes, por toda confiança, incentivo, dedicação, paciência e todos os ensinamentos ao longo desses anos. Por ter me ensinado a enxergar o mundo com os olhos da ciência. Por ter mostrado que podemos disseminar o conhecimento para pessoas que não tem acesso a ele. Por agir transformando a vida de tantas pessoas. Não tenho palavras para descrever o quanto você é importante. Você ficará guardada para sempre em meu coração.

Ao meu esposo, Alexandre Gnocchi, pelo companheirismo, incentivo, amor e compreensão, por confiar em mim e por abraçar esse sonho junto comigo. Agradeço a você por estar presente nos momentos mais importantes da minha vida me oferecendo o seu ombro amigo. Amo você!

Ao professor Dr. Levy de Carvalho Gomes, por todo incentivo ao longo de minha trajetória acadêmica, por me auxiliar nos momentos que mais precisei, e estar presente ao longo desses anos.

Agradeço à minha família e amigos, por compreender os momentos de ausência ao longo dessa jornada e por todo o incentivo que me foi dado ao longo de todo esse tempo.

À toda equipe do Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab Peixe), em especial a Aline Gomes, Dandara Cabral, Johara Boldrini, Larissa Souza Passos e Tatiana Miura, por toda ajuda, apoio e incentivo para que essa tese pudesse ser concluída. Vocês fazem parte dessa história. Não tenho palavras para descrever o carinho que sinto por vocês.

E por fim, agradeço ao meu filho Miguel, que veio para transformar a minha vida e a vida da minha família, nos enchendo de felicidade, amor e esperança.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	9
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	10
OBJETIVO GERAL.....	23
HIPÓTESES.....	24
REFERÊNCIAS .....	25

### **CAPÍTULO 1**

*De novo* assembly and annotation of the transcriptome of *Astyanax lacustris* liver unveils candidate genes to monitor response to environmental stress

ABSTRACT .....	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1. Coleta de amostra e preparação do RNA .....	57
2.2. Construção e sequenciamento de bibliotecas .....	58
2.3 Montagem de novo, anotação funcional e quantificação de expressão gênica .....	59
3. RESULTADOS .....	60
3.1 Sequenciamento e montagem do transcriptoma .....	60
3.2 Anotação e análise funcional de genes relacionados à resposta e desintoxicação associadas ao estresse .....	61
4. DISCUSSÃO.....	65
4.1 Resposta celular ao calor.....	66
4.2 Estresse Oxidativo .....	68
4.3 Resposta ao metal e detoxificação .....	70
5. CONCLUSÃO .....	72
6. AGRADECIMENTOS.....	72
7. REFERÊNCIAS .....	73

### **CAPÍTULO 2**

Alterações bioquímicas e bioacumulação de manganês em *Astyanax lacustris*

RESUMO.....	86
1. INTRODUÇÃO.....	87
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	91
4. AGRADECIMENTOS.....	97
5. REFERÊNCIAS .....	97

### CAPÍTULO 3

Efeito do tempo de exposição ao manganês em exemplares de *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae)

RESUMO.....	102
1. INTRODUÇÃO.....	103
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	106
2.1 Quantificação de manganês na água e nos tecidos.....	109
2.2 Análise genotóxica.....	110
2.2.1 Teste do micronúcleo.....	110
2.3 Análises bioquímicas.....	110
2.3.1 Preparação do homogeneizado.....	110
2.3.2 Proteína total.....	110
2.4 Dosagem enzimática no tecido branquial.....	111
2.4.1 Glutathione S-transferase.....	111
2.5 Dosagem enzimática no tecido nervoso.....	111
2.5.1 Acetilcolinesterase.....	111
2.6 Análise de expressão gênica.....	111
2.6.1 Extração do RNA.....	111
2.6.2 Quantificação da expressão gênica.....	112
2.7 Análises estatísticas.....	112
3. RESULTADOS.....	112
3.1 Quantificação de manganês na água.....	112
3.2 Quantificação de manganês no tecido hepático e branquial.....	113
3.3 Teste do micronúcleo.....	114
3.4 Atividade enzimática da GST no tecido branquial.....	115
3.5 Atividade enzimática da AChE no tecido nervoso.....	115
3.6 Quantificação da expressão gênica.....	116
3.7 Testes de C <sub>T</sub> Max.....	118
5.DISSCUSSÃO.....	118
6. CONCLUSÃO.....	124
7. REFERÊNCIAS.....	124
CONCLUSÃO GERAL.....	137

## RESUMO

Gnocchi, Karla Giavarini, Dr.<sup>a</sup>, Universidade Vila Velha – ES, dezembro de 2019. ***Astyanax lacustris*(Teleostei: Characidae) como bioindicador de efeitos relacionados à presença de manganês no ecossistema aquático.**Orientadora: Dr.<sup>a</sup>. Adriana Regina Chippari Gomes.

A presente tese foi realizada com o objetivo de utilizar indivíduos da espécie de peixe *Astyanax lacustris* como bioindicadora dos impactos causados pela presença do manganês nos ecossistemas de água doce. Devido ao fato desse metal ser utilizado em diversos processos industriais, em muitas situações ele pode ser encontrado em concentrações elevadas nos ecossistemas aquáticos. Para tanto, a tese foi estruturada em três diferentes capítulos. O primeiro capítulo relata pela primeira vez a montagem *de novo* do transcriptoma do fígado de *A. lacustris*, destacando os genes mais relevantes que podem ser utilizados em investigações ecotoxicológicas. Nessa análise, foram identificados conjuntos de genes relacionados ao estresse oxidativo, resposta ao calor, homeostase de íons metálicos e desintoxicação, fornecendo uma biblioteca de cDNA para a realização de estudos ecotoxicológicos usando a espécie *A. lacustris*. No segundo capítulo, foi realizada a exposição de peixes dessa mesma espécie ao manganês (3,325, 6,65 e 13,33 mg/L) para investigar as respostas de diferentes biomarcadores mediante a presença do metal. Nesse capítulo, pode-se observar que, em concentrações mais baixas (3,325 mg/L), o acúmulo desse elemento no tecido hepático e branquial dos peixes já pode ser identificado. Além disso, em concentrações iguais ou superiores a 6,65 mg/L, são evidenciadas alterações bioquímicas (AChE) no tecido nervoso desses indivíduos, indicando que a espécie pode ser utilizada como uma bioindicadora dos impactos causados pelo metal no ecossistema aquático. No terceiro capítulo são descritos os efeitos ocasionados pelos diferentes tempos de exposição (4, 7, 14 e 21 dias) ao manganês (6,65 mg/L), e os resultados indicam que esse metal pode ser acumulado no tecido hepático e branquial dos indivíduos dessa espécie, oferecendo riscos ambientais aos peixes. Entretanto, não foram observadas alterações nos biomarcadores genotóxicos, moleculares e na atividade enzimática da glutathione S-transferase. Apenas os organismos expostos por 7 dias apresentaram alterações bioquímicas (AChE) no tecido nervoso, indicando que, dependendo do tempo de exposição ao poluente, essa enzima pode ser considerada um importante biomarcador de neurotoxicidade. No terceiro capítulo também foi investigada a temperatura crítica máxima ( $C_T$  Max) capaz de ocasionar a perda de equilíbrio dos peixes. Um teste adicional de  $C_T$  Max foi realizado adicionando Mn na água, para avaliar se a presença do metal seria capaz de alterar o resultado do teste, focalizando assim dois problemas ambientais: a contaminação e o aquecimento global. Nas duas diferentes condições, foi observado que o ponto térmico de perda de equilíbrio foi atingido aos 39°C. Ao longo do teste foi coletado tecido hepático para análise molecular da expressão de catalase, demonstrando que não houve alteração nesse biomarcador nos peixes submetidos às duas diferentes condições, o que indica que nem o aumento da temperatura e nem a contaminação de Mn na dosagem testada induziram estresse oxidativo nesses organismos.

**Palavras – chave:** Metal, peixe, biomarcadores, acumulação, expressão gênica, enzimas,  $C_T$  Max.

## ABSTRACT

Gnocchi, Karla Giavarini, Dr.<sup>a</sup>, University Vila Velha – ES, december 2019. ***Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) as a bioindicator of effects related to the presence of manganese in the aquatic ecosystem.** Advisor: Dr.<sup>a</sup>. Adriana Regina Chippari Gomes.

The present thesis was carried out with the objective of using *Astyanax lacustris* individuals as a bioindicator of the impacts caused by manganese in freshwater ecosystems. Since this metal is used in many industrial processes, in many situations it is found in high concentrations in these aquatic ecosystems. For that, this thesis was structured in three chapters. The first chapter reports for the first *de novo* assembled transcriptome of *A. lacustris* liver, highlighting the most relevant sequenced genes that can be used in ecotoxicological investigations. A set of genes related to oxidative stress, heat response, metal ion homeostasis and detoxification were identified, providing a cDNA library for performing ecotoxicological studies using *A. lacustris* species. In the second chapter, fish of this species were exposed to manganese (3.325, 6.65 and 13.33 mg/L) to investigate the responses of different biomarkers in the presence of the metal. In this chapter, it is possible to note that at the lower concentration (3,325 mg/L) the accumulation of this element in the liver and gills is already observed. Moreover, at concentrations equal to or greater than 6.65 mg/L, biochemical changes (AChE) were identified in the nervous tissue of these individuals, indicating that the species can be used as a bioindicator of the impacts caused by this metal in aquatic ecosystems. The third chapter describes the effects of different exposure times (4, 7, 14 and 21 days) to manganese (6.65 mg/L), and the results indicate that this metal can be accumulated in liver and gills of individuals of this species, presenting environmental risks to fish. However, no changes in genotoxic, molecular biomarkers and enzymatic activity of glutathione S-transferase were observed. Only organisms exposed for 7 days showed biochemical changes (AChE) in nervous tissue, indicating that, depending on the time of exposure to the pollutant, this enzyme can be considered an important biomarker of neurotoxicity. In the third chapter, the maximum critical temperature ( $C_T$  Max) that lead to loss of equilibrium in these fish was investigated. An additional  $C_T$  Max test was performed by adding Mn to the water to assess whether the presence of the metal would alter the test result, thus focusing on two environmental problems: contamination and global warming. Under the two different conditions, the thermal point of equilibrium loss was at 39 °C. Throughout the test, a liver tissue sample was collected for molecular analysis of catalase expression, resulting in no change in this biomarker in fish exposed to both situation, which indicate that neither temperature rise nor contamination lead to oxidative stress in these organisms.

**Keywords:** Transcriptome, Metal, Fish, Biomarker,  $C_T$  Max, AChE

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1. Contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais: manganês

Os seres humanos dependem do ecossistema aquático para importantes bens e serviços, mas de maneira direta ou indireta, a sua utilização tem promovido alterações na sua dinâmica, causando a adição de poluentes, alterando o habitat e como consequência afetando a distribuição de espécies (Halpern et al., 2008). Os mecanismos de mudanças no ecossistema aquático, em uma escala global, estão relacionados ao crescimento populacional, aumento na utilização de recursos ecossistêmicos, transformação e fragmentação do habitat, produção e consumo de energia (Barnosky et al., 2012). O processo de industrialização promoveu um aumento na concentração de poluentes no ecossistema aquático, em decorrência do lançamento de efluentes industriais e domésticos nesses locais. Esses efluentes contêm uma série de substâncias de origem orgânica e inorgânica que quando presentes nos corpos hídricos em concentrações elevadas podem ser tóxicas à biota (Leal et al., 2008). A contaminação do ecossistema aquático por diferentes tipos de poluentes pode ocasionar alterações na dinâmica desses locais como alteração na distribuição e no ciclo reprodutivo das espécies.

A descarga de efluentes domésticos e industriais é um dos fatores que podem contribuir para o aporte de compostos potencialmente tóxicos para os ecossistemas aquáticos (Bastos et al., 2013; Pihalova et al., 2009; Vasylykiv et al., 2011). Entretanto, a proporção de compostos orgânicos e inorgânicos que compõe esses efluentes influencia os efeitos que são ocasionados por esse aporte na biota aquática (Monroy et al., 2014). Metais, agrotóxicos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), são exemplos de contaminantes de origem antrópica que podem alcançar esse ecossistema (Cavas, 2011; Zhang et al., 2014). Dentre esses contaminantes, os metais são elementos que estão naturalmente presentes nos ecossistemas, devido à deposição atmosférica e o intemperismo das rochas. Entretanto, algumas atividades antrópicas como o uso de herbicidas e fertilizantes em locais próximos a lagos, rios e mares podem aumentar a concentração desses compostos no ambiente, visto que os metais fazem parte da composição

dessas soluções (Monroy et al., 2014). As atividades industriais e a mineração, principalmente, também podem contribuir para a contaminação dos corpos hídricos e o aumento da dispersão de metais no ecossistema aquático (Araujo et al., 2014).

O setor de mineração apresentou um vertiginoso crescimento, devido, principalmente, ao grande consumo do aço por alguns países. O aumento desse consumo pode ser atribuído ao maior investimento em infraestrutura e pelo desenvolvimento no setor siderúrgico (Mourão, 2008). A siderurgia tem como principal matéria prima o minério de ferro, sendo que no Brasil é encontrada uma das maiores reservas de minério de ferro do mundo (Silva, 2011). Esse minério apresenta alto teor de ferro quando comparado com o minério obtido em outros países (Vieira et al., 2003).

Associados ao minério de ferro são encontrados outros compostos como o manganês. Aproximadamente 90 % de todo manganês produzido no mundo está na forma de ferro-ligas, ele é um importante elemento da liga do aço, auxiliando no refinamento da estrutura de grãos, aumentando a resistência mecânica e melhorando a temperabilidade e a ductilidade (Reis et al., 2010). Outros setores industriais, além da siderurgia, têm utilizado o manganês como matéria prima, como por exemplo, as indústrias químicas, de cerâmica, têxtil e muitas outras. A aplicação industrial das nanopartículas de ferrite de manganêstem despertado grande interesse devido a sua elevada magnetização quando comparadas a outras nanopartículas (Mosivand e Kazeminezhad, 2015). O manganês pode também ter diversas fontes antropogênicas incluindo a incineração de lixo e a combustão de carvão e óleo. O fato desse metal ser amplamente utilizado em processos industriais favorece o aumento de sua concentração no meio ambiente (Jabłońska-Czapla, 2015). Devido à utilização do manganês em diversos setores industriais, esse elemento pode se depositar no ecossistema aquático juntamente com os efluentes oriundos dessas indústrias e quando presente nesses ambientes ele se solubiliza quando encontrado em águas com baixo pH e nessa condição ele pode se apresentar na forma de  $Mn^{2+}$ ,  $MnOH^+$ ,  $Mn(OH)^3$  (Bonke et al., 2015; Mosivand e Kazeminezhad, 2015; Kaya et al., 2016). Além disso, ele pode ser

complexado na matéria orgânica e também pode ficar concentrado no sedimento (Souza et al., 2013).

O manganês é um elemento essencial para a vida dos seres vivos. Ele atua em diferentes processos fisiológicos. Na natureza ele é encontrado principalmente em três diferentes estados de oxidação Mn (II), Mn (III) e Mn (IV), sendo que o Mn (II) é considerado a forma mais solúvel e estável no ecossistema aquático (Li et al., 2018). O Mn (IV) é insolúvel e é considerado a forma mais oxidada, formando oxidantes fortes de compostos orgânicos e inorgânicos. O estado intermediário do manganês Mn (III), em condições normais é instável, a não ser que esteja complexado com algum ligante (Madison et al., 2013). Os óxidos de Mn (III, IV) também são sorvidos em outros compostos do ambiente como os metais. O resultado da oxidação do Mn (II) pode controlar a distribuição de muitos outros elementos (por exemplo, cobre, cobalto, níquel, chumbo, ferro, rádio e urânio) (Li et al., 2018). O Manganês (Mn) é o décimo segundo metal mais abundante do planeta, compreendendo aproximadamente 0,085 % da crosta terrestre. Ele pode ser encontrado disperso no solo, no sedimento, na água e nos materiais biológicos. Esse elemento pertence à família VIIB da classificação periódica, podendo ser encontrado em diferentes estados de oxidação, mas os mais comuns são cloreto de manganês [MnCl<sub>2</sub>], dióxido de manganês [MnO<sub>2</sub>] e o permanganato de potássio [KMnO<sub>4</sub>]. O manganês é encontrado na composição de alguns minerais como óxidos, carbonatos e silicatos. A maioria dos sais de manganês é facilmente solúvel em água onde apenas o fosfato e o carbonato apresentam uma baixa solubilidade (Howe et al., 2004).

O manganês ocorre em duas formas principais na água: dissolvido e suspenso. O manganês dissolvido está presente principalmente como Mn<sup>2+</sup> (hidratado ou como cátion adsorvido) (Lisitsyn et al., 1985), que é a forma iônica utilizada em diferentes processos biológicos, os demais números de oxidação desse elemento são considerados tóxicos aos seres vivos (Rocha e Afonso, 2012). O manganês (Mn<sup>2+</sup>) é considerado um metal essencial, pois atua em algumas funções vitais como a neurotransmissão sináptica e também atua como cofator de enzimas como as oxidoredutases, transferases, hidrolases e isomerases (Gabriel et al., 2013). No ecossistema aquático, o manganês pode

interagir com os seres vivos formando complexos com os grupos funcionais das enzimas, alterando ou impedindo o transporte de substâncias essenciais para os organismos. A presença do metal em suas diferentes formas iônicas depende das características do material em suspensão, da composição da coluna d'água, pH, temperatura, força iônica, presença de ligantes disponíveis, atividade biológica e natureza da espécie metálica (Aguiar et al., 2002).

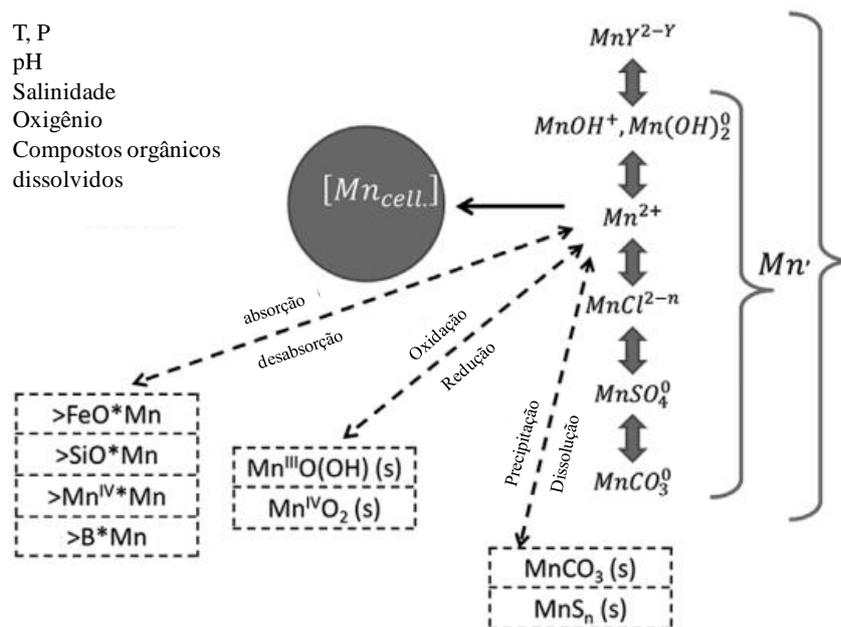
## **2. Especiação química do manganês**

A especiação química é a distribuição das diferentes espécies de um dado elemento numa amostra, considerando as espécies complexadas e não complexadas e a distinção entre os diferentes estados de oxidação. Ela define as propriedades químicas e a reatividade de uma determinada substância ou metal. (Chemistry, 2014). Estudos a respeito da especiação de metais vêm se tornando cada vez mais importantes devido ao aumento da concentração desses elementos no ecossistema aquático, eles fornecem informações baseadas em um maior entendimento do comportamento dos metais, para uma melhor avaliação do impacto causado nos ambientes aquáticos (Jabłońska-Czapla, 2015). Além disso, o estudo das diferentes formas em que o metal é encontrado no meio aquático é de extrema importância, uma vez que sua toxicidade está relacionada com a sua forma e não com sua concentração total. A absorção de metais pelos organismos é controlada pelas atividades dos íons metálicos livres, além do que, as diversas espécies de um mesmo elemento comportam-se de maneiras distintas, o que confirma a necessidade do estudo da especiação desses compostos (Jabłońska-Czapla, 2015).

Algumas espécies químicas, quando presentes na água, podem ser tóxicas aos organismos expostos causando distúrbios neurológicos, respiratórios, metabólicos, endócrinos, podem alterar as concentrações de hormônios esteróides, causarem estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e interferir no metabolismo de carboidratos (Coppo et al., 2018; Li et al., 2013). Quando o manganês está presente no ecossistema aquático, alguns fatores podem atuar biodisponibilizando esse metal que pode ser encontrado estocado no sedimento, visto que, esse compartimento é considerado um sumidouro

temporário desses poluentes sendo considerada uma fonte potencial desses elementos para a coluna d'água (Li et al., 2013).

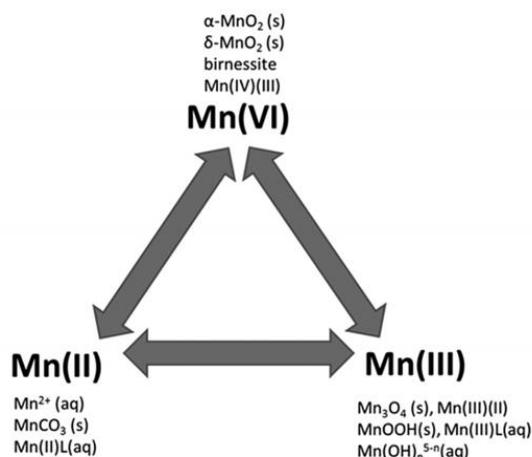
Quando o manganês está na coluna d'água, ele se apresenta principalmente em suas formas divalentes Mn (II) e tetravalentes Mn (IV). A transição entre essas duas formas é mediada por reações de oxidação e redução, que pode ocorrer por vias abióticas ou pela ação de microorganismos. A distribuição desse metal na coluna d'água é influenciada pelo pH, temperatura, matéria orgânica dissolvida e pelo potencial redox do ambiente (Figura 1). O manganês dissolvido está frequentemente no estado de oxidação +II. O Mn (II) predomina na maioria das situações e muitas vezes é a espécie química mais solúvel, representando 91,3 % do total de manganês solúvel presente na água (Jabłońska-Czapla, 2015).



**Figura 1.** Especiação química do manganês na água, adaptado de Jabłońska-Czapla (2015).

A oxidação e a precipitação do manganês envolvem a formação de várias formas desse metal (Mn (II) dissolvido, óxidos hidratados de Mn (III), Mn (II) adsorvido em partículas e Mn (II) complexado em ligantes) (Figura 2). A concentração de cada uma dessas formas no ecossistema aquático depende

das características físico-químicas da água que incluem pH, carbono inorgânico, sulfato, cloreto, temperatura e tempo (Howe et al., 2004).



**Figura 2.** Diferentes formas do manganês encontradas no ecossistema aquático (Jabłońska-Czapla, 2015).

### 3. Efeitos sobre a biota

A exposição de organismos aquáticos aos metais pode ocorrer por via digestiva e por meio da absorção pelas brânquias (De Flora et al., 1993) causando efeitos deletérios, afetando o comportamento reprodutivo, a sobrevivência e a diversidade genética da espécie (Torres de Lemos et al., 2007; Quesada-García et al., 2013). Quando um metal está presente na água, ele pode adquirir uma distribuição complexa, determinada pelos processos de partição, pelas suas propriedades físico-químicas e também pela sua concentração. Esse xenobiótico pode provocar efeitos adversos à biota, ocasionando respostas bioquímicas ou fisiológicas em organismos individuais ou até mesmo toxicidade em níveis de organização mais elevados como uma espécie, comunidade ou ecossistema (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Uma das respostas que podem ocorrer frente à presença de metais no ecossistema é a sua assimilação e retenção por parte dos seres vivos, o que pode acarretar um aumento da concentração do contaminante nos tecidos provocando efeitos deletérios ao organismo (Borgã, 2013). A bioacumulação ocorre quando um ser vivo acumula e retém substâncias provenientes do ambiente. Isso inclui a absorção a partir de todas as vias de exposição

(respiração, nutrição e epiderme) e compartimentos em que os contaminantes estejam presentes no meio aquático (água, sedimento e outros organismos)(Zagatto e Bertolotti, 2006).

Estudos de bioacumulação acoplados a utilização de multimarcadores têm sido uma ferramenta valiosa para monitorar os efeitos adversos agudos e crônicos causados pela poluição. Entretanto, além da bioacumulação, outras respostas que os organismos podem apresentar (moleculares, genotóxicas e bioquímicas) são utilizadas como biomarcadores frente à poluição do ecossistema aquático por metais (Gupta et al., 1981; Sanni et al., 2008; Banni et al., 2014; Gomiero e Viarengo, 2014; Falfushynska et al., 2015; Khan, 2015). Esses biomarcadores são inicialmente testados em ensaios laboratoriais, onde são realizadas experiências de exposição em organismos teste para diferentes agentes tóxicos nos quais as alterações nas respostas desses biomarcadores são avaliadas (Coppo et al., 2018).

A contaminação do ambiente aquático por metais, pode provocar danos à estrutura celular dos seres vivos. Quando as células normais são expostas a diferentes contaminantes, elas começam sintetizar mais intensamente algumas proteínas (Rajoriya e Rajoriya, 2014). Logo, uma forma de avaliar o impacto das alterações do ambiente aquático na biota é por meio da avaliação de biomarcadores moleculares que são proteínas, receptores, ou moléculas relacionadas a vias metabólicas ou respostas celulares, cuja expressão é regulada em resposta a estímulos endógenos ou exógenos resultantes de uma situação de estresse ao organismo (Dennis et al., 2014a; Malandrakis et al., 2014). Assim, estes marcadores biológicos podem ser úteis no biomonitoramento do grau de impacto de um determinado estressor na biota de um ecossistema.

Uma das maneiras de avaliar as consequências das variações ambientais na expressão gênica dos organismos é por meio da técnica de PCR quantitativo (*Polymerase Chain Reaction*), essa técnica utiliza sondas, marcadas com fluorescência para amplificação e quantificação de genes específicos, sendo considerada uma técnica precisa e sensível (Bustin et al., 2009). ORT-PCR vem sendo utilizado para a síntese de cDNA (Farrell,

2017), essa técnica é dividida em ciclos, formado por três componentes (desnaturação, anelamento de primer e extensão de primer), onde a amostra passa por mudanças de temperatura. Essa técnica é considerada sensível e precisa para a avaliação da expressão diferencial, além disso, permite a análise de poucos genes em um grande número de amostras, sendo utilizada para avaliar o efeito dos poluentes (Kumar e Denslow, 2016), sendo capaz de detectar genes com tamanho reduzido (de 66 a 145 pb) (Benedetto et al. 2011) Para que essa técnica seja aplicada transcritos devem estar presentes na amostra para que possa ser realizada a reversão, transcrição e amplificação por PCR (Farrell, 2017).

A análise da expressão gênica fornece informações importantes a respeito do efeito da exposição dos seres vivos a compostos potencialmente tóxicos, permitindo a identificação de genes diferencialmente expressos (Kumar e Denslow, 2015). A utilização da expressão gênica como biomarcador é importante, pois, a presença de estressores pode ocasionar mudanças na expressão molecular de processos metabólicos, na osmorregulação e eventualmente, mudanças no comportamento dos organismos (Dennis et al., 2014b).

Além de biomarcadores moleculares, as respostas genotóxicas têm sido utilizadas para avaliar a toxicidade do manganês no ambiente (Tuzuki et al., 2017). O Mn pode causar quebras cromossômicas ou alterações no fuso mitótico durante o período de divisão celular, demonstrando seu potencial tóxico (Coppo et al., 2018). Com isso, os biomarcadores genotóxicos têm sido considerados ferramentas úteis para avaliar a toxicidade desse metal (Beliaeff e Burgeot, 2002), fornecendo importantes informações a respeito da qualidade ambiental, visto que, a toxicidade dos metais, tem se tornado uma preocupação crescente (Pinheiro et al., 2019).

Os micronúcleos são formados a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros durante o processo de divisão celular. Durante a fase de anáfase, quando as cromátides irmãs se movem em direção aos pólos do fuso, as cromátides ou fragmentos cromossômicos podem ficar para trás. Na telófase, os fragmentos cromossômicos são incorporados no núcleo das

células filhas (Araldi et al., 2015). Os fragmentos atrasados também estão incluídos nas células filhas, contudo uma porção é transferida para um ou vários núcleos secundários, que são muito menores do que o núcleo principal chamados de micronúcleos (Obiakor et al., 2014). A formação de micronúcleos representam perdas cromossômicas, mas também podem representar a amplificação do DNA. O teste do MN não exige análise do cariótipo podendo ser aplicado a qualquer célula eucariótica (Araldi et al., 2015). Esse teste é recomendado em estudos de biomonitoramento ambiental, devido a sua capacidade e sensibilidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (Russo et al., 2004). Além disso, ele é considerado um teste simples e rápido para o biomonitoramento da genotoxicidade de ambientes aquáticos (Grisolia et al., 2009).

A utilização de biomarcadores bioquímicos também é uma forma de avaliar as resposta que os organismos apresentam mediante a contaminação ambiental, eles oferecem algumas vantagens porque são rapidamente detectados, eles são bastante sensíveis à presença de determinados poluentes e apresentam alta especificidade além de fornecer informações a respeito do efeito metabólico causado por um composto tóxico (Siqueira et al., 2009). As enzimas do sistema antioxidante são biomarcadores amplamente utilizados (Li et al., 2008; Won et al., 2011; Zhang et al., 2012; Bastos et al., 2013b; Fernández-Iglesias et al., 2014).

O estresse oxidativo pode ocorrer nos seres vivos como resposta à toxicidade que o manganês pode apresentar. Ele se caracteriza pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) que inclui o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e espécies de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (Barreiros et al., 2006; Awasthi et al., 2018). Além disso, a presença desse metal pode ocasionar a diminuição nos níveis antioxidantes celulares. As ROS geradas nos tecidos e compartimentos subcelulares são eficientemente eliminadas pelo sistema de defesa antioxidante, que é composto por enzimas, como catalase (CAT) e a glutathione-S-transferase (GST). Se essas ROS não forem eliminadas a tempo pelo organismo pode ocorrer a oxidação de lipídios e de ácidos nucléicos, muitas

vezes levando a danos em diferentes alvos celulares ou até mesmo a morte celular (Gabriel et al., 2013).

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é uma importante enzima oxidoreductase encontrada nos peroxissomas da célula que catalisa a conversão de moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Yang et al., 2015) (Equação 1). As catalases são enzimas que contêm ferro e facilitam a remoção do peróxido de hidrogênio. A CAT mono-funcional, é uma hemoproteína, formada por quatro subunidades idênticas com um peso molecular de 50 e 60 kDa essa enzima pode ser encontrada em organismos procariotos e eucariotos. Para o estudo de sua atividade pode-se avaliar o decaimento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da geração do oxigênio (Vasconcelos et al., 2007; Yang et al., 2015). A catalase atua na defesa imunológica do hospedeiro, apoptose celular, envelhecimento, inflamação e formação de tumores.



**Equação 1.** Ação catalisadora de catalase, conversão de moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Em algumas situações a atividade da CAT pode aumentar para reduzir os efeitos provocados pela presença de ROS em decorrência da contaminação ambiental por metais (Yang et al., 2015). Entretanto, a atividade dessa enzima pode ser inibida por metais dependendo da dose, da espécie ou da via de exposição. A atividade da CAT é considerada um biomarcador sensível do estresse oxidativo antes que ocorram efeitos perigosos aos organismos, sendo que a atividade dessa enzima pode ser quantificada em diferentes tecidos como fígado, sangue e músculo (Atli et al., 2006).

Entretanto a atividade de outras enzimas também pode ser utilizada como uma importante ferramenta de avaliação dos impactos ocasionados pela contaminação do ecossistema aquático por metais. As Glutathionas S-Transferases (GSTs) (E.C 2.5.1.18) são um grupo de enzimas que apresentam especificidades comuns em relação ao substrato acceptor eletrofílico, uma característica da GST é a elevada especificidade pela glutathiona reduzida (GSH), após combinada, apresenta maior especificidade para um segundo

substrato (Torres et al., 2004) (Equação 2). A GST é uma enzima que pertence a uma superfamília multifuncional de fase II que pertence ao grupo das enzimas citosólicas que possuem a função de desintoxicação de xenobióticos (Zhang et al., 2012). Esta enzima catalisa a conjugação da glutationa reduzida (GSH) a uma vasta variedade de compostos alquilantes, fazendo com que os produtos resultantes se tornem mais solúveis e assim possam ser excretados por transportadores de membrana (Cárcamo et al., 2014). Além disso, a GST está ligada em diferentes mecanismos que são importantes para a defesa e proteção contra danos causados pelos radicais livres (Arockiaraj et al., 2014).



**Equação 2.** Conjugação da GSH com o substrato eletrofílico tóxico pela ação da GST.

As GSTs solúveis aumentam a disponibilidade de agentes tóxicos lipofílicos para as enzimas de fase I, servindo como proteínas carreadoras. Também, por meio de ligações covalentes com os compostos tóxicos, as GSTs reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras macromoléculas celulares, como o DNA. Assim, estas enzimas frequentemente apresentam um aumento na sua atividade quando a produção de ânions superóxido e peróxido aumentam até certo nível. A atividade da GST tem sido amplamente utilizada como potenciais biomarcadores para o monitoramento da poluição ambiental (Van der Oost et al., 2003; Azevedo, 2013; Gabriel et al., 2013).

A presença de contaminantes nos ecossistemas aquáticos também pode promover alterações em enzimas localizadas no tecido nervoso dos seres vivos. Dependendo de sua concentração e biodisponibilidade, o manganês pode ocasionar a degeneração de neurônios dopaminérgicos (Guo et al., 2018). Logo, a utilização de biomarcadores neurotóxicos como a acetilcolinesterase (Ache), pode ser utilizada como uma importante ferramenta para avaliar o efeito desse contaminante nos organismos aquáticos (Bocquené et al., 1990). A acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel central na transdução do sinal no sistema nervoso, essa enzima atua degradando o neurotransmissor acetilcolina (Ach), um éster liberado nas fendas sinápticas

quando um impulso nervoso é transmitido de uma célula nervosa para outra, em produtos inativos como a colina e o ácido acético, terminando assim a transmissão de potenciais de ação individuais de pré-neurônios pós-sinápticos (Heinrich e Braunbeck, 2018). Caso essa enzima por algum motivo seja inibida, pode ocorrer um acúmulo excessivo de Ach, promovendo um maior estímulo nervoso podendo resultar na morte do indivíduo (Kirby et al., 2000). Esta enzima é encontrada nas células vermelhas do sangue, no sistema nervoso central e na membrana eritrocitária. A AChE localiza-se como um complexo proteico nas membranas pós-sinápticas. Além do seu papel no sistema nervoso, a AChE não neuronal tem sido associado a vários processos biológicos adicionais, tais como apoptose, regulação do ciclo celular ou reprodução (Heinrich e Braunbeck, 2018). A inibição da atividade da AChE pode acarretar interrupção do controle motor pela paralisia além da alteração de outras funções associadas ao sistema nervoso. A inibição dessa enzima tem sido utilizada em estudos ambientais para avaliar as condições da água (Heinrich e Braunbeck, 2018). Logo, a utilização dessa enzima como biomarcadora dos efeitos de diversos contaminantes é de extrema importância (Kirby et al., 2000; Arias et al., 2007; Agrahari e Gopal, 2008; Al-Ghais, 2013). O uso combinado de diferentes biomarcadores é recomendado para obter uma compreensão mais ampla das respostas dos organismos mediante a exposição a contaminantes, e com isso prever a gravidade dos danos causados e estabelecer uma relação de causa e efeito (Brandão et al., 2011).

#### **4. Espécie usada como modelo: *Astyanax lacustris* (lambari)**

O gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, é um gênero de peixes Neotropicais com cerca de 150 espécies válidas (Eschmeyer, 2013), ele possui uma ampla distribuição geográfica e é representado por espécies de pequeno porte que servem de alimento para espécies carnívoras (Hartz et al., 1996). Esses peixes são considerados predadores oportunistas forrageando em todos os níveis tróficos sendo capazes de mudar de dieta em função das alterações no ambiente em que se encontram, desempenhando um importante papel nas redes alimentares dos ecossistemas de água doce (Vilella et al., 2002). Essa espécie é ainda caracterizada por ser abundante, por possuir um ciclo de vida curto, por ser de fácil captura no ambiente, ser de fácil manuseio e adaptação

em laboratório facilitando a sua utilização em bioensaios (Viana et al, 2017, Stevanato, 2018).

As espécies do gênero *Astyanax* compartilham uma mancha umeral horizontalmente oval da cor preta, com duas barras marrons e um ponto no pedúnculo caudal que se estende até a extremidade dos raios caudais medianos. As espécies, *Astyanax jacuhiensis*, *A. asuncionensis* e *A. altiparanae* foram recentemente sinonimizadas com *Astyanax lacustris* (De Lucena e Soares, 2016), resultando numa expansão significativa da distribuição dessa espécie. No entanto, há uma escassez de informações biológicas disponíveis sobre essa espécie de peixe (Súarez et al., 2017a).

## OBJETIVO GERAL

Mediante ao que foi apresentado a presente tese tem como objetivo utilizar indivíduos da espécie *Astyanax lacustris* como bioindicadora dos impactos causados pela presença do manganês nos ecossistemas de água doce. Para isso foi realizada pela primeira vez a montagem *de novo* do transcriptoma do fígado de *A. lacustris* com o objetivo de fornecer uma biblioteca de cDNA para a realização estudos ecotoxicológicos utilizando essa espécie. Além disso, foram avaliados os impactos frente à exposição ao manganês em exemplares de *A. lacustris*, por meio de biomarcadores moleculares, genotóxicos e enzimáticos, bem como foi quantificada a bioacumulação do Mn no tecido hepático e branquial desses organismos, demonstrando como esse metal pode ser assimilado pela biota.

## **HIPÓTESES**

### **CAPÍTULO 1**

A montagem e anotação do transcriptoma da espécie *Astyanax lacustris* pode revelar importantes marcadores moleculares, que podem ser utilizados em estudos ecotóxicológicos possibilitando montagem de uma biblioteca de cDNA para a realização estudos ecotoxicológicos usando a espécie *A. lacustris* como bioindicadora de contaminação ambiental.

### **CAPÍTULO 2**

A presença de metais, como o manganês, no ecossistema aquático, pode promover alterações nos biomarcadores bioquímicos da espécie *A. lacustris*, além disso, a presença desse metal na água pode fazer com que ele seja acumulado em diferentes tecidos, como brânquias e fígado.

### **CAPÍTULO 3**

Peixes da espécie *A. lacustris*, quando submetidos a diferentes tempos de exposição ao manganês, podem apresentar alterações em diferentes biomarcadores (genotóxicos e bioquímicos) ao longo do tempo, além disso, podem acumular esse metal tanto no tecido branquial como no tecido hepático com o aumento do tempo de exposição a esse contaminante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, R.P., Kida, B.M.S., Pinheiro, J.P.S., Oliveira, L.F., Martinez, C.B.F., Moreira, R.G., 2019. Exposure to aluminum , aluminum + manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* ( Teleostei : Characiformes : Characidae ) males. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 215, 33–40. doi:10.1016/j.cbpc.2018.09.004
- Agrahari, S., Gopal, K., 2008. Inhibition of Na<sup>+</sup> – K<sup>+</sup> -ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* ( Bloch ) exposed to monocrotophos q 92, 57–60. doi:10.1016/j.pestbp.2008.06.003
- Aguiar, M.R.M.P. De, Novaes, A.C., Guarino, A.W.S., 2002. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. *Quim. Nova* 25, 1145–1154. doi:10.1590/S0100-40422002000700015
- Ahmed, K.M., Baki, M.A., Kundu, G.K., Saiful Islam, M., Monirul Islam, M., Muzammel Hossain, M., 2016. Human health risks from heavy metals in fish of Buriganga river, Bangladesh. *Springerplus* 5. doi:10.1186/s40064-016-3357-0
- Al-Ghais, S.M., 2013. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 74, 183–186. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.07.005
- Alonso, M.B., Carvalho, D.R. De, Alves, C.B.M., Moreira, M.Z., Pompeu, P.S., 2019. Changes in trophic characteristics of two fish species of *Astyanax* ( Teleostei : Characidae ) in response to aquatic pollution. *Zoologia* 36, 1–12.
- An, L., Hu, J., Yang, M., Zheng, B., Wei, A., Shang, J., Zhao, X., 2011. CYP1A mRNA expression in redeye mullets (*Liza haematocheila*) from Bohai Bay, China. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 718–725. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.01.019
- Anandkumar, A., Nagarajan, R., Prabakaran, K., Bing, C.H., Rajaram, R., 2018. Human health risk assessment and bioaccumulation of trace metals in fish species collected from the Miri coast, Sarawak, Borneo. *Mar. Pollut. Bull.*

133, 655–663. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.06.033

Araldi, R.P., de Melo, T.C., Mendes, T.B., de Sá Júnior, P., Nozima, B.H.N., Ito, E.T., de Carvalho, R.F., de Souza, E.B., de Cassia Stocco, R., 2015a. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed. Pharmacother.* 72, 74–82. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.004

Araldi, R.P., Melo, D., Biude, T., Heidi, B., Nozima, N., Tiemi, E., Sa, P.L. De, Franco, R., Carvalho, D., Barreiros, E., Souza, D., Cassia, R. De, 2015b. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review 72, 74–82. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.004

Araújo, M.C. de, Assis, C.R.D., Silva, L.C., Machado, D.C., Silva, K.C.C., Lima, A.V.A., Carvalho, L.B., Bezerra, R. de S., Oliveira, M.B.M. de, 2016. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. *Aquat. Toxicol.* 177, 182–189. doi:10.1016/j.aquatox.2016.05.019

Araujo, E.R., Olivieri, R.D., Fernandes, F.R.C., 2014. Atividade mineradora gera riqueza e impactos negativos nas comunidades e no meio ambiente. *Recur. minerais e comunidade impactos humanos, socioambientais e econômicos* 392.

Ardeshir, R.A., Zolgharnein, H., Movahedinia, A., Salamat, N., Zabihi, E., 2018. CYP1A gene expression as a basic factor for fipronil toxicity in *Caspian kutum* fish. *Toxicol. Reports* 5, 113–124. doi:10.1016/j.toxrep.2017.12.014

Arias, A.R.L., Buss, D.F., Albuquerque, C. De, Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M., Mugnai, R., Baptista, D.F., 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Cien. Saude Colet.* 12, 61–72. doi:10.1590/S1413-81232007000100011

Arockiaraj, J., Gnanam, A.J., Palanisamy, R., Bhatt, P., Kumaresan, V., Chaurasia, M.K., Pasupuleti, M., Ramaswamy, H., Arasu, A.,

- Sathyamoorthi, A., 2014. A cytosolic glutathione s-transferase, GST-theta from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: molecular and biochemical properties. *Gene* 546, 437–442. doi:10.1016/j.gene.2014.05.063
- Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 143, 218–224. doi:10.1016/j.cbpc.2006.02.003
- Awasthi, Y., Ratn, A., Prasad, R., Kumar, M., Trivedi, S.P., 2018a. An in vivo analysis of Cr<sup>6+</sup>-induced biochemical, genotoxicological and transcriptional profiling of genes related to oxidative stress, DNA damage and apoptosis in liver of fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Aquat. Toxicol.* 200, 158–167. doi:10.1016/j.aquatox.2018.05.001
- Awasthi, Y., Ratn, A., Prasad, R., Kumar, M., Trivedi, S.P., 2018b. An in vivo analysis of Cr<sup>6+</sup> induced biochemical, genotoxicological and transcriptional profiling of genes related to oxidative stress, DNA damage and apoptosis in liver of fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Aquat. Toxicol.* 200, 158–167. doi:10.1016/j.aquatox.2018.05.001
- Azevedo, V.C., 2013. Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades. Univ. Fed. São Carlos Dissertação.
- Bainy, A.C.D., Medeiros, M.H.G., Mascio, P. Di, Almeida, E.A. De, 2006. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. Bainy, A.C.D., Medeiros, M.H.G., Mascio, P. Di, Almeida, E.A. De, 2006. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna p.* *Biotemas* 19, 35–39.
- Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Boussetta, H., Viarengo, A., 2014. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 160, 23–29. doi:10.1016/j.cbpc.2013.11.005

- Barnosky, A.D., Hadly, E.A., Bascompte, J., Berlow, E.L., Brown, J.H., Fortelius, M., Getz, W.M., Harte, J., Hastings, A., Marquet, P.A., Martinez, N.D., Mooers, A., Roopnarine, P., Vermeij, G., Williams, J.W., Gillespie, R., Kitzes, J., Marshall, C., Matzke, N., Mindell, D.P., Revilla, E., Smith, A.B., 2012. Approaching a state shift in Earth's biosphere. *Nature* 486, 52–58. doi:10.1038/nature11018
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P., 2006. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova* 29, 113–123. doi:10.1590/S0100-40422006000100021
- Bastos, F.F., Hauser-davis, R.A., Tobar, S.A.L., Campos, R.C., Ziolli, R.L., Bastos, V.L.F.C., Bastos, J.C., 2013. Enzymatic GST levels and overall health of mullets from contaminated Brazilian Lagoons. *Aquat. Toxicol.* 126, 414–423. doi:10.1016/j.aquatox.2012.08.020
- Becker, C.D., Genoway, R.G., 1979. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Env. Biol. Fish* 4, 245–256. doi:10.1007/BF00005481
- Behl, C., 2016. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 672–688. doi:10.1016/j.tips.2016.04.007
- Beitinger, T.L., Bennett, W. a, 1999. Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environ. Biol. Fishes* 58, 277–288.
- Beitinger, T.L., Bennett, W. a, McCauley, R.W., 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environ. Biol. Fishes* 58, 237–275. doi:10.1023/a:1007676325825
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322. doi:10.1897/1551-5028(2002)021<1316:ibraut>2.0.co;2
- Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L., Kirsch-Volders, M., 1996. Cytogenetic

- studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 11, 485–492. doi:10.1093/mutage/11.5.485
- Bocquené, G., Galgani, F., Truquet, P., 1990. Characterisation and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 30, 75–89.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bonke, E., Zwicker, K., Dröse, S., 2015. Manganese ions induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation at the ubiquinone binding site of mitochondrial complex II. *Arch. Biochem. Biophys.* 580, 75–83. doi:10.1016/j.abb.2015.06.011
- Bonsignore, M., Salvagio Manta, D., Mirto, S., Quinci, E.M., Ape, F., Montalto, V., Gristina, M., Traina, A., Sprovieri, M., 2018. Bioaccumulation of heavy metals in fish, crustaceans, molluscs and echinoderms from the Tuscany coast. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 162, 554–562. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.07.044
- Borgå, K., 2013. Ecotoxicology: Bioaccumulation. *Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci.* 6–8. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.00765-X
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brown, C.J., Barlow, J.R.B., Cravotta, C.A., Lindsey, B.D., 2018. Factors affecting the occurrence of lead and manganese in untreated drinking water from Atlantic and Gulf Coastal Plain aquifers, eastern United States—Dissolved oxygen and pH framework for evaluating risk of elevated concentrations. *Appl. Geochemistry.* doi:10.1016/J.APGEOCHEM.2018.10.017
- Bryant, D.M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M.B., Payzin-Dogru, D., Lee, T.J., Leigh, N.D., Kuo, T.H., Davis, F.G., Bateman, J.,

- Bryant, S., Guzikowski, A.R., Tsai, S.L., Coyne, S., Ye, W.W., Freeman, R.M., Peshkin, L., Tabin, C.J., Regev, A., Haas, B.J., Whited, J.L., 2017. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Rep.* 18, 762–776. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.063
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59–60. doi:10.1038/nmeth.3176
- Buckley, B.A., Gracey, A.Y., Somero, G.N., 2006. The cellular response to heat stress in the goby *Gillichthys mirabilis*: a cDNA microarray and protein-level analysis. *J. Exp. Biol.* 209, 2660–2677. doi:10.1242/jeb.02292
- Cairns, J., Heath, A., Parker, B., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47, 135–171.
- Calza, C., Anjos, M.J., Castro, C.R.F., Barroso, R.C., Araujo, F.G., Lopes, R.T., 2004. Evaluation of heavy metals levels in the Paraíba do Sul River by SRTXRF in muscle, gonads and gills of *Geophagus brasiliensis*. *Radiat. Phys. Chem.* 71, 787–788. doi:10.1016/j.radphyschem.2004.04.092
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5, 327–336. doi:10.1590/S1679-62252007000300013
- Canalejo, A., Torronteras, R., Co, F., 2012. Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 212–217. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.11.015
- Cárcamo, J.G., Aguilar, M.N., Barrientos, C. a., Carreño, C.F., Yañez, A.J., 2014. Emamectin benzoate treatment alters the expression and activity of CYP1A, FMO and GST in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 434, 188–200. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.08.014
- Cavas, T., 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1431–1435.

doi:10.1016/j.fct.2011.03.038

Chemistry, A., 2014. Especificação Química e sua Importância nos Processos de Extração Mineral e de Remediação Ambiental 18–23.

Choi, C.Y., An, K.W., Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2007. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 145, 595–600. doi:10.1016/j.cbpc.2007.02.007

Chow, E.S.H., Hui, M.N.Y., Lin, C.C., Cheng, S.H., 2008. Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development. *Aquat. Toxicol.* 87, 157–169. doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.019

Coppo, G.C., Passos, L.S., Lopes, T.O.M., Pereira, T.M., Merçon, J., Cabral, D.S., Barbosa, B.V., Caetano, L.S., Kampke, E.H., Chippari-Gomes, A.R., 2018. Genotoxic, biochemical and bioconcentration effects of manganese on *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Ecotoxicology* 27, 1150–1160. doi:10.1007/s10646-018-1970-0

Cousinou, M., Nilsen, B., López-Barea, J., Dorado, G., 2000. New methods to use fish cytochrome P4501A to assess marine organic pollutants. *Sci. Total Environ.* 247, 213–225. doi:10.1016/S0048-9697(99)00492-1

Couturier, C.S., Stecyk, J.A.W., Rummer, J.L., Munday, P.L., Nilsson, G.E., 2013. Species-specific effects of near-future CO<sub>2</sub> on the respiratory performance of two tropical prey fish and their predator. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 166, 482–489. doi:10.1016/j.cbpa.2013.07.025

Dale Becker, C., Wolford, M.G., 1980. Thermal resistance of juvenile salmonids sublethally exposed to nickel, determined by the critical thermal maximum method. *Environ. Pollution. Ser. A, Ecol. Biol.* 21, 181–189. doi:10.1016/0143-1471(80)90162-2

Daniele, R., Dias, V., Eduardo, C., Pinto, E., Berteaux, R., Elias, P., Bianchini, A., 2017. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia*

*coriiceps* and *Notothenia rossii*. J. Therm. Biol. 0–1.  
doi:10.1016/j.jtherbio.2017.02.016

De Flora, S., Vigano, L., D'Agostini, F., Camoirano, a., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F., Arillo, a., 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Test. Biomonitoring Environ. or Occup. Expo. 319, 167–177. doi:10.1016/0165-1218(93)90076-P

De Lima, D., Roque, G.M., De Almeida, E.A., 2013. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). Mar. Environ. Res. 91, 45–51. doi:10.1016/j.marenvres.2012.11.005

De Lucena, C.A.S., Soares, H.G., 2016. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio la Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. Zootaxa 4072, 101–125. doi:10.11646/zootaxa.4072.1.5

Defo, M.A., Gendron, A.D., Head, J., Pilote, M., Turcotte, P., Marcogliese, D.J., Houde, M., 2019. Cumulative effects of cadmium and natural stressors (temperature and parasite infection) on molecular and biochemical responses of juvenile rainbow trout. Aquat. Toxicol. 217, 105347. doi:10.1016/j.aquatox.2019.105347

Delunardo, F.A.C., Carvalho, L.R. de, Silva, B.F. da, Galão, M., Val, A.L., Chippari-Gomes, A.R., 2015. Seahorse (*Hippocampus reidi*) as a bioindicator of crude oil exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 117, 28–33. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.03.016

Dennis, C.E., Kates, D.F., Noatch, M.R., Suski, C.D., 2014a. Molecular responses of fishes to elevated carbon dioxide. Comp. Biochem. Physiol. - Part A Mol. Integr. Physiol. 187, 224–231. doi:10.1016/j.cbpa.2014.05.013

Dennis, C.E., Kates, D.F., Noatch, M.R., Suski, C.D., 2014b. Molecular responses of fishes to elevated carbon dioxide. Comp. Biochem. Physiol. Part A 187, 224–231. doi:10.1016/j.cbpa.2014.05.013

- Dias, K.G.A., Müller, M.I., Almeida, A.C. De, Silva, R.J., Azevedo, R.K. De, León, G.P. De, Abdallah, V.D., 2018. A new species of *Wallinia* Pearse , 1920 (Digenea : Allocreadiidae) collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *A . lacustris* Lucena and Soares, 2016 (Characiformes : Characidae) in Brazil based on morphology and DNA sequences. *Parasitol. Res.*
- Disner, G., Calado, S., Assis, H., Cestari, M., 2017. Toxicity of naphthalene in the neotropical fish *Astyanax lacustris* (Characiformes : Characidae) and *Geophagus brasiliensis* (Perciformes : Cichlidae). *Evidência* 17, 7–22.
- Eid, I.I., Bhassu, S., Goh, Z.H., Khoo, L.T., Tan, G.Y.A., 2016. Molecular characterization and gene evolution of the heat shock protein 70 gene in snakehead fish with different tolerances to temperature. *Biochem. Syst. Ecol.* 66, 137–144. doi:10.1016/j.bse.2016.02.011
- Eme, J., Bennett, W.A., 2009. Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from Sulawesi, Indonesia. *J. Therm. Biol.* 34, 220–225. doi:10.1016/j.jtherbio.2009.02.005
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Sokolova, I., Stoliar, O., 2015. The effects of zinc nanooxide on cellular stress responses of the freshwater mussels *Unio tumidus* are modulated by elevated temperature and organic pollutants. *Aquat. Toxicol.* 162, 82–93. doi:10.1016/j.aquatox.2015.03.006
- Fangue, N.A., Hofmeister, M., Schulte, P.M., 2006. Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 209, 2859–2872. doi:10.1242/jeb.02260
- Fatima, M., Usmani, N., Firdaus, F., Zafeer, M.F., Ahmad, S., Akhtar, K., Dawar Husain, S.M., Ahmad, M.H., Anis, E., Mobarak Hossain, M., 2015. In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 176–177, 17–30. doi:10.1016/j.cbpc.2015.07.004

- Faught, E., Vijayan, M.M., 2016. Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 199, 136–145. doi:10.1016/j.cbpb.2016.06.012
- Fernández-Iglesias, A., Quesada, H., Díaz, S., Pajuelo, D., Bladé, C., Arola, L., Salvadó, M.J., Mulero, M., 2014. Combination of grape seed proanthocyanidin extract and docosahexaenoic acid-rich oil increases the hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipidic postprandial state. *Food Chem.* 165, 14–20. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.057
- Franco, J.L., Trivella, D.B.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R.F., Bairy, A.C.D., Dafre, A.L., 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chem. Biol. Interact.* 160, 232–240. doi:10.1016/j.cbi.2006.02.002
- Gabriel, D., Paula, A., Isabela, K.R., Etiane, A.F., Llesuy, S.F., 2013. Effects of Subchronic Manganese Chloride Exposure on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Tissues : Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. *Arch Env. Contam Toxicol.* doi:10.1007/s00244-012-9854-4
- Garcia, L.D.O., Okamoto, M.H., Riffel, A.P.K., Saccol, E.M., Pavanato, M. a., Sampaio, L.A.N., 2015. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. *Neotrop. Ichthyol.* 00–00. doi:10.1590/1982-0224-20140148
- Geszvain, K., Butterfield, C., Davis, R.E., Madison, A.S., Lee, S.-W., Parker, D.L., Soldatova, A., Spiro, T.G., Luther, G.W., Tebo, B.M., 2012. The molecular biogeochemistry of manganese(II) oxidation. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1244–1248. doi:10.1042/BST20120229
- Gilmour, K.M., 2001. The CO<sub>2</sub>/pH ventilatory drive in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 219–240.
- Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model , *Euplotes crassus* : A

- climate change perspective. *Environ. Pollut.* 194, 262–271. doi:10.1016/j.envpol.2014.07.035
- Grisolia, C.K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., da Silva, I.C.R., Barbosa, A.C., Dorea, J.G., 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet. Mol. Biol.* 32, 138–143. doi:10.1590/S1415-47572009005000009
- Grunwald, G., 2018. Cell Adhesion Molecules as Targets of Developmental Toxicants, *Comprehensive Toxicology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.65378-3
- Guo, S.N., Zheng, J.L., Yuan, S.S., Zhu, Q.L., 2017. Effects of heat and cadmium exposure on stress-related responses in the liver of female zebrafish: Heat increases cadmium toxicity. *Sci. Total Environ.* 618, 1363–1370. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.264
- Guo, Z., Zhang, Z., Wang, Q., Zhang, J., Wang, L., Zhang, Q., Li, H., Wu, S., 2018. Manganese chloride induces histone acetylation changes in neuronal cells: Its role in manganese-induced damage. *Neurotoxicology* 65, 255–263. doi:10.1016/j.neuro.2017.11.003
- Gupta, P.K., Khangarot, B.S., Durve, V.S., 1981. The temperature dependence of the acute toxicity of copper to a freshwater pond snail, *Viviparus bengalensis* L. 464, 461–464.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., Leduc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8, 1494–1512. doi:10.1038/nprot.2013.084
- Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H.S., Madin, E.M.P., Perry, M.T., Selig, E.R., Spalding, M.,

- Steneck, R., Watson, R., 2008. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science* (80-. ). 319, 948–952. doi:10.1126/science.1149345
- Hariri, M., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Taghavi, L., Shahabinia, A.R., 2018. In situ assessment of Karaj River genotoxic impact with the alkaline comet assay and micronucleus test, on feral brown trout (*Salmo trutta fario*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 58, 59–69. doi:10.1016/j.etap.2017.12.024
- Hart, A.J., Ginzburg, S., Xu, M. (Sam), Fisher, C.R., Rahmatpour, N., Mitton, J.B., Paul, R., Wegrzyn, J.L., 2019. EnTAP: Bringing Faster and Smarter Functional Annotation to Non-Model Eukaryotic Transcriptomes. *Mol. Ecol. Resour.* doi:10.1111/1755-0998.13106
- Haverroth, G.M.B., Welang, C., Mocelin, R.N., Postay, D., Bertocello, K.T., Francescon, F., Rosemberg, D.B., Dal Magro, J., Dalla Corte, C.L., 2015. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 440–447. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.09.012
- Heikkila, J.J., 2017. The expression and function of hsp30 -like small heat shock protein genes in amphibians, birds, fish, and reptiles. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 203, 179–192. doi:10.1016/j.cbpa.2016.09.011
- Heinrich, P., Braunbeck, T., 2018. Genetically engineered zebrafish liver (ZF-L) cells as an in vitro source for zebrafish acetylcholinesterase (zfAChE) for the use in AChE inhibition assays. *Toxicol. Vitro.* 52, 52–59. doi:10.1016/j.tiv.2018.06.003
- Hen Chow, E.S., Cheng, S.H., 2003. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis. *Toxicol. Sci.* 73, 149–159. doi:10.1093/toxsci/kfg046
- Howe, M.P.D., Malcolm, H.M., Dobson, D.S., 2004. Manganese and its compounds: Environmental aspects. World Heal. Organ. Geneva.
- Huang, G.-Y., Ying, G.-G., Liang, Y.-Q., Liu, S.-S., Liu, Y.-S., 2014. Expression patterns of metallothionein, cytochrome P450 1A and vitellogenin genes in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals.

- Ecotoxicol. Environ. Saf. 105, 97–102. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.012
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M.C., Rattei, T., Mende, D.R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L.J., Von Mering, C., Bork, P., 2016. EGGNOG 4.5: A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 44, D286–D293. doi:10.1093/nar/gkv1248
- Iwasaki, Y., Ormerod, S.J., 2012. Estimating safe concentrations of trace metals from inter-continental field data on river macroinvertebrates. *Environ. Pollut.* 166, 182–186. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.028
- Jabłońska-Czapla, M., 2015. Manganese and its speciation in environmental samples using hyphenated techniques: A review. *J. Elem.* 20, 1061–1075. doi:10.5601/jelem.2014.19.4.787
- Jacquin, L., Gandar, A., Aguirre-Smith, M., Perrault, A., Hénaff, M. Le, Jong, L. De, Paris-Palacios, S., Laffaille, P., Jean, S., 2019. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 255–264. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.01.085
- Javed, M., Usmani, N., Ahmad, I., Ahmad, M., 2015. Studies on the oxidative stress and gill histopathology in *Channa punctatus* of the canal receiving heavy metal-loaded effluent of Kasimpur Thermal Power Plant. *Environ. Monit. Assess.* 187. doi:10.1007/s10661-014-4179-6
- Jezierska, B., Ługowska, K., Witeska, M., 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 35, 625–640. doi:10.1007/s10695-008-9284-4
- Johnson, J.L., Cusack, B., Davies, M.P., Fauq, A., Rosenberry, T.L., 2003. Unmasking tandem site interaction in human acetylcholinesterase. Substrate activation with a cationic acetanilide substrate. *Biochemistry* 42, 5438–5452. doi:10.1021/bi027065u
- Kabbage, M., Dickman, M.B., 2008. Review The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1390–1402.

doi:10.1007/s00018-008-7535-2

- Kaizer, R.R., Corrêa, M.C., Spanevello, R.M., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Gonçalves, J.F., Schetinger, M.R.C., 2005. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1865–1870. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.06.015
- Kassahn, K.S., Caley, M.J., Ward, A.C., Connolly, A.R., Stone, G., Crozier, R.H., 2007. Heterologous microarray experiments used to identify the early gene response to heat stress in a coral reef fish. *Mol. Ecol.* 16, 1749–1763. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03178.x
- Kaya, H., Hisar, O., Yilmaz, S., Gurkan, M., Hisar, S.A., 2016. The effects of elevated carbon dioxide and temperature levels on tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Respiratory enzymes, blood pH and hematological parameters. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 44, 114–119. doi:10.1016/j.etap.2016.05.003
- Khan, M.A.Q., 2015. All use subject to JSTOR Terms and Conditions Zebra Mussels: by Enhancement High Toxicity Relationship Temperature with Respiration Metabolism of Copper Its and 72, 175–178.
- Kim, J., Kang, J., 2016. The immune responses and expression of metallothionein (MT) gene and heat shock protein 70 (HSP 70) in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic (As<sup>3+</sup>). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 47, 136–141. doi:10.1016/j.etap.2016.09.018
- Kim, J.S., Kim, H., Yim, B., Rhee, J.S., Won, E.J., Lee, Y.M., 2018. Identification and molecular characterization of two Cu/Zn-SODs and Mn-SOD in the marine ciliate *Euplotes crassus*: Modulation of enzyme activity and transcripts in response to copper and cadmium. *Aquat. Toxicol.* 199, 296–304. doi:10.1016/j.aquatox.2018.03.020
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Mar.*

Pollut. Bull. 40, 780–791. doi:10.1016/S0025-326X(00)00069-2

Kraal, M.H., Kraak, M.H.S., De Groot, C.J., Davids, C., 1995. Uptake and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by Carp (*Cyprinus carpio*). Ecotoxicol. Environ. Saf. doi:10.1006/eesa.1995.1060

Ku, P., Wu, X., Nie, X., Ou, R., Wang, L., Su, T., Li, Y., 2014. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. Comp. Biochem. Physiol. Part C 166, 105–114. doi:10.1016/j.cbpc.2014.07.006

Kumar, A., Rai, D.K., Sharma, B., Pandey, R.S., 2009.  $\lambda$ -cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). Pestic. Biochem. Physiol. 93, 96–99. doi:10.1016/j.pestbp.2008.12.005

Kumar, G., Denslow, N.D., 2016. Gene Expression Profiling in Fish Toxicology : A Review. Rev. Environ. Contam. Toxicol. doi:10.1007/398\_2016\_10

Kumar, G., Denslow, N.D., 2015. Gene Expression Profiling in Fish Toxicology: A Review. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 240, 77. doi:10.1007/398

Kumar, G., Kocour, M., 2017. Applications of next-generation sequencing in fisheries research : A review. Fish. Res. 186, 11–22. doi:10.1016/j.fishres.2016.07.021

Leal, G.C.S. de G., De, F.M.S.S., Aline de Farias Araujo, 2008. O processo de industrialização e seus impactos no meio ambiente urbano. Qual. Rev. Eletrônica 7, 1–11.

Lee, K.-W., Raisuddin, S., Rhee, J.-S.R., Hwang, D.-S., Yu, I.T., Lee, Y.-M., Park, H.G., Lee, J.S., 2008. Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. Aquat. Toxicol. 89, 158–166. doi:10.1016/j.aquatox.2008.06.011

Li, G., Xie, P., Fu, J., Hao, L., Xiong, Q., Li, H., 2008. Microcystin-induced variations in transcription of GSTs in an omnivorous freshwater fish,

- goldfish. *Aquat. Toxicol.* 88, 75–80. doi:10.1016/j.aquatox.2008.03.007
- Li, H., Shi, A., Li, M., Zhang, X., 2013. Effect of pH, temperature, dissolved oxygen, and flow rate of overlying water on heavy metals release from storm sewer sediments. *J. Chem.* 2013. doi:10.1155/2013/434012
- Li, J., Zhang, M., Ye, Z., Yang, C., 2018. Effect of manganese oxide-modified biochar addition on methane production and heavy metal speciation during the anaerobic digestion of sewage sludge. *J. Environ. Sci. (China)* 1–11. doi:10.1016/j.jes.2018.05.009
- Lisitsyn, A.P., Gordeyev, V. V., Demina, L.L., Lukashin, V.N., 1985. Geochemistry of Manganese in the Oceans. *Int. Geol. Rev.* 27, 977–1003. doi:10.1080/00206818509466476
- Liu, H., He, J., Zhao, R., Chi, C., Bao, Y., 2015. A novel biomarker for marine environmental pollution of pi-class glutathione S-transferase from *Mytilus coruscus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 47–54. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.012
- Lopes, D.F.C., Assis, C.R.D. de, Sant'Anna, M.C.S. de, Silva, J.F. da, Bezerra, R. de S., Frédou, F.L., 2019. Brain acetylcholinesterase of three perciformes: From the characterization to the *in vitro* effect of metal ions and pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 173, 494–503. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.02.047
- Madison, A.S., Tebo, B.M., Mucci, A., Sundby, B., Luther, G.W., 2013. Abundant porewater Mn(III) is a major component of the sedimentary redox system. *Science (80-. )*. 341, 875–878. doi:10.1126/science.1241396
- Malandrakis, E.E., Exadactylos, A., Dadali, O., Golomazou, E., Klaoudatos, S., Panagiotaki, P., 2014. Molecular cloning of four glutathione peroxidase (GPx) homologs and expression analysis during stress exposure of the marine teleost *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 168, 53–61. doi:10.1016/j.cbpb.2013.11.005
- Mansour, S.A., Sidky, M.M., 2002. Ecotoxicological studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. *Food*

Chem. 78, 15–22. doi:10.1016/S0308-8146(01)00197-2

- Marinho, C.S., Matias, M.V.F., Brandão, I.G.F., Santos, E.L., Machado, S.S., Zanta, C.L.P.S., 2019. Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 222, 11–18. doi:10.1016/j.cbpc.2019.04.005
- Marins, K., Lazzarotto, L.M.V., Boschetti, G., Bertoncetto, K.T., Sachett, A., Schindler, M.S.Z., Chitolina, R., Regginato, A., Zanatta, A.P., Siebel, A.M., Magro, J.D., Zanatta, L., 2019. Iron and manganese present in underground water promote biochemical, genotoxic, and behavioral alterations in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-019-05621-0
- Martin, S.A.M., Dehler, C.E., Król, E., 2016. Transcriptomic responses in the fish intestine. *Dev. Comp. Immunol.* 1–15. doi:10.1016/j.dci.2016.03.014
- Mazon, A.F., Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.* 88, 52–63. doi:10.1006/enrs.2001.4315
- Mehinto, A.C., Martyniuk, C.J., Spade, D.J., Denslow, N.D., 2012. Applications of next-generation sequencing in fish ecotoxicogenomics. *Front. Genet.* 3, 1–10. doi:10.3389/fgene.2012.00062
- Menéndez-Helman, R.J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M., Salibián, A., 2015. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 236–241. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.10.017
- Molina-villalba, I., Lacasaña, M., Rodríguez-barranco, M., Hernández, A.F., Gonzalez-alzaga, B., Aguilar-garduño, C., Gil, F., 2015. Chemosphere Biomonitoring of arsenic , cadmium , lead , manganese and mercury in urine and hair of children living near mining and industrial areas. *Chemosphere* 124, 83–91. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.016
- Monroy, M., Maceda-Veiga, A., de Sostoa, A., 2014. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-

- scale environmental concern. *Sci. Total Environ.* 487, 233–44. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.134
- Morimoto, R.I., Morimoto, R.I., 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.12.24.3788
- Mosivand, S., Kazeminezhad, I., 2015. A novel synthesis method for manganese ferrite nanopowders: The effect of manganese salt as inorganic additive in electrosynthesis cell. *Ceram. Int.* 41, 8637–8642. doi:10.1016/j.ceramint.2015.03.074
- Mourão, J.M., 2008. Estudo Prospectivo do Setor Siderúrgico 0–49.
- Mugesh, G., du Mont, W.W., 2001. Structure-activity correlation between natural glutathione peroxidase (GPx) and mimics: a biomimetic concept for the design and synthesis of more efficient GPx mimics. *Chem. Eur J.* 7, 1365–1370. doi:10.1002/1521-3765
- Nasrolahi, A., Smith, B.D., Ehsanpour, M., Afkhami, M., Rainbow, P.S., 2014. Biomonitoring of trace metal bioavailabilities to the barnacle *Amphibalanus amphitrite* along the Iranian coast of the Persian Gulf. *Mar. Environ. Res.* 101, 215–224. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.008
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W., 1996. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* doi:10.1097/00008571-199602000-00002
- Nunes, B., Barbosa, A.R., Antunes, S.C., Gonçalves, F., 2014. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: Effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 6258–6262. doi:10.1007/s11356-014-2584-6
- Obiakor, M.O., Okonkwo, J.C., Ezeonyejiaku, C.D., 2014. Genotoxicity of

- freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 775–776, 20–30. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.09.010
- Omar, W. a., Zaghloul, K.H., Abdel-Khalek, A. a., Abo-Hegab, S., 2012. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 746, 7–14. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.01.013
- Ornelas-García, C.P., Domínguez-Domínguez, O., Doadrio, I., 2008. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evol. Biol.* 8, 1–17. doi:10.1186/1471-2148-8-340
- Padmini, E., Usha Rani, M., 2009. Evaluation of oxidative stress biomarkers in hepatocytes of grey mullet inhabiting natural and polluted estuaries. *Sci. Total Environ.* 407, 4533–4541. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.04.005
- Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 19–28. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.02.032
- Pereira, A.A., Hattum, B. Van, Brouwer, A., Bodegom, P.M. Van, 2008. Effects of iron-ore mining and processing on metal bioavailability in a tropical coastal lagoon. *J Soils Sediments* 8, 239–252. doi:10.1007/s11368-008-0017-1
- Peres, W.A.M., Bertollo, L.A., Carlos, Buckup, P.A., Blanco, D.R., Kantek, D.L., Moreira-Filho, O., 2012. Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group” (Characiformes: Characidae). *Fish Biol Fish.* 22, 519–526. doi:10.1007/s11160-011-9246-2
- Perteua, M., Perteua, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.C., Mendell, J.T.,

- Salzberg, S.L., 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* 33, 290–295. doi:10.1038/nbt.3122
- Peter, Y., Louis, G.C.C., Patrice, B., 2016. Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. *Aquat. Toxicol.* doi:10.1016/j.aquatox.2016.06.008
- Pinheiro, J.P.S., Assis, C.B. de, Muñoz-Peñuela, M., Barbosa Júnior, F., Correia, T.G., Moreira, R.G., 2019. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). *Chemosphere* 220, 266–274. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.143
- Plhalova, L., Macova, S., Haluzova, I., Slaninova, A., Dolezelova, P., Marsalek, P., Pistekova, V., Bedanova, I., Voslarova, E., Svobodova, Z., 2009. Terbutryn toxicity to *Danio rerio*: Effects of subchronic exposure on fish growth. *Neuroendocrinol. Lett.* 30, 242–247. doi:10.2754/avb200877030455
- Prabhu, A.J., Silva, M.S., Kröeckel, S., Holme, M.H., Ørnsrud, R., Amlund, H., Lock, E.J., Waagbø, R., 2019. Effect of levels and sources of dietary manganese on growth and mineral composition of post-smolt Atlantic salmon fed low fish meal, plant-based ingredient diets. *Aquaculture* 512, 734287. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734287
- Purohit, G.K., Mahanty, A., Suar, M., Sharma, A.P., Mohanty, B.P., Mohanty, S., 2014. Investigating hsp Gene Expression in Liver of *Channa striatus* under Heat Stress for Understanding the Upper Thermal Acclimation. *Biomed Res. Int.* 1–10.
- Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., Guofang Zhong, 2014. RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics. *J. Integr. Biol.* Vol. 18, 98–110. doi:10.1089/omi.2013.0110
- Qu, R., Feng, M., Wang, X., Qin, L., Wang, C., Wang, Z., Wang, L., 2014. Metal

- accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat. Toxicol.* 150, 9–16. doi:10.1016/j.aquatox.2014.02.008
- Queiroz, E.C., da Silva, B.F., Salla, R.V., Ramos, J.P.L., Gnocchi, K.G., Chippari-Gomes, A.R., 2019. Genotoxic Damages and Bioaccumulation of Cadmium in *Geophagus Brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 181–185. doi:10.1007/s00128-018-2524-0
- Quesada-García, A., Valdehita, A., Torrent, F., Villarroel, M., Hernando, M.D., Navas, J.M., 2013. Use of fish farms to assess river contamination: Combining biomarker responses, active biomonitoring, and chemical analysis. *Aquat. Toxicol.* 140–141, 439–448. doi:10.1016/j.aquatox.2013.07.007
- Rajeshkumar, S., Li, X., 2018. Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Toxicol. Reports* 5, 288–295. doi:10.1016/j.toxrep.2018.01.007
- Rajeshkumar, S., Munuswamy, N., 2011. Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India. *Chemosphere* 83, 415–421. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.086
- Rajoriya, S., Rajoriya, R., 2014. Heat Shock Proteins Proteins : A Review 5, 398–411.
- Rao, D.G.V.P., Khan, M.A.Q., 2000. Zebra Mussels: Enhancement of Copper Toxicity by High Temperature and Its Relationship with Respiration and Metabolism. *Water Environ. Res.* 72, 175–178. doi:10.2175/106143000X137257
- Ravaux, J., Léger, N., Rabet, N., Fourgous, C., Volland, G., Zbinden, M., Shillito, B., 2016. Plasticity and acquisition of the thermal tolerance (upper thermal limit and heat shock response) in the intertidal species *Palaemon elegans*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 484, 39–45. doi:10.1016/j.jembe.2016.07.003

- Rees, C.B., Li, W., 2004. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids. *Aquat. Toxicol.* 66, 357–368. doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.004
- Richetti, S.K., Rosemberg, D.B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J.M., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2011. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* 32, 116–122. doi:10.1016/j.neuro.2010.11.001
- Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y., 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *J. Fish Dis.* 789–801. doi:10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x
- Rocha-Santos, C., Bastos, F.F., Dantas, R.F., Hauser-Davis, R.A., Rodrigues, L.C., Cunha Bastos, V.L.F., Cunha Bastos, J., 2018. Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in blood and liver from a hypoxia-tolerant fish under oxygen deprivation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 163, 604–611. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.06.089
- Rocha, R.A. da, Afonso, J.C., 2012. Manganês. *Elem. químico* 34, 103–105.
- Rossini, B.C., Oliveira, C.A.M., Melo, F.A.G., Bertaco, V. de A., Astorloa, J.M.D., Rosso, J., Foresti, F., Oliveira, C., 2016. Highlighting Astyanax Species Diversity through DNA Barcoding. *PLoS One* 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0167203
- Russo, C., Rocco, L., Morescalchi, M.A., Stingo, V., 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 168–174. doi:10.1016/S0147-6513(03)00027-7
- Salvador, G.N., Frederico, R.G., Pessali, T.C., Vieira, F., Freitas, T.M.S., 2018. Length-weight relationship of 21 fish species from Rio Doce River basin, Minas Gerais, Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* 34, 1198–1201. doi:10.1111/jai.13734

- Sanni, B., Williams, K., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2008. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on mitochondrial aconitase and LON protease from a model marine ectotherm , 147, 101–112. doi:10.1016/j.cbpc.2007.08.005
- Santos, C., de Oliveira, M.T., Cólus, I.M. de S., Sofia, S.H., Martinez, C.B. dos R., 2018. Expression of *cyp1a* induced by benzo(A)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 61, 30–37. doi:10.1016/j.etap.2018.05.008
- Santos, D., Batoreu, M.C., Aschner, M., Marreilha dos Santos, A.P., 2012. Effect of manganese on acetylcholinesterase activity. Toxicology 298, 61–62. doi:10.1016/j.tox.2012.04.008
- Sarasquete, C., Segner, H., 2000. Cytochrome P4501A CYP1A in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. Sci. Total Environ. 247, 313–332.
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G.Ú.L., dos Reis Pedreira Filho, W., Barbosa, F., Cerchiaro, G., Silva, F.F., Batista, B.L., 2016. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). Environ. Pollut. 218, 813–825. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.005
- Sellathurai, S., Priyathilaka, T.T., Lee, J., 2019. Molecular cloning, characterization, and expression level analysis of a marine teleost homolog of catalase from big belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*). Fish Shellfish Immunol. 89, 647–659. doi:10.1016/j.fsi.2019.03.064
- Silva, D.A., Pessoa, E.K.R., Costa, S.A.G.L., Chellappa, N.T., Chellappa, S.C., 2012. Ecologia alimentar de *Astyanax lacustris* (Osteichthyes: Characidae) na Lagoa do Piató, Assu, Rio Grande do Norte, Brasil. Biota Amaz. 2, 74–82.
- Silva, J.N.S., 2011. Siderurgia.
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B., 2013. Physiological effects of

gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*(Characiformes: Prochilodontidae). *Neotrop. Ichthyol.* 11, 683–691. doi:10.1590/S1679-62252013000300022

Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology* 20, 1400–1410. doi:10.1007/s10646-011-0697-y

Siqueira, A.F., Ramos, A.C., Silva, A.G., Melo, D., Vista, B., Velha, V., 2009. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Nat. line* 7, 37–42.

Siscar, R., Koenig, S., Torreblanca, A., Solé, M., 2014. The role of metallothionein and selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean Sea. *Sci. Total Environ.* 466–467, 898–905. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.081

Souza, I.C., Duarte, I.D., Pimentel, N.Q., Rocha, L.D., Morozesk, M., Bonomo, M.M., Azevedo, V.C., Pereira, C.D.S., Monferrán, M. V., Milanez, C.R.D., Matsumoto, S.T., Wunderlin, D. a., Fernandes, M.N., 2013. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environ. Pollut.* 180, 136–144. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.017

Stevanato, D.J., Ostrensky, A., 2018. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes : Characidae). *Neotrop. Ichthyol.* 16, 1–10. doi:10.1590/1982-0224-20170073

Súarez, Y.R., Silva, E.A., Viana, L.F., 2017a. Reproductive biology of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) in the southern Pantanal floodplain, upper Paraguay River basin, Brazil. *Environ. Biol. Fishes* 100, 775–783. doi:10.1007/s10641-017-0604-3

Súarez, Y.R., Silva, E.A., Viana, L.F., 2017b. Reproductive biology of *Astyanax lacustris* ( Characiformes : Characidae ) in the southern Pantanal floodplain , upper Paraguay River basin , Brazil. *Env. Biol Fish.* doi:10.1007/s10641-

- Teles, M., Soares, A.M.V.M., Tort, L., Guimarães, L., Oliveira, M., 2017. Linking cortisol response with gene expression in fish exposed to gold nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 1–8. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.153
- Torres de Lemos, C., Milan Rödel, P., Regina Terra, N., Cristina D'Avila de Oliveira, N., Erdtmann, B., 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 391–401. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.01.004
- Torres, M.C.L., Soares, N. de F.F., Maia, J.F., 2004. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-transferase e sua ativação por extratos vegetais 24, 243–248.
- Tuzuki, B.L.L., Delunardo, F.A.C., Ribeiro, L.N., Melo, C.P. De, Gomes, L.C., Chippari-gomes, A.R., 2017. Effects of manganese on fat snook *Centropomus parallelus* (Carangaria : Centropomidae) exposed to different temperatures. *Neotrop. Ichthyol.* 15, 1–10. doi:10.1590/1982-0224-20170054
- Valbona, A., Mihallaq, Q., Eldores, S., Valon, M., Caterina, F., 2018. AC SC. Fish Shellfish Immunol. doi:10.1016/j.fsi.2018.02.042
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Vasadia, D.J., Zippay, M.L., Place, S.P., 2019. Characterization of thermally sensitive miRNAs reveals a central role of the FoxO signaling pathway in regulating the cellular stress response of an extreme stenotherm, *Trematomus bernacchii*. *Mar. Genomics* 100698. doi:10.1016/j.margen.2019.100698
- Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.D.F., Manfredini, V., Benfato, M.D.S., Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova* 30, 1323–1338. doi:10.1590/S0100-40422007000500046

- Vasylykiv, O.Y., Kubrak, O.I., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2011. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101, 1–5. doi:10.1016/j.pestbp.2011.05.005
- Velusamy, a., Satheesh Kumar, P., Ram, A., Chinnadurai, S., 2014. Bioaccumulation of heavy metals in commercially important marine fishes from Mumbai Harbor, India. *Mar. Pollut. Bull.* 81, 218–224. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.01.049
- Venturoti, G.P., Boldrini-França, J., Gomes, A.S., Chisté, B., Gomes, L.C., 2019. *Geophagus brasiliensis* (Teleostei: Cichlidae) as an indicator of toxicity of ornamental stone processing wastes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 437–453. doi:10.1016/j.cois.2019.08.004
- Vergauwen, L., Hagenars, A., Blust, R., Knapen, D., 2013. Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: Evidence from transcript expression to physiology. *Aquat. Toxicol.* 126, 52–62. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.028
- Veronez, A.C. da S., Salla, R.V., Baroni, V.D., Barcarolli, I.F., Bianchini, A., dos Reis Martinez, C.B., Chippari-Gomes, A.R., 2016. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquat. Toxicol.* 174, 101–108. doi:10.1016/j.aquatox.2016.02.011
- Viana, L.F., Suárez, Y.R., Cardoso, C.A.L., Crispim, B. do A., Cavalcante, D.N. de C., Grisolia, A.B., Lima-Junior, S.E., 2018. The Response of Neotropical Fish Species (Brazil) on the Water Pollution : Metal Bioaccumulation and Genotoxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* doi:10.1007/s00244-018-0551-9
- Vieira, C.B., Rosière, C.A., Assis, P.S., 2003. Avaliação técnica de minérios de ferro para sinterização nas siderúrgicas e minerações brasileiras : uma análise crítica 56, 97–102.
- Vilella, F.S., Becker, F.G., Hartz, S.M., 2002. Diet of *Astyanax* species

- (Teleostei, Characidae) in an Atlantic Forest River in Southern Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 45, 223–232.
- Voigt, C.L., da Silva, C.P., Doria, H.B., Randi, M.A.F., de Oliveira Ribeiro, C.A., de Campos, S.X., 2015. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8242–8252. doi:10.1007/s11356-014-3967-4
- Walther, G., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J., I, O.H., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389–395.
- Wang, X., Qu, R., Huang, Q., Wei, Z., Wang, Z., 2015. Hepatic oxidative stress and catalyst metals accumulation in goldfish exposed to carbon nanotubes under different pH levels. *Aquat. Toxicol.* 160, 142–50. doi:10.1016/j.aquatox.2015.01.015
- Wieczerek, M., Namieśnik, J., Kudlak, B., 2016. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. *Environ. Int.* 94, 341–361. doi:10.1016/j.envint.2016.05.017
- Winkaler, E.U., Santos, T.R.M., Machado-Neto, J.G., Martinez, C.B.R., 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145, 236–244. doi:10.1016/j.cbpc.2006.12.009
- Won, E.J., Kim, R.O., Rhee, J.S., Park, G.S., Lee, J., Shin, K.H., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2011. Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 154, 82–92. doi:10.1016/j.cbpc.2011.03.008
- Yang, H.-T., Yang, M.-C., Sun, J.-J., Guo, F., Lan, J.-F., Wang, X.-W., Zhao, X.-F., Wang, J.-X., 2015. Catalase eliminates reactive oxygen species and influences the intestinal microbiota of shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 47, 63–73. doi:10.1016/j.fsi.2015.08.021
- Ye, H., Lin, Q., Luo, H., 2018. Applications of transcriptomics and proteomics in

- understanding fish immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 77, 319–327. doi:10.1016/j.fsi.2018.03.046
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337–349. doi:10.1016/S0891-5849(02)00905-X
- Zhang, H., Shan, B., Ao, L., 2014. Application of fish index of biological integrity (FIBI) in the Sanmenxia Wetland with water quality implications. *J. Environ. Sci.* 26, 1597–1603. doi:10.1016/j.jes.2014.05.026
- Zhang, L., Qiu, L., Wu, H., Liu, X., You, L., Pei, D., Chen, L., Wang, Q., Zhao, J., 2012. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 155, 517–527. doi:10.1016/j.cbpc.2012.01.002
- Zhao, X., Wang, X., Liu, B., Xie, G., Xing, D., 2018. Characterization of manganese oxidation by *Brevibacillus* at different ecological conditions. *Chemosphere* 205, 553–558. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.04.130
- Zhong, W., Zhang, Y., Wu, Z., Yang, R., Chen, X., Yang, J., Zhu, L., 2018. Health risk assessment of heavy metals in freshwater fish in the central and eastern North China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 157, 343–349. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.048

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**CAPÍTULO 1:**

***DE NOVO* ASSEMBLY AND ANNOTATION OF THE  
TRANSCRIPTOME OF *ASTYANAX LACUSTRIS* LIVER UNVEIL  
CANDIDATE GENES TO MONITOR RESPONSE TO  
ENVIRONMENTAL STRESS**

**KARLA GIAVARINI GNOCCHI**

**VILA VELHA**

**DEZEMBRO/2019**

***De novo* assembly and annotation of the transcriptome of *Astyanax lacustris* liver unveil candidate genes to monitor response to environmental stress**

**Revista: Marine Genomics - submetido**

Karla Giavarini Gnocchi, Johara Boldrini-França, Levy Carvalho Gomes,  
Adriana Regina Chippari-Gomes

Universidade Vila Velha – UVV, Laboratório de Ictiologia Aplicada, Avenida  
Comissário José Dantas de Melo n° 21, Boa Vista, 29102-770 Vila Velha,  
ES, Brazil.

**Abstract**

*Astyanax lacustris* is a freshwater characid fish species that inhabits small streams, lakes and rivers in South American neotropical areas. These fish are abundant in the wild and highly adaptable in captive, being considered a good model for ecotoxicological studies. Nevertheless, there are only shortcoming gene sequence information available in public databases, which hinder their use in more comprehensive investigations that employ sensitivity molecular biology techniques to assess gene expression profile for biomarker identification. In this study, we report the first *de novo* transcriptome of *A. lacustris* liver with the aim of improving gene sequence data available for this fish species. Illumina sequencing generating 79,102,610 raw reads, which were filtered in 62,041,259 high-quality transcripts. *De novo* assembly resulted in 93,888 unigenes and 120,674 isoforms of an average length of 909.12 and 1046.50 bp, respectively. 60,495 isoforms (50,13%) were functionally annotated against seven databases, retrieving homology queries for about 46% of all isoforms. Most isoforms (47,977) were functionally annotated against Gene Ontology (GO) database, while 59,242 were classified into 25 functional categories of Clusters of Orthologous Groups (COG) database and 40,818 were annotated in 25 Eukaryotic Ortholog Groups (KOG) categories. Based on GO terms, genes associated to oxidative stress, response to heat, metal ion homeostasis, and detoxification were selected and classified as candidates for environmental stress biomarkers. Therefore, in this study we provide information of relevant genes associated to environmental stress and contamination of *A. lacustris*, enabling future ecotoxicological studies using this fish species as biomonitoring model.

**Keywords:** Fish transcriptome; RNAseq; Ecotoxicology; Oxidative Stress; *Astyanax*.

## 1. Introduction

The genus *Astyanax* (Baird and Girard, 1854) (Family: Characidae) includes more than 100 different species (Peres et al., 2012) that can be found in Neotropical region from Patagonia until the Mexican border with the United States (Ornelas-García et al., 2008). The difficulty in identifying the different species belonging to this genus is due to their wide variety of morphological characters (Peres et al., 2012), which results in several misidentifications (Rossini et al., 2016). The species belonging to this genus are small and can forage at different trophic levels, being also preyed by several carnivores (Silva et al., 2012). These individuals inhabit ecosystems with different levels of preservation (Alonso et al., 2019), besides being considered of great ecological relevance due to their contribution to seed dispersal (Vilella et al., 2002).

The species *Astyanax jacuhiensis*, *A. asuncionensis* and *A. altiparanae*, were recently considered synonymous of the species *Astyanax lacustris* (Lütken 1875) (Súarez et al., 2017a). This species is found exclusively in South America (Dias et al., 2018), inhabiting estuarine and lacustrine environments such as small streams, lakes and rivers. They can reach 15 cm in length and weight until 60 g (Santana, 2016; Stevanato, 2018). These individuals have omnivorous habits, using autochthonous or allochthonous animal or plants as food (Alonso et al., 2019). They are opportunistic, abundant and have a short life cycle. Taken together, these features facilitate their capture in the environment, as well as their handling and adaptation in captive, which make this species a good model for ecotoxicological studies (Stevanato and Ostrensky, 2018; Viana et al., 2018). These fish have already been used as a bioindicator of environmental pollution due to their trophic plasticity and

because they occupy several environmental compartments (Stevanato and Ostrensky, 2018). Disner et al., (2017), for example, used *A. lacustris* as a bioindicator of the impacts caused by naphthalene on aquatic ecosystem, while Viana et al., (2018) and Alonso et al., (2019) used the same species to evaluate the effect caused by exposure to metal and domestic sewage disposal, respectively.

Fish are considered good bioindicator models of aquatic ecosystem's health since they can bioaccumulate contaminants both directly from the water and indirectly from the trophic chains (Camargo and Martinez, 2007; Monroy et al., 2014). However, the main bottleneck in applying non-model fish in biomonitoring the environmental pollution, such as *A. lacustris*, is the shortcoming data available in literature regarding their biological characteristics and the scarce genomic or transcriptomic information in public data bank. The lack of gene sequences hinders the use of more sensitivity molecular biology approaches to assess gene expression profile and identify contamination biomarkers, such as Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and Microarray techniques (Kumar and Kocour, 2017).

RT-qPCR is usually the method of choice for analyzing a small set of differentially expressed genes in a broad range of samples by being a less expensive and laborious technique when compared to the traditional ecotoxicological approaches, beyond showing improved sensitivity. Nevertheless, the previous knowledge of gene sequences is mandatory to enable the use of these techniques since they are essential for primer and probe design (Kumar and Kocour, 2017). To overcome this limitation, the high-throughput next generation nucleotide sequencing techniques (NGS) have been

used not only to assess gene sequence information, but also to search for new molecular signature of contamination by the analysis of differential gene expression (Kumar and Denslow, 2016). Thus, with the increasing contamination of aquatic ecosystems by various toxic compounds of anthropic origin, transcriptome analysis has become an important tool for identifying the molecular basis of cellular response to such contamination (Kumar and Kocour, 2017).

Considering the necessity to update these gene sequence databases with the aim of promoting the development of environmental monitoring tools, we report here for the first time the *de novo* assembled transcriptome of *A. lacustris* liver and highlight the most relevant sequenced genes that can be further assessed to establish molecular signatures for ecotoxicological investigations.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Sample collection and RNA preparation**

Five juvenile *A. lacustris* specimens were used for the transcriptomic analysis. The fish were obtained from a breeding facility located in Itarana/ES, Brazil, and the species identification was performed by the Ichthyologist João Luis Gasparini. The animals were acclimatized in the Laboratory of Applied Ichthyology at Vila Velha University (FishLab/UVV-ES), for 30 days, in a polyethylene tank (310 L) with daily feed. The physicochemical parameters of water, such as dissolved oxygen ( $6.11 \pm 1.12$  mg/L), pH ( $6.83 \pm 0.19$  °C), temperature ( $23.4 \pm 1.0$  °C) and conductivity ( $142,3 \pm 22.5$   $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) were monitored.

The animals were anesthetized with 0.1 mg/L benzocaine and then euthanized by cervical section and the liver was dissected and immediately frozen on liquid nitrogen for RNA extraction. The total RNA was obtained with the aid of Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Contamination of RNA sample was monitored by 1 % agarose gels and RNA purity and yield were checked using NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The RNA integrity was determined by the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA).

## **2.2. Library construction and sequencing**

Double-stranded cDNA libraries were prepared using the TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's protocol. The library quality and yield were assessed using 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). Paired-end sequencing (2 x 150 bp) of the cDNA library was accomplished in a NextSeq™ 550 Sequencing System from the facility of Hemotherapy Center of Ribeirão Preto – SP, Brazil, using the kit NextSeq High Output 300 cycles Illumina, San Diego, CA, USA), according to manufacturer's recommendations. Sequencing raw data were deposited in the Sequence Read Archive (SRA) repository of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under accession number SRR8616670, associated to the BioProject number PRJNA521109 and BioSample number SAMN10880119.

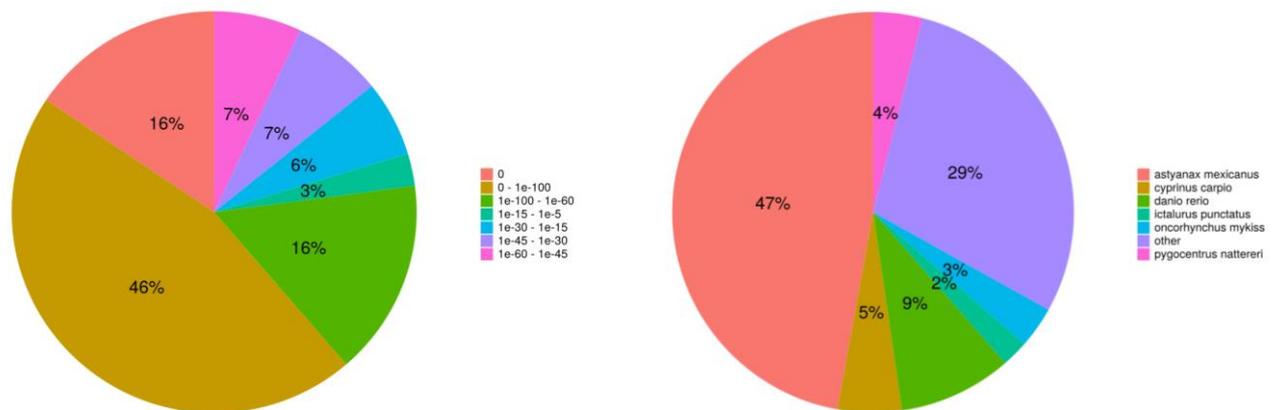
### **2.3. *De novo* assembly, functional annotation and gene expression quantification**

The quality of raw sequences was assessed using FastQC software (version 0.11.5). Raw data were initially trimmed to remove adapters and low-quality reads using Trimmomatic version 0.38 (Bolger et al., 2014), with default parameters. The quality of trimmed sequences was checked again with FastQC. Trinity version 2.8.4. (Haas et al., 2013) was used for *de novo* assembly of filtered reads. Assembly metrics were obtained using the *Trinity\_stats.pl* script from the Trinity software package. The transcriptome was functionally annotated using the Eukaryotic Non-Model Transcriptome Annotation (EnTAP) pipeline (Hart et al., 2019). Prior to functional annotation, the open reading frame (ORF) of assembled transcripts was selected using GeneMarkS-T. Contigs were queried for homology against National Center of Biotechnology Information non-redundant protein database (NCBI nr), as well as the curated Swiss-Prot and non-curated TrEMBL databases from UniProt Knowledgebase (UniProtKB) using DIAMONT (Buchfink et al., 2015). To assign biological function to the genes, sequences were searched for GO (Gene Ontology), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), COG (Clusters of Orthologous Groups) and the eukaryote-specific KOG (Eukaryotic Ortholog Groups) using EggNOG database (Huerta-Cepas et al., 2016). Kallisto software (Bryant et al., 2017) was used to determine gene expression by transcripts per million (TPM) (Pertea et al., 2015).

### 3. Results

#### 3.1. Transcriptome sequencing and assembling

For the transcriptome of *A. lacustris* liver, 79,102,610 raw reads were generated. After high-quality reads selection and trimming, a total of 62,041,259 reads were obtained (78,43% of raw reads), which were used for *de novo* transcriptome assembly. The statistics of *A. lacustris* liver transcriptome are summarized in table 1. The transcriptome was assembled using Trinity software, resulting in 93,888 unigenes and 120,674 isoforms of an average length of 909.12 and 1046.50 bp, respectively. The N50 length was 1267 bp for unigenes and 1267 bp for isoforms. All transcripts were above 288 bp, from which 61.8% presented more than 500 bp (Fig S1).



**Figure 1.** Homology search of *A. lacustris* liver transcripts. **(A)** E-value and **(B)** Fish species distribution of the combination of best hits from NCBI nr Swiss-Prot and TrEMBL databases.

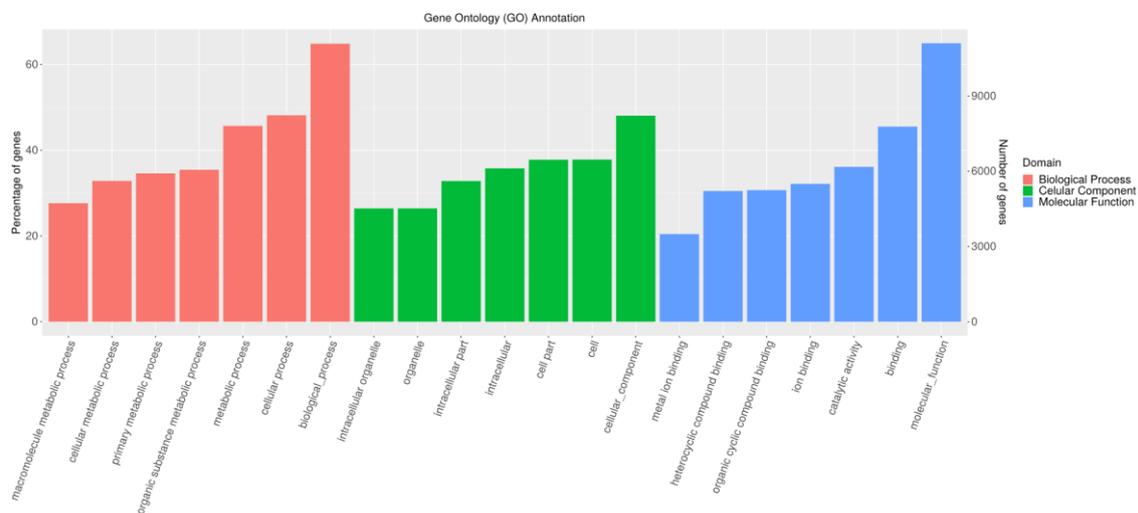
**Table 1.** Statistical summary of *Astyanax lacustris* transcriptome.

<b>Illuminasequencing</b>		
Rawreads		79,102,610
High-qualityreads		62,041,259
CG%		48
<b>Assembly</b>		
Total unigenes		93,888
Total isoforms		120,674
CG%		44,26
	Unigenes	Isoforms
N50	1267	1580
Averagecontiglength(bp)	909,12	1047.5
Mediancontiglength(bp)	559	627
Total assembled bases	85,355,251	126,405,955
<b>Annotation</b>		
NCBI (nr)		11,024
Swiss-Prot		5,909
TrEMBL		16,220
GO Biological		39,949
GO Cellular		29,201
GO Molecular		40,166
KEGG		20,395
COG		18,421
KOG		40,817
Total of annotated sequences		60,495

### 3.2. Functional annotation and analysis of genes related to stress-associated response and detoxification

Isoforms were functionally annotated using The Eukaryotic Non-Model Transcriptome Annotation (ETAP) pipeline, resulting in the annotation of 60,495 transcripts (50,13%) against nr NCBI, SwissProt, TrEMBL, GO, KEGG, COG and KOG databases. Most sequence homologies were found against TrEMBL database (16,220 transcripts), followed by NCBI (11,024 transcripts) and Swiss-Prot (5,909 transcripts). About 46% of all isoforms that retrieved homology queries were assigned with E-value below  $1e^{-100}$ , while only 3% presented the

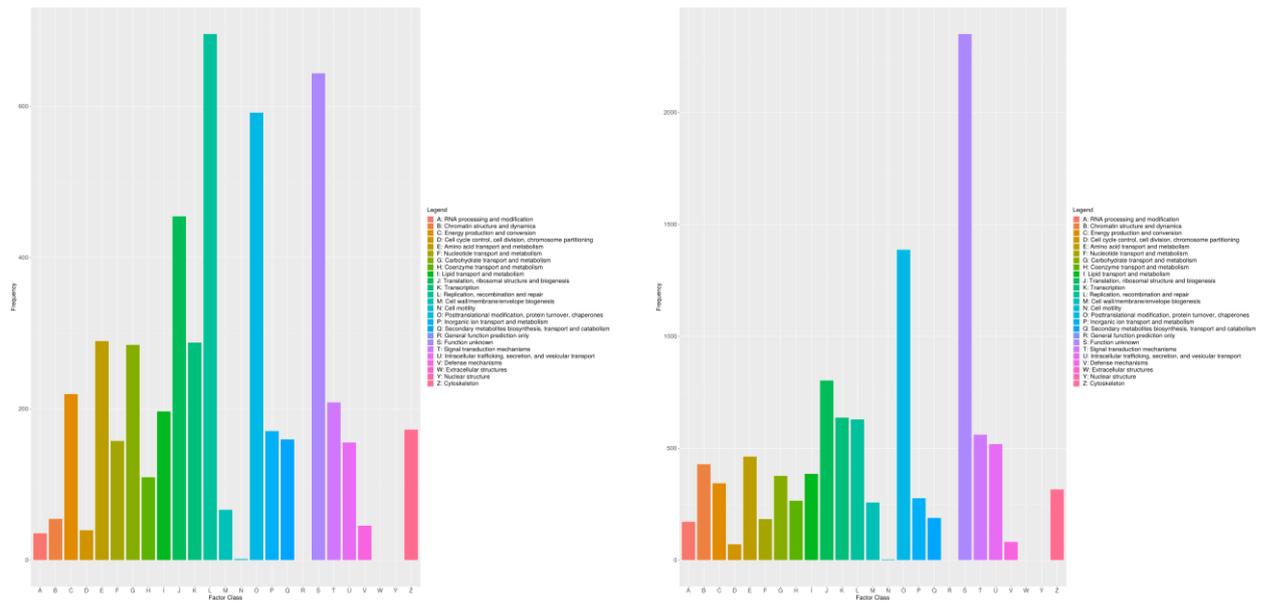
highest E-values ( $1e^{-15}$  –  $1e^{-5}$ ) (Fig 1A). Sequence homologies were distributed through many bony fish species, of which *Astyanax mexicanus* was the most frequent (47%), followed by *Danio rerio* (9%), *Cyprinus carpio* (5%) and *Pygocentrus nattereri* (4%) (Fig. 1B). Most of transcripts (47,977) were functionally annotated against GO database, from which 39,949 transcripts were assigned to biological processes, 29,201 to cellular component and 40,166 to molecular functions. The seven most representative functional groups within each category are shown in figure 2.



**Figure 2.** Gene ontology distribution for the biological process, cellular component, molecular function of assembled isoforms from *A. lacustris* liver transcriptome.

A total of 59,242 isoforms were annotated in the COG database and classified into 25 functional categories (Fig. 3A), from which “replication, recombinant and repair” group gathered the greatest number of assignments. Additionally, 40,818 isoforms were annotated in 25 KOG categories, being the “unknown function” the most representative cluster, followed by “posttranslational modification, protein turnover, chaperones”, “translation, ribosomal structure and biogenesis” and “transcription” (Fig. 3B). Based on GO terms retrieved from the transcriptome annotation, candidate genes for environmental stress biomarkers were selected. For this, GO terms for key

biological processes related to stress-associated response and xenobiotics detoxification were searched under the third level of classification for “biological process”, retrieving 428 transcripts for the term “metal ion homeostasis”, 530 for “oxidative stress”, 205 for “response to heat” and 14 for “detoxification”. Most relevant genes for ecotoxicological and environmental studies in each biological process, as well as their expression level (TPM), are presented in table 2.



**Figure 3.** Functional classification of isoforms. **(A)** COG (Clusters of Orthologous Groups) functional classification; **(B)** KOG (Eukaryotic Ortholog Groups) functional classification.

**Table 2.** Most relevant annotated genes involved in response to stress and detoxification *A. lacustris* liver transcriptome

Blast top-hit description	Blast top-hit assess	E-value	Trinity ID	TPM
<b>Cellular response to heat</b>				
Heat shock cognate 71 kDa protein	tr A0A3B3HWX9	0.00e+00	TRINITY_DN48521_c0_g1_i1	142.278
HSF domain-containing protein	tr A0A3B1KKB6	1.10e-268	TRINITY_DN7878_c0_g2_i1	15.6123
BAG family molecular chaperone regulator 3	XP_007252313.2	6.50e-255	TRINITY_DN54506_c0_g1_i1	12.3702
HSF domain-containing protein	tr W5KMA2	3.90e-234	TRINITY_DN617_c0_g1_i6	11.8602
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	sp Q91883	0.00e+00	TRINITY_DN11812_c0_g1_i1	5.89786
Heat shock protein 90-beta	AAB23704.1	1.90e-74	TRINITY_DN21208_c3_g1_i1	2.62409
Protein Hikeshi	sp Q568T4	1.20e-91	TRINITY_DN20131_c0_g1_i1	2.17903
Heat shock protein 70	sp Q5RGE6	2.60e-249	TRINITY_DN11429_c0_g2_i1	2.04856
Heat shock protein 90-alpha	tr A0A481DKN0	1.80e-124	TRINITY_DN67899_c0_g1_i1	0.904456
Death domain-associated protein 6	XP_007253140.2	6.60e-267	TRINITY_DN29120_c0_g1_i1	0.88362
Stress-70 protein	tr A0A2F0B126	3.80e-73	TRINITY_DN71540_c0_g1_i1	0.607439
<b>Oxidative stress</b>				
Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	tr W5KIC3	0.00e+00	TRINITY_DN9165_c0_g1_i1	94.7262
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	sp O73872	4.60e-72	TRINITY_DN50608_c0_g1_i1	93.3337
Methionine-R-sulfoxide reductase	XP_026793949.1	8.30e-81	TRINITY_DN14605_c0_g1_i1	76.853
Peroxiredoxin-5	tr A0A3B1JLY1	2.40e-100	TRINITY_DN43064_c0_g1_i1	56.2941
Superoxide dismutase [Mn]	tr A0A3B1IG56	1.50e-130	TRINITY_DN57134_c0_g1_i1	37.7356
Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like protein 1	tr A0A3B1J889	1.20e-84	TRINITY_DN10459_c1_g1_i1	20.6933
Serine/threonine-protein kinase PINK1	tr A0A3B1JFQ6	0.00e+00	TRINITY_DN11485_c0_g1_i1	4.11102
Glutathione reductase, mitochondrial	tr A0A3B1JWN	1.50e-281	TRINITY_DN13279_c1_g1_i1	2.67844
5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	sp Q13131	1.80e-281	TRINITY_DN15735_c0_g1_i2	2.09082

Natural resistance-associated macrophage protein 2	XP_022538345.1	2.40e-307	TRINITY_DN14795_c0_g1_i1	1.48617
Peroxiredoxin-1	tr A0A3Q0CTG2	4.00e-114	TRINITY_DN73606_c0_g1_i1	1.36625
E3 ubiquitin-proteinligaseparkin	tr A0A3B4DWM7	2.50e-250	TRINITY_DN23626_c0_g1_i2	1.01726
Peroxisomeproliferator-activated receptor gammacoactivator 1-alpha	XP_027018725.1	4.20e-26	TRINITY_DN38199_c0_g1_i3	0.719837
Glutathione peroxidase 1	sp P07203	3.80e-111	TRINITY_DN23790_c0_g1_i1	0.570215
<b>Detoxification and response to metal</b>				
Cadherin-1-like	tr A0A1U7U2Y9	4.50e-69	TRINITY_DN33_c0_g1_i7	140,477
Cytochrome P450	sp O54749	4.90e-133	TRINITY_DN10690_c1_g2_i1	114,12
Cadherin-1	tr A0A087WU43	5.70e-92	TRINITY_DN314_c0_g1_i2	113,742
Cadherin-4-like	XP_024281044.1	4.70e-118	TRINITY_DN314_c0_g1_i1	21,4171
Glutathione S-transferase	sp P48774	5.80e-83	TRINITY_DN2647_c0_g2_i1	5,74198
Estrogen receptor beta	sp Q9IAK1	7.50e-203	TRINITY_DN3356_c0_g2	5,09103
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	sp O35507	7.40e-172	TRINITY_DN2693_c0_g2_i2	2,78074
Metal regulatory transcription factor 1	sp Q14872	9.70e-47	TRINITY_DN21693_c0_g1_i2	0,976834

#### 4. Discussion

RNA-seq approach is one of the most versatile tools for assessing transcripts (Buckley et al., 2006; Ye et al., 2018), including protein-encoding RNAs (mRNAs) and noncoding RNAs (ncRNAs) that regulate cellular homeostasis (Martin et al., 2016) (Martin et al., 2016). Next-generation sequencing is increasingly being applied in molecular studies in fish, providing information on species of great ecological relevance, such as *Ictalurus punctatus*, *Dicentrarchus labrax* and *Oncorhynchus mykiss* (Mehinto et al., 2012; Qian et al., 2014). With the advent of NGS techniques, the deposit of

gene sequences of non-model animals has grown considerably, which is widening the range of species that can be applied in ecotoxicological studies and in environmental biomonitoring (Kumar and Denslow, 2016). Although the great potential of *A. lacustris* as a bioindicator model, up to date there are only 245 nucleotide entries in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databank for this species, covering only mitochondrial sequences. We report here the first transcriptome analysis of *A.lacustris* fish with the aim of providing gene information to identify candidate functional genes for further environmental biomonitoring programs. To assess gene sequence, we analyzed the transcriptome of *A.lacustris* liver, since this organ plays a key function in homeostasis maintenance and detoxification in stress and contamination conditions, being widely used in ecotoxicological studies (Coppo et al., 2018; Sarasquete and Segner, 2000; Tuzuki et al., 2017). A set of common genes with potential application in the molecular response to a range of environmental stressors in fish are highlighted below and may drive future ecotoxicological studies using *A. lacustris* as model.

#### **4.1 Cellular response to heat**

Several functional genes related to cellular heat response were identified in *A. lacustris* liver, from which those that encode heat shock factors and heat shock proteins are the most representative ones, as shown in table 2. These genes have been used as biomarkers of environmental stress in several ecotoxicological studies (Dennis et al., 2014b; Eid et al., 2016; Kim and Kang, 2016; Purohit et al., 2014; Rajeshkumar and Munuswamy, 2011; Ravaux et al., 2016); and have been studied in different groups of living organisms, such as

invertebrates (Franco et al., 2006) and vertebrates (Dennis et al., 2014b; Eid et al., 2016; Fangué et al., 2006; Roberts et al., 2010).

In the current context of global change, several studies have been developed to evaluate the effects caused on individuals exposed to temperature variation (Beitinger et al., 2000; Daniele et al., 2017; Jacquin et al., 2019). Fish are ectothermic organisms that depend on external heat sources to regulate their body temperature, thus being susceptible to this thermal variation (Eid et al., 2016). Some studies indicate that fish may develop strategies to reduce the effects of rising temperatures by triggering homeostatic processes that aid in their thermal acclimatization (Vasadia et al., 2019). When an organism is exposed to a thermal stress condition, direct interference can occur in different cellular processes, modifying the tridimensional conformation of some proteins (Morimoto and Morimoto, 1998), leading to the activation of heat shock factor 1 (Hsf1), which activates the expression of heat shock protein (Hsps) (Heikkilä, 2017). As a consequence of this heat stress, there may be the accumulation of Hsps, which act to protect important cellular components by promoting homeostasis and repair of damaged structures (Morimoto and Morimoto, 1998), aiding survival (Heikkilä, 2017) and normal cell growth until stress is ceased (Eid et al., 2016). Thus, Hsps are not only considered a response to a stressor, but rather a form of defense developed by the organism (Roberts et al., 2010). Hsps are divided into different families: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 and some smaller groups. This division is performed according to some features, such as molecular masses (kDa) and function (Roberts et al., 2010).

The most expressed heat shock protein in *A. lacustris* liver is Hsp71, with a TPM of 142.27, followed by Hsp90-beta, Hsp70, Hsp90-alpha, with TPM

values of 2.62, 2.04 and 0.90, respectively. Defo et al., (2019) evaluated the cumulative effects of cadmium and natural stressors, such as temperature and parasite infection, in gene expression of juvenile rainbow trout, observing a 5-fold higher Hsp71 protein-like expression in response to temperature increase only. Similar results were obtained by Guo et al., (2017) in which Hsp70 expression was upregulated only in heat-treated zebrafish, but not in response to co-exposure to heat and cadmium. Moreover, Hsps gene expression may be used as molecular marker of many other environmental disturbances, since cortisol is involved in the molecular response to a wide range of stressors and is known to regulate the expression of Hsps (Faught and Vijayan, 2016).

Another cellular response to heat is the expression of BAG (Bcl-2 associated athanogene) gene, which, like Hsps, are part of a highly conserved protein family (Kabbage and Dickman, 2008). BAG is the third most expressed gene related to response to heat in *A. lacustris* liver (TPM of 12.32), as shown in Table 2. These proteins are highly conserved among different living organisms, playing an important role in cellular homeostasis control in stress condition (Behl, 2016). This protein group are characterized by the presence of a BAG domain, which mediates interaction with the ATPase domain of some chaperones such as Hsp70/Hsc70 (Kabbage and Dickman, 2008).

## **4.2 Oxidative stress**

Transcriptome analysis also lead to the identification of oxidative stress-related transcripts. Oxidative stress occurs as a response to several environmental stressors, being characterized by excessive production of reactive oxygen species (ROS) (Awasthi et al., 2018). These ROS generated in tissues and subcellular compartments are eliminated by the antioxidant defense

system, which consists of enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpx) and glutathione S-transferase (GST). Failure to do so may lead to lipid and nucleic acid oxidation, causing various cellular damage (Gabriel et al., 2013).

The expression of oxidative stress-related genes has been reported in several ecotoxicological studies (Banni et al., 2014; Choi et al., 2007; Ku et al., 2014; Lee et al., 2008; Teles et al., 2017; Vasadia et al., 2019). Superoxide dismutase (SOD) forms the first line of defense of the antioxidant system against ROS (Zelko et al., 2002) by transforming superoxide ( $O^-$ ) anions into hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and  $O_2$  (Kim et al., 2018). This enzyme can be found as CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) isoforms (Zelko et al., 2002), but in *A. lacustris*, only transcripts for CyZn-SOD (TPM = 93.33) and Mn-SOD (TPM = 37.73) were identified. Gene expression of SOD has been used as an important molecular biomarker to evaluate oxidative stress caused by environmental changes in aquatic organisms (Kim et al., 2018). Kim et al (2018) reported the modulation of SOD expression in *Euplotes crassus* individuals exposed to cadmium and Copper. Awasthi et al (2018) also used SOD gene expression as a biomarker of oxidative stress in fish caused by hexavalent chromium exposure, indicating that this molecular marker may be effective in environmental conservation studies of several species.

Another gene related to the oxidative stress pathway identified in the *A. lacustris* transcriptome (TPM = 0.57) that has been used in ecotoxicological studies is Glutathione peroxidase (GPx). Like SOD, this enzyme has been used as a molecular marker in several ecotoxicological studies (Choi et al., 2007; Vergauwen et al., 2013), and has become an important tool in the investigation

of the effects of pollutants in the antioxidant system. (Choi et al, 2007). Glutathione peroxidase (GPx) is an important intracellular enzyme that catalyzes the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and fatty acid hydroperoxides, which acts mainly on mitochondria and sometimes cytosol (Mugesh and du Mont, 2001). GPx is extremely specific for GSH and is capable of rapidly detoxifying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and certain lipoperoxides. This enzyme plays a crucial role in inhibiting the lipid peroxidation process and thus protects cells from oxidative stress (Malandrakis et al., 2014). Therefore, studies related to GPx modulation may be used to evaluate the environmental interference caused by a certain contaminant, even before the oxidative stress pathway is activated.

### **4.3 Response to metal ions and detoxification**

Exposure of the aquatic biota to toxic compounds, such as metals, may lead to responses at different levels of biological organization, which may include biochemical, genotoxic changes (Ardeshir et al., 2018). The *A. lacustris* transcriptome revealed the expression of genes related to metal response, among which we can highlight cytochrome P450 and cadherin.

The most expressed genes related to cellular response to metal in *A. lacustris* liver are cadherin isoforms (TPMs ranging from 0,78 to 140,47). These proteins play important cell adhesion function, besides being associated to intracellular signaling pathways that regulate cell function and gene expression. Some xenobiotic compounds, especially heavy metals such as lead and cadmium, can modify the conformational structure of cadherins by interacting to some binding sites along the protein backbone, which affects the functional properties of these molecules. Moreover, these heavy metals have been implicated in the direct modulation of cadherin gene expression by competing

with zinc in zinc-dependent metalloproteases and transcription factors that regulate the expression of some cell adhesion molecules (Grunwald, 2018). Although there is no study in the literature that associates heavy metal contamination with cadherin expression in fish, there are evidences of some shortcomings in fish embryo axial development associated to cadherin in response to cadmium exposition (Chow et al., 2008; Hen Chow and Cheng, 2003; Jezierska et al., 2009).

Expression of genes related to biotransformation processes is considered an important tool in ecotoxicological studies (Kassahn et al., 2007). Cytochrome P450 (CYP) belongs to hemoprotein superfamily (An et al., 2011) that act on the catalysis of xenobiotics of endogenous and exogenous origin (Nelson et al., 1996), being considered an important molecular biomarker used to assess exposition to contaminants (Huang et al., 2014). In the transcriptome of *A. lacustris* liver, 25 isoforms of CYP were identified, with TPM ranging from 0.0007 to 114,12, although only the most expressed isoform was described in Table 2. Environmental contaminants can induce the expression of CYP, especially those from the subclass 1A (CYP1A), by activating aryl hydrocarbon receptor (AhR) (An et al., 2011; Cousinou et al., 2000; Rees and Li, 2004). Santos et al., (2018) reported increased CYP1A gene expression in *Prochilodus lineatus* liver after receiving intraperitoneal injection of benzo(a)pyrene. In addition, An et al (2012) used CYP1A expression as molecular biomarker of aquatic ecosystem contamination, and observed an increase in expression of this gene in fish that inhabit Bohai Bay, China.

Glutathione S-transferase (GST) is another important biomarker gene found in *A. lacustris* transcriptome that has being extensively used in several

toxicological studies (Garcia et al., 2015; Javed et al., 2015; Liu et al., 2015; Simonato et al., 2011; Veronez et al., 2016). GST is an enzyme of phase II that acts on detoxification of endogenous and exogenous substances (Delunardo et al., 2015), transforming these substances into more soluble forms through conjugation reactions (Simonato et al., 2011), thus facilitating their elimination from the organism (Van der Oost et al., 2003).

## **5. Conclusion**

A high-quality *de novo* transcriptome of *A. lacustris* was generated using liver as the target tissue. The gene expression profile of *A. lacustris* liver was predicted based on COG and KOG terms enrichment and on gene expression quantification by TPM. Based on GO terms, a set of highly expressed genes related to oxidative stress, response to heat, metal ion homeostasis and detoxification were selected. Our findings provide an informative cDNA library for further comprehensive ecotoxicological studies using *A. lacustris* of a biomonitoring model.

## **6. Acknowledgments**

We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) for the financial support (grants #76413730/16) and by Vila Velha University (UVV - #2018PI001). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the fellowship to JBF and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity fellowship granted to LCG.

## 7. References

- Alonso, M.B., Carvalho, D.R. De, Alves, C.B.M., Moreira, M.Z., Pompeu, P.S., 2019. Changes in trophic characteristics of two fish species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) in response to aquatic pollution. *Zoologia* 36, 1–12.
- An, L., Hu, J., Yang, M., Zheng, B., Wei, A., Shang, J., Zhao, X., 2011. CYP1A mRNA expression in redeye mullets (*Liza haematocheila*) from Bohai Bay, China. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 718–725. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.01.019
- Ardeshir, R.A., Zolgharnein, H., Movahedinia, A., Salamat, N., Zabihi, E., 2018. CYP1A gene expression as a basic factor for fipronil toxicity in *Caspian kutum* fish. *Toxicol. Reports* 5, 113–124. doi:10.1016/j.toxrep.2017.12.014
- Awasthi, Y., Ratn, A., Prasad, R., Kumar, M., Trivedi, S.P., 2018. An in vivo analysis of Cr6+ induced biochemical, genotoxicological and transcriptional profiling of genes related to oxidative stress, DNA damage and apoptosis in liver of fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Aquat. Toxicol.* 200, 158–167. doi:10.1016/j.aquatox.2018.05.001
- Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Boussetta, H., Viarengo, A., 2014. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 160, 23–29. doi:10.1016/j.cbpc.2013.11.005
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P., 2006. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova* 29, 113–123. doi:10.1590/S0100-40422006000100021
- Behl, C., 2016. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 672–688. doi:10.1016/j.tips.2016.04.007
- Beitinger, T.L., Bennett, W. a, McCauley, R.W., 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environ. Biol. Fishes* 58, 237–275.

doi:10.1023/a:1007676325825

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170

Bryant, D.M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M.B., Payzin-Dogru, D., Lee, T.J., Leigh, N.D., Kuo, T.H., Davis, F.G., Bateman, J., Bryant, S., Guzikowski, A.R., Tsai, S.L., Coyne, S., Ye, W.W., Freeman, R.M., Peshkin, L., Tabin, C.J., Regev, A., Haas, B.J., Whited, J.L., 2017. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Rep.* 18, 762–776. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.063

Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59–60. doi:10.1038/nmeth.3176

Buckley, B.A., Gracey, A.Y., Somero, G.N., 2006. The cellular response to heat stress in the goby *Gillichthys mirabilis*: a cDNA microarray and protein-level analysis. *J. Exp. Biol.* 209, 2660–2677. doi:10.1242/jeb.02292

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5, 327–336. doi:10.1590/S1679-62252007000300013

Choi, C.Y., An, K.W., Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2007. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 145, 595–600. doi:10.1016/j.cbpc.2007.02.007

Chow, E.S.H., Hui, M.N.Y., Lin, C.C., Cheng, S.H., 2008. Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development. *Aquat. Toxicol.* 87, 157–169. doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.019

Coppo, G.C., Passos, L.S., Lopes, T.O.M., Pereira, T.M., Merçon, J., Cabral, D.S., Barbosa, B.V., Caetano, L.S., Kampke, E.H., Chippari-Gomes, A.R., 2018. Genotoxic, biochemical and bioconcentration effects of manganese

- on *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Ecotoxicology* 27, 1150–1160. doi:10.1007/s10646-018-1970-0
- Cousinou, M., Nilsen, B., López-Barea, J., Dorado, G., 2000. New methods to use fish cytochrome P4501A to assess marine organic pollutants. *Sci. Total Environ.* 247, 213–225. doi:10.1016/S0048-9697(99)00492-1
- Daniele, R., Dias, V., Eduardo, C., Pinto, E., Berteaux, R., Elias, P., Bianchini, A., 2017. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. *J. Therm. Biol.* 0–1. doi:10.1016/j.jtherbio.2017.02.016
- Defo, M.A., Gendron, A.D., Head, J., Pilote, M., Turcotte, P., Marcogliese, D.J., Houde, M., 2019. Cumulative effects of cadmium and natural stressors (temperature and parasite infection) on molecular and biochemical responses of juvenile rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 217, 105347. doi:10.1016/j.aquatox.2019.105347
- Delunardo, F.A.C., Carvalho, L.R. de, Silva, B.F. da, Galão, M., Val, A.L., Chippari-Gomes, A.R., 2015. Seahorse (*Hippocampus reidi*) as a bioindicator of crude oil exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 117, 28–33. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.03.016
- Dennis, C.E., Kates, D.F., Noatch, M.R., Suski, C.D., 2014. Molecular responses of fishes to elevated carbon dioxide. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 187, 224–231. doi:10.1016/j.cbpa.2014.05.013
- Dias, K.G.A., Müller, M.I., Almeida, A.C. De, Silva, R.J., Azevedo, R.K. De, León, G.P. De, Abdallah, V.D., 2018. A new species of Wallinia Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *A. lacustris* Lucena and Soares, 2016 (Characiformes: Characidae) in Brazil based on morphology and DNA sequences. *Parasitol. Res.*
- Disner, G., Calado, S., Assis, H., Cestari, M., 2017. Toxicity of naphthalene in the neotropical fish *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) and

*Geophagus brasiliensis* (Perciformes : Cichlidae). Evidência 17, 7–22.

Eid, I.I., Bhasu, S., Goh, Z.H., Khoo, L.T., Tan, G.Y.A., 2016. Molecular characterization and gene evolution of the heat shock protein 70 gene in snakehead fish with different tolerances to temperature. *Biochem. Syst. Ecol.* 66, 137–144. doi:10.1016/j.bse.2016.02.011

Ecotoxicology: The History and Present Direction

Encyclopedia of Ecology (Second Edition), Volume 1, 2019, Pages 415-423

Fangue, N.A., Hofmeister, M., Schulte, P.M., 2006. Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 209, 2859–2872. doi:10.1242/jeb.02260

Faught, E., Vijayan, M.M., 2016. Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 199, 136–145. doi:10.1016/j.cbpb.2016.06.012

Franco, J.L., Trivella, D.B.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R.F., Bairy, A.C.D., Dafre, A.L., 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chem. Biol. Interact.* 160, 232–240. doi:10.1016/j.cbi.2006.02.002

Gabriel, D., Paula, A., Isabela, K.R., Etiane, A.F., Llesuy, S.F., 2013. Effects of Subchronic Manganese Chloride Exposure on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Tissues : Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. *Arch Env. Contam Toxicol.* doi:10.1007/s00244-012-9854-4

Garcia, L.D.O., Okamoto, M.H., Riffel, A.P.K., Saccol, E.M., Pavanato, M. a., Sampaio, L.A.N., 2015. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. *Neotrop. Ichthyol.* 00–00. doi:10.1590/1982-0224-20140148

Grunwald, G., 2018. Cell Adhesion Molecules as Targets of Developmental

Toxicants, Comprehensive Toxicology. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.65378-3

Guo, S.N., Zheng, J.L., Yuan, S.S., Zhu, Q.L., 2017. Effects of heat and cadmium exposure on stress-related responses in the liver of female zebrafish: Heat increases cadmium toxicity. *Sci. Total Environ.* 618, 1363–1370. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.264

Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., Leduc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8, 1494–1512. doi:10.1038/nprot.2013.084

Hart, A.J., Ginzburg, S., Xu, M. (Sam), Fisher, C.R., Rahmatpour, N., Mitton, J.B., Paul, R., Wegrzyn, J.L., 2019. EnTAP: Bringing Faster and Smarter Functional Annotation to Non-Model Eukaryotic Transcriptomes. *Mol. Ecol. Resour.* doi:10.1111/1755-0998.13106

Heikkila, J.J., 2017. The expression and function of hsp30 -like small heat shock protein genes in amphibians, birds, fish, and reptiles. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 203, 179–192. doi:10.1016/j.cbpa.2016.09.011

Hen Chow, E.S., Cheng, S.H., 2003. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis. *Toxicol. Sci.* 73, 149–159. doi:10.1093/toxsci/kfg046

Huang, G.-Y., Ying, G.-G., Liang, Y.-Q., Liu, S.-S., Liu, Y.-S., 2014. Expression patterns of metallothionein, cytochrome P450 1A and vitellogenin genes in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 105, 97–102. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.012

Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M.C., Rattei, T., Mende, D.R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L.J., Von Mering, C., Bork, P., 2016. EGGNOG 4.5: A hierarchical orthology

framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 44, D286–D293. doi:10.1093/nar/gkv1248

Jacquin, L., Gandar, A., Aguirre-Smith, M., Perrault, A., Hénaff, M. Le, Jong, L. De, Paris-Palacios, S., Laffaille, P., Jean, S., 2019. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 255–264. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.01.085

Javed, M., Usmani, N., Ahmad, I., Ahmad, M., 2015. Studies on the oxidative stress and gill histopathology in *Channa punctatus* of the canal receiving heavy metal-loaded effluent of Kasimpur Thermal Power Plant. *Environ. Monit. Assess.* 187. doi:10.1007/s10661-014-4179-6

Jeziarska, B., Ługowska, K., Witeska, M., 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 35, 625–640. doi:10.1007/s10695-008-9284-4

Kabbage, M., Dickman, M.B., 2008. Review The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1390–1402. doi:10.1007/s00018-008-7535-2

Kassahn, K.S., Caley, M.J., Ward, A.C., Connolly, A.R., Stone, G., Crozier, R.H., 2007. Heterologous microarray experiments used to identify the early gene response to heat stress in a coral reef fish. *Mol. Ecol.* 16, 1749–1763. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03178.x

Kim, J., Kang, J., 2016. The immune responses and expression of metallothionein (MT) gene and heat shock protein 70 (HSP 70) in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic (As<sup>3+</sup>). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 47, 136–141. doi:10.1016/j.etap.2016.09.018

Kim, J.S., Kim, H., Yim, B., Rhee, J.S., Won, E.J., Lee, Y.M., 2018. Identification and molecular characterization of two Cu/Zn-SODs and Mn-SOD in the marine ciliate *Euplotes crassus*: Modulation of enzyme activity and transcripts in response to copper and cadmium. *Aquat. Toxicol.* 199, 296–304. doi:10.1016/j.aquatox.2018.03.020

- Ku, P., Wu, X., Nie, X., Ou, R., Wang, L., Su, T., Li, Y., 2014. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 166, 105–114. doi:10.1016/j.cbpc.2014.07.006
- Kumar, G., Denslow, N.D., 2016. Gene Expression Profiling in Fish Toxicology: A Review. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* doi:10.1007/398\_2016\_10
- Kumar, G., Kocour, M., 2017. Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review. *Fish. Res.* 186, 11–22. doi:10.1016/j.fishres.2016.07.021
- Lee, K.-W., Raisuddin, S., Rhee, J.-S.R., Hwang, D.-S., Yu, I.T., Lee, Y.-M., Park, H.G., Lee, J.S., 2008. Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* 89, 158–166. doi:10.1016/j.aquatox.2008.06.011
- Liu, H., He, J., Zhao, R., Chi, C., Bao, Y., 2015. A novel biomarker for marine environmental pollution of pi-class glutathione S-transferase from *Mytilus coruscus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 47–54. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.012
- Malandrakis, E.E., Exadactylos, A., Dadali, O., Golomazou, E., Klaoudatos, S., Panagiotaki, P., 2014. Molecular cloning of four glutathione peroxidase (GPx) homologs and expression analysis during stress exposure of the marine teleost *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 168, 53–61. doi:10.1016/j.cbpb.2013.11.005
- Martin, S.A.M., Dehler, C.E., Król, E., 2016. Transcriptomic responses in the fish intestine. *Dev. Comp. Immunol.* 1–15. doi:10.1016/j.dci.2016.03.014
- Mehinto, A.C., Martyniuk, C.J., Spade, D.J., Denslow, N.D., 2012. Applications of next-generation sequencing in fish ecotoxicogenomics. *Front. Genet.* 3, 1–10. doi:10.3389/fgene.2012.00062
- Monroy, M., Maceda-Veiga, A., de Sostoa, A., 2014. Metal concentration in

- water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *Sci. Total Environ.* 487, 233–44. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.134
- Morimoto, R.I., Morimoto, R.I., 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.12.24.3788
- Mugesh, G., du Mont, W.W., 2001. Structure-activity correlation between natural glutathione peroxidase (GPx) and mimics: a biomimetic concept for the design and synthesis of more efficient GPx mimics. *Chem. Eur J.* 7, 1365–1370. doi:10.1002/1521-3765
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W., 1996. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* doi:10.1097/00008571-199602000-00002
- Ornelas-García, C.P., Domínguez-Domínguez, O., Doadrio, I., 2008. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evol. Biol.* 8, 1–17. doi:10.1186/1471-2148-8-340
- Peres, W.A.M., Bertollo, L.A., Carlos, Buckup, P.A., Blanco, D.R., Kantek, D.L., Moreira-Filho, O., 2012. Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group” (Characiformes: Characidae). *Fish Biol Fish.* 22, 519–526. doi:10.1007/s11160-011-9246-2
- Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.C., Mendell, J.T., Salzberg, S.L., 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* 33, 290–295. doi:10.1038/nbt.3122
- Purohit, G.K., Mahanty, A., Suar, M., Sharma, A.P., Mohanty, B.P., Mohanty,

- S., 2014. Investigating hsp Gene Expression in Liver of *Channa striatus* under Heat Stress for Understanding the Upper Thermal Acclimation. *Biomed Res. Int.* 1–10.
- Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., Guofang Zhong, 2014. RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics. *J. Integr. Biol.* Vol. 18, 98–110. doi:10.1089/omi.2013.0110
- Rajeshkumar, S., Munuswamy, N., 2011. Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India. *Chemosphere* 83, 415–421. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.086
- Ravaux, J., Léger, N., Rabet, N., Fourgous, C., Voland, G., Zbinden, M., Shillito, B., 2016. Plasticity and acquisition of the thermal tolerance (upper thermal limit and heat shock response) in the intertidal species *Palaemon elegans*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 484, 39–45. doi:10.1016/j.jembe.2016.07.003
- Rees, C.B., Li, W., 2004. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids. *Aquat. Toxicol.* 66, 357–368. doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.004
- Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y., 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *J. Fish Dis.* 789–801. doi:10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x
- Rossini, B.C., Oliveira, C.A.M., Melo, F.A.G., Bertaco, V. de A., Astorloa, J.M.D., Rosso, J., Foresti, F., Oliveira, C., 2016. Highlighting *Astyanax* Species Diversity through DNA Barcoding. *PLoS One* 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0167203
- Santos, C., de Oliveira, M.T., Cólus, I.M. de S., Sofia, S.H., Martinez, C.B. dos R., 2018. Expression of *cyp1a* induced by benzo(A)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 61, 30–37.

doi:10.1016/j.etap.2018.05.008

- Sarasquete, C., Segner, H., 2000. Cytochrome P4501A CYP1A in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci. Total Environ.* 247, 313–332.
- Silva, D.A., Pessoa, E.K.R., Costa, S.A.G.L., Chellappa, N.T., Chellappa, S.C., 2012. Ecologia alimentar de *Astyanax lacustris* (Osteichthyes: Characidae) na Lagoa do Piató, Assu, Rio Grande do Norte, Brasil. *Biota Amaz.* 2, 74–82.
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology* 20, 1400–1410. doi:10.1007/s10646-011-0697-y
- Stevanato, D.J., Ostrensky, A., 2018. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes : Characidae). *Neotrop. Ichthyol.* 16, 1–10. doi:10.1590/1982-0224-20170073
- Súarez, Y.R., Silva, E.A., Viana, L.F., 2017. Reproductive biology of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) in the southern Pantanal floodplain, upper Paraguay River basin, Brazil. *Environ. Biol. Fishes* 100, 775–783. doi:10.1007/s10641-017-0604-3
- Teles, M., Soares, A.M.V.M., Tort, L., Guimarães, L., Oliveira, M., 2017. Science of the Total Environment Linking cortisol response with gene expression in fish exposed to gold nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 1–8. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.153
- Tuzuki, B.L.L., Delunardo, F.A.C., Ribeiro, L.N., Melo, C.P. De, Gomes, L.C., Chippari-gomes, A.R., 2017. Effects of manganese on fat snook *Centropomus parallelus* (Carangaria : Centropomidae) exposed to different temperatures. *Neotrop. Ichthyol.* 15, 1–10. doi:10.1590/1982-0224-20170054
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation

- and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Vasadia, D.J., Zippay, M.L., Place, S.P., 2019. Characterization of thermally sensitive miRNAs reveals a central role of the FoxO signaling pathway in regulating the cellular stress response of an extreme stenotherm, *Trematomus bernacchii*. *Mar. Genomics* 100698. doi:10.1016/j.margen.2019.100698
- Vergauwen, L., Hagenaaars, A., Blust, R., Knapen, D., 2013. Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: Evidence from transcript expression to physiology. *Aquat. Toxicol.* 126, 52–62. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.028
- Veronez, A.C. da S., Salla, R.V., Baroni, V.D., Barcarolli, I.F., Bianchini, A., dos Reis Martinez, C.B., Chippari-Gomes, A.R., 2016. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquat. Toxicol.* 174, 101–108. doi:10.1016/j.aquatox.2016.02.011
- Viana, L.F., Suárez, Y.R., Cardoso, C.A.L., Crispim, B. do A., Cavalcante, D.N. de C., Grisolia, A.B., Lima-Junior, S.E., 2018. The Response of Neotropical Fish Species (Brazil) on the Water Pollution: Metal Bioaccumulation and Genotoxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* doi:10.1007/s00244-018-0551-9
- Vilella, F.S., Becker, F.G., Hartz, S.M., 2002. Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in an Atlantic Forest River in Southern Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 45, 223–232.
- Ye, H., Lin, Q., Luo, H., 2018. Applications of transcriptomics and proteomics in understanding fish immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 77, 319–327. doi:10.1016/j.fsi.2018.03.046
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol.*

Med. 33, 337–349. doi:10.1016/S0891-5849(02)00905-X

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS**

**CAPÍTULO 2:**

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E BIOACUMULAÇÃO DE  
MANGANÊS EM *Astyanax lacustris***

**KARLA GIAVARINI GNOCCHI**

**VILA VELHA**  
**DEZEMBRO/2019**

# ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E BIOACUMULAÇÃO DE MANGANÊS EM *Astyanax lacustris*

Revista: **Bulletin of environmental contamination and toxicology**

Karla Giavarini Gnocchi<sup>1</sup>; Aline Silva Gomes<sup>1</sup>; Larissa Souza Passos<sup>1</sup>; Tatiana Miura Pereira<sup>1</sup>; Dandara Silva Cabral<sup>1</sup>; Letícia Alves de Souza<sup>1</sup>; Adriana Regina Chippari-Gomes<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Vila Velha - UVV, Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB PEIXE), Rua Comissário José Dantas de Melo, nº 21, Boa Vista, 29102-770, Vila Velha, ES, Brazil.

\*Autor correspondente. Tel.: +55 027 3329299E-mail addresses: [adriana.chippari@uvv.br](mailto:adriana.chippari@uvv.br)

## Resumo

Os efeitos tóxicos do manganês em exemplares de *Astyanax lacustris* foram investigados nesse estudo. Para tal, os peixes foram expostos de forma individual às diferentes concentrações do metal (3,325; 6,65; e 13,33 mg/L) por 96 h. Os efeitos do Mn foram avaliados utilizando biomarcadores bioquímicos (glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) e a acetilcolinesterase (AChE)), e também foi avaliada a bioacumulação de manganês no tecido hepático e branquial dos peixes. Os resultados demonstraram que apenas entre as concentrações de 6,65 mg/L e 13,33 mg/L é que a atividade da GST diferiu significativamente, entretanto não foram observadas diferenças na atividade enzimática da CAT. Contudo, foi observado que à medida que aumenta as concentrações de manganês ocorre uma inibição da atividade da AChE no cérebro desses indivíduos e ocorre uma maior bioacumulação de Mn no tecido hepático e branquial. Os resultados demonstram que concentrações elevadas de manganês podem ocasionar alterações na fisiologia e na concentração desse metal nos tecidos dos peixes expostos a ele.

**Palavras-chave:** Fish, metal, enzymes, accumulation, liver, gills.

## 1. Introdução

Os metais são elementos que ocorrem naturalmente no ambiente (Zhong et al. 2018), entretanto, sua utilização fez com que esses elementos fossem amplamente distribuídos nos diferentes ecossistemas (Bonsignore et al. 2018). Os metais alcançam o ambiente aquático por meio de águas residuais, efluentes industriais e domésticos, atividades agrícolas e de mineração (Anandkumar et al. 2018). Outra maneira dos metais atingirem esses ambientes é por meio de acidentes ambientais, como o rompimento de barragens de mineradoras, como o registrado em Mariana e Brumadinho (Brasil) e em Obed e Mount Polley (Canadá). Os metais podem ser considerados essenciais ou não essenciais para os organismos (Bonsignore et al. 2018) e devido à sua persistência no ambiente e à sua potencial toxicidade e bioacumulação têm sido considerados importantes poluentes do ecossistema aquático (Zhong et al. 2018).

As concentrações do Mn no ambiente têm aumentado em virtude das ações das mineradoras, visto que este elemento faz parte da constituição das ferroligas metálicas (Pereira et al. 2008). Essa situação é agravada ainda mais quando rompimentos de barragens de mineradoras ocorrem, como o que aconteceu em Mariana (Minas Gerais, Brasil) em novembro de 2015, escoando grandes quantidades de Fe e Mn para os corpos hídricos (Segura et al. 2016). O manganês é considerado um elemento essencial aos seres vivos por atuar como cofator de diversas enzimas que estão relacionadas com funções neuronais entre outras (Marins et al. 2019), entretanto, quando presente em altas concentrações, esse metal pode ser tóxico aos seres vivos expostos a ele (Tuzuki et al. 2017). Dependendo de sua concentração no ambiente o Mn pode causar desde disfunções neurológicas (Bonke et al. 2015), até alterações, genotóxicas, bioquímicas e comportamentais (Marins et al. 2019). Além disso, o manganês pode ser acumulado em diferentes tecidos dos organismos (Gabriel et al. 2013), proporcionando uma medida relativa da quantidade de contaminante a qual o organismo foi exposto (Nasrolahi et al. 2014).

Para avaliar o quanto metais acumulam nos tecidos dos organismos quando são expostos a estes é necessária a realização de estudos

ecotoxicológicos com a utilização de bioindicadores, como os peixes, que podem acumular metais em tecidos corporais, como fígado e brânquia (Anandkumar et al. 2018). *Astyanax lacustris* (lambari) é uma espécie de peixe abundante nos ecossistemas de água doce, possui um ciclo de vida curto, é de fácil captura, de fácil manuseio e adaptação em laboratório, facilitando a sua utilização em bioensaios (Stevanato and Ostrensky 2018). Além disso, é uma das espécies presentes nos corpos hídricos que envolvem os rios afetados pelo rompimento da barragem de Mariana (Salvador et al. 2018) que ocorreu em novembro de 2015. Por esses motivos essa espécie foi escolhida como bioindicadora nesse estudo.

Quando um peixe é exposto a determinadas concentrações de algum tipo de metal, esses organismos podem apresentar alterações bioquímicas (Cavas 2011). Isso porque a presença de metais no ecossistema aquático pode induzir estresse oxidativo e, assim, causar a inibição ou a ativação da atividade de algumas enzimas (Padmini and Usha Rani 2009), fazendo com que essas respostas sejam importantes ferramentas em ensaios ecotoxicológicos. Dentre os biomarcadores bioquímicos podemos avaliar a atividade de algumas enzimas que são alteradas quando em presença de contaminantes, como a glutathione S-transferase (GST), a catalase (CAT) (Qu et al. 2014) e a acetilcolinesterase (AChE) (Marinho et al., 2019), as quais foram escolhidas para serem utilizadas como biomarcadores no presente trabalho.

Em virtude do exposto, o presente estudo teve o objetivo de avaliar os possíveis efeitos do manganês em exemplares de *Astyanax lacustris* (lambari), utilizando biomarcadores bioquímicos (GST, CAT e AChE) e também a acumulação de manganês em amostras de fígado e brânquias.

## **2. Material e Métodos**

Juvenis de *A. lacustris* (peso  $3,04 \pm 0,87$ g, comprimento  $5,95 \pm 0,6$  cm, n = 24) foram obtidos de um criadouro localizado em Itarana/ES (Sudeste do Brasil) de onde foram transportados para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab-Peixe/UVV). No laboratório os animais foram aclimatados por 30 dias em um tanque de polietileno (310 L), com aeração constante e fotoperíodo de 12:

12 h. Durante o período de aclimação os animais foram alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial (Propescado, 45 % de proteína bruta, extrusada). Uma vez por semana a água do tanque foi parcialmente trocada (70 %) e todos os dias a água de fundo foi sifonada para retirada dos dejetos. Os parâmetros físico-químicos da água: oxigênio dissolvido ( $5,87 \pm 0,5$  mg O<sub>2</sub>/L), pH ( $7,7 \pm 0,6$ ), temperatura ( $23,9 \pm 0,50$  °C) e condutividade ( $137,4 \pm 12,5$  µS.cm<sup>-1</sup>) foram monitorados utilizando um multiparâmetro YSI 85. Para as demais análises como: alcalinidade ( $13,44 \pm 4,75$  mg/L CaCO<sub>3</sub>) e dureza ( $59,63 \pm 10,43$  mg/L CaCO<sub>3</sub>) foram utilizados os métodos descritos pelo APHA (2005). A alimentação dos peixes foi suspensa 24 h antes da transferência para os aquários testes.

Após aclimação, os peixes (n=24) foram transferidos de forma aleatória para aquários individuais de vidro (6 L), onde permaneceram por 48 h para a aclimação, para posteriormente dar início à exposição de 96 h às diferentes concentrações de manganês. Os peixes foram subdivididos em quatro diferentes grupos experimentais: (i) grupo controle (C - água proveniente do sistema comum de abastecimento da universidade); (ii) 3,33 mg/L de Mn; (iii) 6,65 mg/L de Mn; e (iv) 13,33 mg/L de Mn (concentração relatada por SEMAD-IGAM, (2016) no Rio Doce após o rompimento da barragem de uma mineradora). As concentrações utilizadas foram definidas utilizando o trabalho desenvolvido por Segura et al. (2016). As concentrações de 3,33 e 6,65 mg/L foram obtidas por meio de uma razão de 2 vezes a partir da concentração relatada por SEMAD-IGAM, (2016) e Segura et al. (2016). Cada grupo teve um número amostral igual a seis (expostos individualmente nos aquários). O manganês foi adicionado na água por meio de uma solução estoque (Cloreto de manganês tetra hidratado, 2 g/L; Sigma - M3634). As condições experimentais que os peixes estavam expostos foram monitoradas durante o bioensaio e se apresentaram similares ao do período de aclimação: oxigênio dissolvido ( $5,87 \pm 0,5$  mg O<sub>2</sub>/L), pH ( $7,4 \pm 0,52$ ), temperatura ( $23,93 \pm 0,60$  °C), condutividade ( $119,96 \pm 18,80$  µS.cm<sup>-1</sup>), alcalinidade ( $13,01 \pm 4,42$  mg/L CaCO<sub>3</sub>) e dureza ( $64,78 \pm 10,31$  mg/L CaCO<sub>3</sub>).

Ao final das 96 h de exposição aos quatro tratamentos, os peixes foram anestesiados com solução de Benzocaína (0,2 g.L<sup>-1</sup>) e eutanasiados (Winkaler

et al. 2007). As brânquias, fígado e cérebro foram removidos e estocados a -80 °C até o momento das análises bioquímicas e de acumulação. Todo o procedimento experimental foi realizado após a aprovação do comitê de ética animal (CEUA - Parecer 508/2018).

Para a realização da análise do acúmulo de manganês no fígado e nas brânquias as amostras foram digeridas em forno de micro-ondas (Ethos UP - Millestone) com potência máxima de 1000 W e temperatura de 200 °C. Para garantir a acurácia do método, o mesmo procedimento foi realizado com material de referência certificado (*ERM – BB422) Fish muscle* e analisado posteriormente resultando numa recuperação do Mn de 118 %. A concentração de manganês nas amostras digeridas e na água foi determinada utilizando um Espectrofotômetro de absorção atômica (Thermo Scientific, AAS ICE 3500), e expressa em mg/Kg para os tecidos e em mg/L para a água.

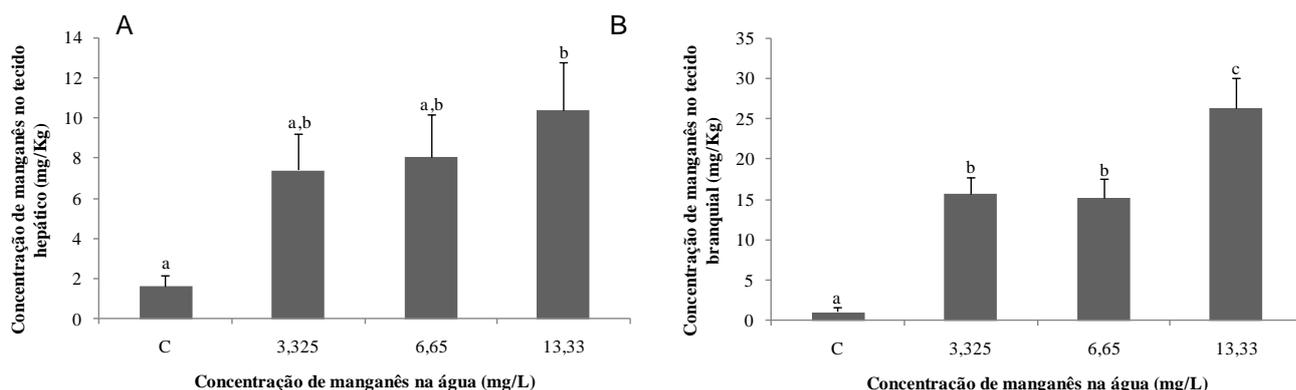
Para as análises bioquímicas, as amostras de brânquias e cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato e o valor de proteína total dos tecidos foi determinado utilizando o método descrito por Bradford (1976). Em seguida foi quantificada a atividade da GST e da CAT nas brânquias utilizando o método descrito por Habig et al., (1974), Habig e Jakoby, (1981) e por Aebi, (1984). A atividade da AChE no tecido nervoso (cérebro) foi avaliada utilizando o método descrito por Ellman et al (1961).

Para análise dos dados foi realizada uma análise de variância (ANOVA) one way seguida pelo pós-teste de *Tuckey* para múltiplas comparações. Diferenças estatísticas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média. Além disso, foram determinadas a NOEC (efeito não observado) e a LOEC (menor concentração de efeito observado) com o intuito de fornecer informações sobre a avaliação de riscos utilizando como base os biomarcadores que foram significativos. A NOEC foi considerada a maior concentração de manganês na qual não houve alteração significativa em relação ao controle pelo teste ANOVA e Dunnett ( $p < 0,05$ ), enquanto o LOEC foi considerado como a menor concentração em que se observou efeito significativo em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas no SigmaPlot, versão 12.5.

### 3. Resultados e Discussão

Durante a exposição de exemplares de *A. lacustris* ao manganês, a concentração desse metal dissolvido na água dos aquários testes permaneceu em:  $- 0,24 \pm 0,02$  mg/L para o grupo controle,  $2,11 \pm 0,62$  mg/L de Mn para o grupo exposto a 3,33 mg/L,  $5,00 \pm 0,96$  mg/L para o grupo exposto a 6,65 mg/L, e  $10,43 \pm 1,21$  mg/L para o grupo exposto a concentração de 13,33 mg/L.

Os resultados da acumulação de manganês no tecido hepático demonstram que apenas os peixes expostos a concentração de 13,33 mg/L diferiram estatisticamente do grupo controle ( $p = 0,035$ ). Enquanto no tecido branquial houve uma acumulação significativa desse metal em todos os grupos expostos em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 1), sendo que o grupo exposto a 13,33 mg/L de Mn diferiu também dos demais grupos. Observa-se ainda que a acumulação de Mn foi maior nas brânquias do que no fígado.



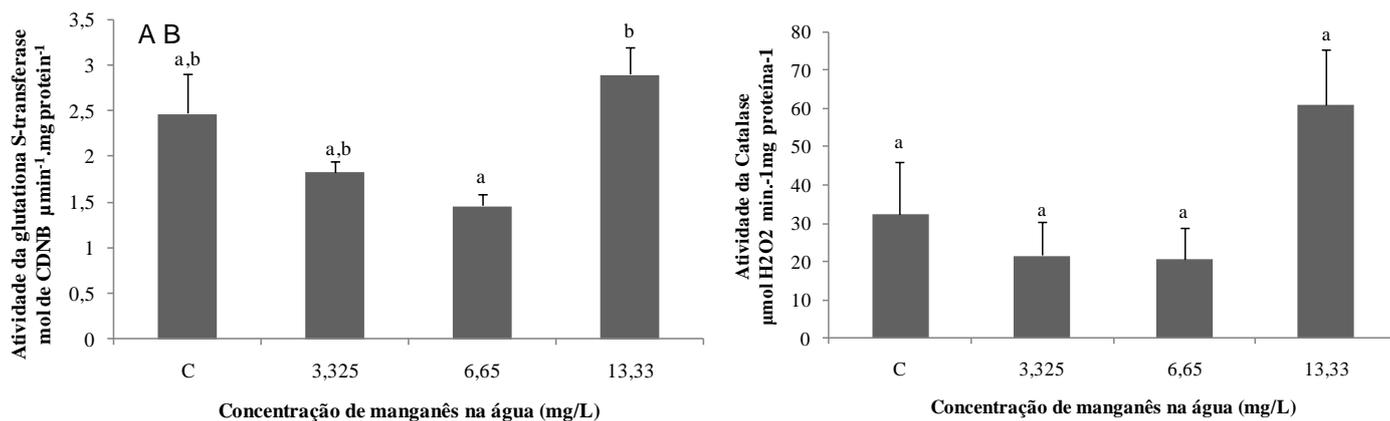
**Figura 1.** Concentração de manganês no tecido hepático ( $p < 0,001$ ) (A), e no tecido branquial ( $p = 0,035$ ) (B) em exemplares de *Astyanax lacustris* ( $n = 6$ ) expostos a diferentes concentrações (3,325, 6,65 e 13,33 mg/L) do metal, por 96 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média.

O aumento na acumulação de manganês no tecido branquial e hepático pode ser explicado pela maior disponibilidade dos íons metálicos na água em concentrações mais elevadas do metal, fazendo com que acumulasse com maior facilidade aos diferentes tecidos. O aumento na acumulação de Mn em maiores concentrações pode ser explicado pelo equilíbrio entre a capacidade de absorção e depuração dos peixes (Anandkumar et al. 2018). Outro fator a ser considerado é que o tecido branquial por ser uma superfície fina e extensa

e ter um contanto direto com a água é mais vulnerável aos danos causados pelos metais do que os outros tecidos (Gabriel et al., 2013), por isso acumulou mais Mn do que o tecido hepático. O estudo realizado por Javed et al. (2015) sugere que a brânquia pode ser utilizada para avaliar a toxicidade causada pelos metais em peixes, visto que essa estrutura permanece em contato direto com o ambiente e é metabolicamente ativa, sendo considerada a primeira linha de defesa contra as substâncias tóxicas presentes no ambiente (Javed et al. 2015). Além disso, segundo Kraal et al. (1995), quando um peixe no ecossistema aquático é exposto aos metais a acumulação desses elementos pode ocorrer de maneira distinta nos tecidos. Esta constatação corrobora com o que foi encontrado no presente estudo, no qual foi verificada uma maior concentração de manganês no tecido branquial do que no tecido hepático. Em relação ao fígado, este é um órgão que desempenha um importante papel no metabolismo de metais atuando na detoxificação desses compostos, por isso são encontrados valores altos de metais nesse órgão, sendo muito utilizado para avaliar os efeitos ocasionados aos seres vivos expostos a diferentes concentrações desses elementos, como o manganês (Siscar et al. 2014). A concentração de 13,33 mg/L de manganês foi relatada em águas naturais após o rompimento da barragem de uma mineradora, fazendo com que a biota local ficasse exposta a elevadas concentrações de manganês. De acordo com a resolução CONAMA 357 (a qual preconiza os padrões de qualidade para ambientes de água doce) a concentração limite de manganês não deve exceder o valor de 0,01 mg/L. Ou seja, após acidente, a biota residente dos locais atingidos por esse desastre foi submetida a elevadas concentrações desse metal, fazendo com que os organismos presentes nesses ambientes acumulassem os poluentes provenientes dos rejeitos dessa barragem.

A atividade das enzimas GST, CAT e a AChEnas brânquias foram os biomarcadores bioquímicos escolhidos no presente estudo para avaliar a toxicidade das diferentes concentrações de manganês (3,325, 6,65 e 13,33 mg/L), por 96 h. Os resultados obtidos demonstram que houve um aumento na atividade da GST no tecido branquial dos peixes expostos na concentração de 13,33 mg/L ( $p = 0,007$ ) quando comparado a concentração de 6,65 mg/L (Figura 2A). A ativação dessa enzima pode ter ocorrido para promover a

detoxificação devido ao excesso de manganês acumulado nesse tecido. Entretanto, nas concentrações de 3,325 e de 6,65 mg/L de Mn observa-se uma menor atividade enzimática da GST, o que pode indicar que a produção de EROS (espécie reativas de oxigênio) estava menor nos peixes expostos a essa situação em relação aos que estavam expostos à 13,33 mg/L.

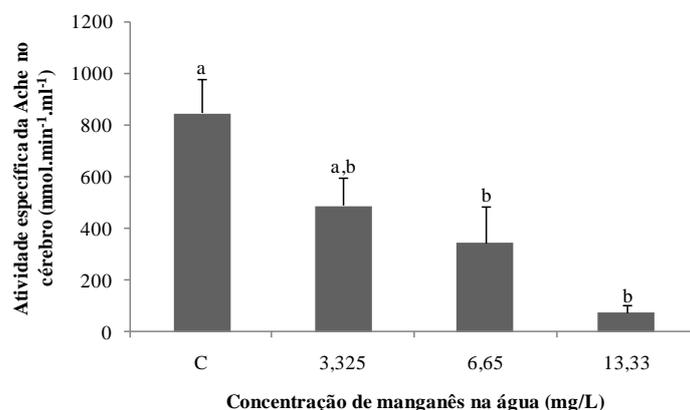


**Figura 2. A)** Atividade da Glutathiona S-transferase (GST) ( $p = 0,007$ ), e **B)** da Catalase (CAT) ( $p = 0,074$ ) no tecido branquial de exemplares de *Astyanax lacustris* ( $n = 6$ ) expostos a diferentes concentrações de manganês (3,325, 6,65 e 13,33 mg/L), por 96 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média.

As enzimas do sistema antioxidante podem apresentar um aumento ou uma redução de sua atividade dependendo do tipo e da concentração do estressor (Javed et al. 2015). Isso pode ser notado quando avaliada a atividade enzimática da catalase que não sofreu alterações nas diferentes concentrações de exposição ( $p = 0,074$ ) (Figura 2B). Esses resultados sugerem que não houve a ativação da rota metabólica dessa enzima ou até mesmo que foi utilizada outra via de detoxificação na tentativa da eliminação do metal. O estudo desenvolvido por Gabriel et al. (2013) investigou as respostas do sistema antioxidante de peixes da espécie *Colossoma macropomum* expostos a 3,88 mg/L de manganês, por 96 h, no qual observaram que não houve alterações na atividade enzimática da GST no tecido branquial e da CAT no tecido hepático, indicando que não ocorre um padrão antioxidante nos tecidos de peixes expostos a metais, e que não ocorreu um aumento nos níveis de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para que houvesse um aumento da atividade enzimática da CAT, mesmo que a essa enzima seja formadora, juntamente com a SOD (superóxido dismutase), da primeira linha de defesa contra as EROS. Resultados similares foram encontrados no trabalho desenvolvido por Tuzuki et al. (2017), no qual exemplares da espécie *Centropomus parallelus* foram expostos ao manganês (Mn<sup>2+</sup>, 3,18 mg L<sup>-1</sup>), por 96 horas, a duas temperaturas diferentes (24 e 27 ° C), os autores também constataram que não houveram diferenças na atividade na GST, sugerindo que o metabolismo do Mn<sup>2+</sup> ocorreu por outra via de biotransformação. Além disso, as respostas do sistema de defesa antioxidante podem variar de acordo com o tecido avaliado, pois, outros tecidos, como o hepático, são responsáveis por importantes vias metabólicas (Gabriel et al., 2013). O trabalho desenvolvido por Coppo et al. (2018) confirma o que foi dito anteriormente visto que ao avaliar os efeitos do manganês (0,2; 1,5 e 2,9 mg/L) em *Oreochromis niloticus*, os autores observaram que houve uma alteração da atividade da GST no fígado mas o mesmo não pode ser observado nas brânquias dos animais expostos ao manganês, indicando que a atividade enzimática pode ser ativada ou inibida dependendo do tipo de tecido avaliado.

Os resultados obtidos por meio da análise da atividade da AChE no cérebro dos peixes expostos ao manganês, demonstram que houve uma inibição da atividade dessa enzima em concentrações mais elevadas do metal (6,65 e 13,33 mg/L,  $p = 0,002$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Atividade da acetilcolinesterase (AChE) ( $p = 0,002$ ) no tecido nervoso de exemplares de *Astyanax lacustris* ( $n = 6$ ) expostos a diferentes concentrações de manganês (3,325, 6,65 e 13,33 mg/L), por 96 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média.

Esses resultados indicam que a presença de concentrações elevadas de metais no ambiente pode atuar como inibidores da atividade da AChE fazendo com que ocorram disfunções na propagação dos impulsos nervosos dos organismos. A inibição da AChE por metais pode ser explicada pelo fato desses compostos terem a capacidade de se ligarem aos grupos funcionais das proteínas, comprometendo a atividade catalítica, levando à perda da função enzimática (Haverroth et al., 2015). Essa enzima é responsável pela hidrólise da acetilcolina (Ach) no momento da realização das sinapses colinérgicas (Lopes et al. 2019) garantindo a intermitência do impulso nervoso responsável pela comunicação neuronal (Araújo et al. 2016). A inibição da atividade dessa enzima ocasionada pela exposição aos metais, como observado no presente estudo, pode causar um acúmulo excessivo do neurotransmissor Ach na fenda sináptica, promovendo uma hiperestimulação dos receptores pós-sinápticos, e conseqüentemente causando inúmeros problemas, como a síndrome colinérgica e até mesmo a morte do indivíduo (Lopes et al. 2019). A inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase também foi observada no trabalho desenvolvido por De Lima et al. (2013) ao exporem peixes da espécie *Danio rerio* a diferentes metais como cobre, ferro e cádmio. Os resultados desse estudo indicam que os metais podem interferir na fisiologia cerebral dos organismos, promovendo alterações na atividade enzimática da AChE, pois, como mencionado acima, esses compostos podem se ligar a grupos funcionais das proteínas comprometendo sua atividade catalítica levando à perda da função da enzima.

Os resultados obtidos para a NOEC e LOEC indicam que na concentração mais baixa de manganês (3,33 mg/L) já pode ser observado um acúmulo desse metal no tecido branquial. Essa mesma acumulação de Mn no tecido branquial pode ser observada no trabalho desenvolvido por Coppo et al. (2018), no qual exemplares da espécie *Oreochromis niloticus* foram expostos a concentração de 2,9 mg/L de Mn demonstrando que, mesmo em baixas concentrações, esse metal pode ser acumulado no tecido da biota oferecendo riscos ambientais aos peixes. Visto que, os efeitos causados pela acumulação de metais podem se manifestar em diferentes etapas do ciclo de vida dos animais (Van der Oost et al. 2003). Os resultados da NOEC e LOEC também revelaram que na

concentração de 6,65 mg/L de Mn já ocorrem alterações na atividade enzimática da AChE no tecido nervoso demonstrando que mesmo em uma exposição de curto prazo (96 h) o Mn pode ser tóxico para os peixes (Tabela 1). Esses resultados sugerem também que as alterações desses parâmetros podem ser utilizadas como biomarcadores em caso de contaminação ambiental por Mn. Visto que, apesar das concentrações utilizadas no presente estudo estarem acima do permitido pela legislação (resolução CONAMA 357 - 0,01 mg/L), na literatura já existem relatos de que concentrações superiores a essas testadas podem ser encontradas no ambiente. Logo, o desenvolvimento de estudos relatando os efeitos do manganês em peixes é de extrema importância já que, esses animais são considerados um importante elo das cadeias tróficas. Por meio de diversos comportamentos, os seres vivos podem manifestar os efeitos adversos causados pelos poluentes presentes no ecossistema (Wieczerzak et al. 2016) e a NOEC e a LOEC podem ser utilizadas como parâmetros para avaliar esses efeitos causados a eles servindo como uma importante ferramenta em análises de risco ambiental, como aplicado por Venturoti et al. (2019).

**Tabela 1.** Concentração de efeito não observado (NOEC) e menor concentração de efeito observado (LOEC) referentes à acumulação de Mn nos tecidos e a atividade da AChE em exemplares de *Astyanax lacustris* expostos a diferentes concentrações de manganês.

Parâmetro	LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
Concentração de manganês no fígado	10,43 ± 1,21	5,00 ± 0,96
Concentração de manganês brânquia	2,11 ± 0,62	-
Atividade da AChE	5,00 ± 0,96	2,11 ± 0,62

Logo, com a realização do presente estudo, pode-se observar que, apesar do manganês ser um metal que desempenha um importante papel em diferentes funções fisiológicas, por ser essencial ao funcionamento do organismo, em concentrações elevadas, ele pode causar a inibição da atividade da acetilcolinesterase no cérebro de peixes pertencentes à espécie *A. lacustris*. Além disso, também foi possível notar o acúmulo desse metal no tecido hepático e branquial sugerindo que dependendo das concentrações ambientais, o manganês pode acumular em diferentes tecidos desses organismos. O acúmulo de Mn nos tecidos e as alterações fisiológicas e

bioquímicas que o Mn pode vir a causar nos peixes podem ao longo do tempo causar alterações no crescimento, reprodução e sobrevivência desses indivíduos. Logo, a espécie *A. lacustris* demonstrou ser um bom bioindicador dos impactos causados pelo manganês à biota residente do ecossistema aquático.

#### **4. Agradecimentos**

Os autores agradecem ao laboratório de Ictiologia aplicada (LAB-peixe) por fornecer todos os subsídios necessários para a execução do presente trabalho.

#### **5. Referências**

- Anandkumar A, Nagarajan R, Prabakaran K, et al (2018) Human health risk assessment and bioaccumulation of trace metals in fish species collected from the Miri coast, Sarawak, Borneo. *Mar Pollut Bull* 133:655–663. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.06.033
- Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, et al (2015) Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother* 72:74–82. doi: 10.1016/j.biopha.2015.04.004
- Araújo MC de, Assis CRD, Silva LC, et al (2016) Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. *Aquat Toxicol* 177:182–189. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.05.019
- Bonsignore M, Salvagio Manta D, Mirto S, et al (2018) Bioaccumulation of heavy metals in fish, crustaceans, molluscs and echinoderms from the Tuscany coast. *Ecotoxicol Environ Saf* 162:554–562. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.044
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Calza C, Anjos MJ, Castro CRF, et al (2004) Evaluation of heavy metals levels in the Paraíba do Sul River by SRTXRF in muscle, gonads and gills of

- Geophagus brasiliensis. Radiat Phys Chem 71:787–788. doi: 10.1016/j.radphyschem.2004.04.092
- Cavas T (2011) In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. Food Chem Toxicol 49:1431–1435. doi: 10.1016/j.fct.2011.03.038
- De Lima D, Roque GM, De Almeida EA (2013) In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). Mar Environ Res 91:45–51. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.11.005
- Gabriel D, Paula A, Isabela KR, et al (2013) Effects of Subchronic Manganese Chloride Exposure on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Tissues: Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. doi: 10.1007/s00244-012-9854-4
- Haverroth GMB, Welang C, Mocelin RN, et al (2015) Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicol Environ Saf 122:440–447. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.012
- Javed M, Usmani N, Ahmad I, Ahmad M (2015) Studies on the oxidative stress and gill histopathology in *Channa punctatus* of the canal receiving heavy metal-loaded effluent of Kasimpur Thermal Power Plant. Environ Monit Assess 187:.. doi: 10.1007/s10661-014-4179-6
- Johnson JL, Cusack B, Davies MP, et al (2003) Unmasking tandem site interaction in human acetylcholinesterase. Substrate activation with a cationic acetanilide substrate. Biochemistry 42:5438–5452. doi: 10.1021/bi027065u
- Lopes DFC, Assis CRD de, Sant'Anna MCS de, et al (2019) Brain acetylcholinesterase of three perciformes: From the characterization to the in vitro effect of metal ions and pesticides. Ecotoxicol Environ Saf 173:494–503. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.047

- Malandrakis EE, Exadactylos A, Dadali O, et al (2014) Molecular cloning of four glutathione peroxidase (GPx) homologs and expression analysis during stress exposure of the marine teleost *Sparus aurata*. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* 168:53–61. doi: 10.1016/j.cbpb.2013.11.005
- Marinho CS, Matias MVF, Brandão IGF, et al (2019) Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio*. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* 222:11–18. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.04.005
- Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, et al (2006) Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet Mol Biol* 29:148–158. doi: 10.1590/S1415-47572006000100028
- Nasrolahi A, Smith BD, Ehsanpour M, et al (2014) Biomonitoring of trace metal bioavailabilities to the barnacle *Amphibalanus amphitrite* along the Iranian coast of the Persian Gulf. *Mar Environ Res* 101:215–224. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.07.008
- Omar W a., Zaghloul KH, Abdel-Khalek A a., Abo-Hegab S (2012) Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 746:7–14. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.01.013
- Pereira AA, Hattum B Van, Brouwer A, Bodegom PM Van (2008) Effects of iron-ore mining and processing on metal bioavailability in a tropical coastal lagoon. 239–252. doi: 10.1007/s11368-008-0017-1
- Qu R, Feng M, Wang X, et al (2014) Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat Toxicol* 150:9–16. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.02.008
- Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V (2004) Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the

genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol Environ Saf* 57:168–174. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00027-7

Segura FR, Nunes EA, Paniz FP, et al (2016) Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environ Pollut* 218:813–825. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.005

Stevanato DJ, Ostrensky A (2018) Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). 16:1–10. doi: 10.1590/1982-0224-20170073

Winkaler EU, Santos TRM, Machado-Neto JG, Martinez CBR (2007) Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol* 145:236–244. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.12.009

Zhong W, Zhang Y, Wu Z, et al (2018) Health risk assessment of heavy metals in freshwater fish in the central and eastern North China. *Ecotoxicol Environ Saf* 157:343–349. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.048

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**Revista: Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**

**CAPÍTULO 3:**

**EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO MANGANÊS  
EM EXEMPLARES DE *ASTYANAX*  
*LACUSTRIS*(TELEOSTEI: CHARACIDAE)**

**VILA VELHA**  
**DEZEMBRO/2019**

## RESUMO

O manganês é um metal considerado essencial aos seres vivos, entretanto, quando presente em concentrações elevadas no ecossistema aquático ele pode ser tóxico e acumular em diferentes tecidos dos organismos expostos. Com isso, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a acumulação de manganês (6,65 mg/L) em diferentes tempos de exposição (96 h, 7, 14 e 21 dias), e de avaliar os seus possíveis efeitos tóxicos em peixes da espécie *Astyanax lacustris*, utilizando diferentes biomarcadores. Além disso, foi verificada a Temperatura Crítica Máxima ( $C_T$  Max) de exemplares de *A. lacustris* expostos ao Mn, bem como a expressão gênica da catalase ao longo do tempo. Os resultados demonstraram um aumento no acúmulo desse metal tanto no tecido hepático como no tecido branquial com o aumento do tempo de exposição. Essa acumulação se deve ao fato do fígado ser um importante órgão de detoxificação e pelo fato das brânquias estarem em contato direto com a água. Entretanto, não foram observadas alterações genotóxicas nos peixes expostos ao Mn na concentração de 6,65 mg/L, o que pode ser atribuído à taxa mitótica desses organismos e ao mecanismo de reparo celular. A atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST) só demonstrou diferenças no grupo exposto ao manganês por 96 h quando comparado ao controle e ao grupo exposto ao Mn pelo tempo de 21 dias, sugerindo que a eliminação desse metal pode ter ocorrido por outra via de detoxificação. Além disso, pode-se notar que atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) só foi alterada no grupo exposto por 7 dias ao metal, sugerindo que o tempo de exposição ao metal pode ser um dos fatores que influenciam na atividade enzimática da AChE. O teste de temperatura crítica máxima ( $C_T$  Max) demonstrou que a perda de equilíbrio de 50 % dos peixes acontece na temperatura de 39 °C, com e sem presença de manganês na água, indicando que a concentração de Mn testada não foi suficiente para alterar a  $C_T$  Max dos indivíduos. Além disso, a análise de expressão gênica da Catalase (CAT), tanto no experimento de acumulação como no experimento de  $C_T$  Max, demonstrou não haver diferenças na expressão dessa enzima, indicando que o metal foi metabolizado por outra via de detoxificação.

**Palavras-chave:** Acumulação, metal, peixe, danos genotóxicos, alterações bioquímicas, expressão gênica.

## 1. INTRODUÇÃO

O manganês ( $Mn^{2+}$ ) é um metal essencial aos seres vivos, que atua no metabolismo de aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos (Gabriel et al., 2013). Esse metal é considerado um micromineral essencial para o crescimento, desenvolvimento vertebral e metabolismo dos peixes (Prabhu et al., 2019). Entretanto, atividades antropogênicas, como o lançamento de efluentes industriais, têm contribuído para o aumento da concentração de manganês no ecossistema aquático (Ahmed et al., 2016), e esse fato pode vir a causar diversos danos à saúde dos organismos, visto que elevadas concentrações de Mn podem causar disfunções neurológicas (Bonke et al. 2015), alterações, genotóxicas, bioquímicas e comportamentais (Marins et al. 2019).

O efeito da presença de metais no ecossistema aquático vem sendo alvo de diversos estudos (Abdalla et al., 2019; Brown et al., 2018; Molina-villalba et al., 2015; Zhao et al., 2018), pois esses elementos têm um elevado potencial de acumulação no ambiente como também nos tecidos dos seres vivos (Molina-villalba et al., 2015). A assimilação dos metais pelos organismos pode ocorrer por meio da ingestão, trocas iônicas (brânquias) e também pela absorção pela superfície da pele (Ahmed et al., 2016). E quando os metais alcançam o interior do corpo dos seres vivos sua acumulação dependerá das taxas de captação e de eliminação desses elementos (Mansour and Sidky, 2002). A acumulação de metais nos seres vivos pode ser um indício de contaminação do ecossistema aquático por esses compostos (Van der Oost et al., 2003; Velusamy et al., 2014; Voigt et al., 2015). Com isso, é importante o desenvolvimento de estudos para avaliar a acumulação desses elementos pelos seres vivos, pois alguns deles podem ser tóxicos mesmo em níveis mais baixos do que os permitidos pela legislação (Voigt et al., 2015).

Entretanto, além do aumento da concentração dos metais nos corpos hídricos, outros estressores podem estar presentes nesses ambientes, como o aumento da temperatura (Walther et al., 2002). É comum na literatura encontrar informações sobre o efeito isolado de diversos estressores (Canalejo et al., 2012; Geszvain et al., 2012; Santos et al., 2012). A presença simultânea de

estressores térmicos e químicos pode potencialmente interagir e alterar a capacidade do organismo de produzir respostas de defesa adequadas ao estresse. Contudo, poucos são os estudos direcionados a investigar os efeitos combinados dos estressores, como o observado em condições ambientais naturais (Jacquin et al., 2019).

Logo, no ecossistema aquático existe uma série de estressores que podem acarretar uma ampla gama de efeitos nos organismos residentes nesses ambientes (Couturier et al., 2013; Iwasaki e Ormerod, 2012; Simonato et al., 2013). Para avaliar a presença e os efeitos desses múltiplos estressores nos organismos aquáticos, são utilizados ensaios laboratoriais, como o teste de Temperatura Crítica Máxima ( $C_T$  Max). Esse teste consiste em avaliar os pontos térmicos em que os indivíduos apresentam a sua atividade locomotora desorganizada, fazendo com que o animal perca a sua capacidade de escapar de situações de risco (Becker and Genoway, 1979). Os resultados desse teste são úteis como biomarcadores de estresse ambiental, pois com ele é possível avaliar, por meio de um teste rápido e não letal, a tolerância térmica dos organismos (Eme and Bennett, 2009) e se esta está sendo alterada frente aos diferentes estressores.

Outra forma de avaliar o impacto das alterações no ambiente aquático na biota é por meio da utilização de biomarcadores moleculares (Choi et al., 2007; Peter et al., 2016; Vergauwen et al., 2013), genotóxicos (Fatima et al., 2015; Omar et al., 2012) e bioquímicos (Awasthi et al., 2018a, 2018b; Wang et al., 2015). As respostas moleculares são utilizadas em diversos estudos ecotoxicológicos (Banni et al., 2014; Choi et al., 2007; Dennis et al., 2014b; Martin et al., 2016). Visto que a análise da expressão gênica fornece informações importantes a respeito do efeito da exposição dos seres vivos a compostos potencialmente tóxicos, permitindo a identificação de genes diferencialmente expressos (Kumar e Denslow, 2015) por meio da ativação ou inibição de alguns genes (Banni et al., 2014; Li et al., 2008). De uma forma geral, os biomarcadores moleculares são proteínas, receptores, ou moléculas relacionadas a vias metabólicas ou respostas celulares, cuja expressão é regulada em resposta a estímulos endógenos ou exógenos resultantes de uma

situação de estresse ao organismo (Dennis et al., 2014a; Malandrakis et al., 2014).

Assim como as respostas moleculares o Teste do Micronúcleo (MN) também é um biomarcador (genotóxico) utilizado para avaliar danos mutagênicos causados por substâncias xenobióticas aos seres vivos (Russo et al., 2004). A formação de micronúcleos representam perdas cromossômicas, mas também podem representar a amplificação do DNA (Araldi et al., 2015a). As alterações bioquímicas que ocorrem em um ser vivo também são utilizadas como respostas mediante a presença de estressores ambientais, e a glutathione S-transferase (GST) por ser uma enzima do sistema antioxidante é amplamente utilizada como biomarcadora nesses estudos (Garcia et al., 2015; Liu et al., 2015; Simonato et al., 2011; Tuzuki et al., 2017). Ela se caracteriza por ser uma enzima de fase II que atua na desintoxicação de substâncias endógenas e exógenas (Delunardo et al., 2015), transformando essas substâncias em uma forma mais solúvel, por meio de reações de conjugação (Simonato et al., 2011). Dessa forma facilita a eliminação dessas substâncias do organismo (Van der Oost et al., 2003), modulando os efeitos tóxicos dos poluentes no interior celular (Rocha-Santos et al., 2018).

Além da GST, outro importante biomarcador bioquímico é a acetilcolinesterase (AChE), que desempenha a função de degradar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Heinrich e Braunbeck, 2018), no momento da realização das sinapses colinérgicas (Lopes et al., 2019). Diversos estudos ecotoxicológicos vêm sendo desenvolvidos utilizando a resposta enzimática da AChE como resposta dos impactos causados pelos estressores aos seres vivos residentes no ecossistema aquático (Araújo et al., 2016; Johnson et al., 2003; Kirby et al., 2000; Marinho et al., 2019; Siscar et al., 2014). Isso porque a presença desses compostos pode promover alterações na sua atividade enzimática, devido à capacidade que esses elementos têm de se ligar aos grupos funcionais das proteínas, comprometendo a atividade catalítica, levando à perda da função dessa enzima (Haverroth et al., 2015).

Por isso, para avaliar os impactos causados por esses estressores nos seres vivos é importante a utilização de multimarcadores em espécies bioindicadoras como *Astyanax lacustris* (*A. lacustris*) (Súarez et al., 2017a).

Essa espécie habita pequenos riachos, lagos e rios (Stevanato and Ostrensky, 2018), possuem hábitos alimentares onívoros (Alonso et al., 2019), são oportunistas, abundantes, são de fácil captura no ambiente e de fácil manuseio e adaptação em laboratório (Súarez et al., 2017b). Essa espécie de peixe vem sendo utilizada como bioindicadora em muitos estudos de alterações ambientais, devido a sua plasticidade trófica (Stevanato and Ostrensky, 2018). Logo, o presente estudo tem o objetivo de avaliar os efeitos do tempo de exposição ao manganês (6,65 mg/L), por meio de ensaios agudos (96 h) e sub crônicos (7, 14 e 21 dias) em exemplares de *Astyanax lacustris*. Por meio da acumulação de Mn nos tecidos branquial e hepático, assim como na avaliação do uso de biomarcadores moleculares, genotóxicos e bioquímicos. Outro objetivo desse trabalho foi o de identificar se a Temperatura Crítica Máxima ( $C_T$  Max) de exemplares de *A. lacustris* é alterada na presença de Mn. Com isso, será possível compreender como a temperatura e o Mn associados podem afetar a expressão gênica da Catalase em *A. lacustris*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Juvenis de *A. lacustris* ( $n = 136$ ) (peso médio  $2,75 \pm 0,73$  g, comprimento médio  $5,94 \pm 0,74$  cm) foram obtidos em um criadouro localizado em Itarana/ES de onde foram transportados para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab-Peixe), da Universidade Vila Velha (UVV). No laboratório os animais foram aclimatados por 30 dias em um tanque de polietileno (310 L). O tanque foi mantido com aeração constante, fotoperíodo de 12:12 h e temperatura de 25 °C. Durante o período de aclimação os animais foram alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial (Propescado, 45 % de proteína bruta, extrusada). Três vezes por semana a água do tanque foi parcialmente trocada (70 %) e todos os dias a água de fundo foi sifonada. Os parâmetros físico-químicos da água: oxigênio dissolvido ( $5,71 \pm 0,05$  mg/L), pH ( $6,8 \pm 0,05$ ), temperatura ( $23,8 \pm 0,84$  °C) e condutividade ( $125,14 \pm 14,36$   $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) foram monitorados utilizando multiparâmetro YSI 85. Para as demais análises como: alcalinidade ( $15,13 \pm 4,24$  mg/L  $\text{CaCO}_3$ ) e dureza ( $101,66 \pm 21,24$  mg/L  $\text{CaCO}_3$ ) foram utilizados os métodos descritos pelo APHA (2005). Esses parâmetros foram monitorados em todos os protocolos experimentais. A alimentação dos peixes foi suspensa 24 h antes da transferência para os aquários testes.

Após aclimação, parte dos peixes ( $n = 64$ ) foram transferidos de forma aleatória para aquários individuais de vidro (6 L), onde permaneceram por 48 h para a aclimação e posteriormente serem expostos ao manganês (6,65 mg/L), por diferentes tempos de exposição (96 h, 7, 14 e 21 dias). O manganês foi adicionado na água por meio de uma solução estoque (Cloreto de manganês tetra hidratado, 2 g/L; Sigma - M3634). A concentração utilizada no presente estudo foi definida por meio dos resultados obtidos no Capítulo 2 da presente tese, no qual foi observado que essa concentração, quando presente na água, é capaz de causar alterações em biomarcadores bioquímicos e pode ser acumulado no tecido branquial e hepático em peixes da espécie *A. lacustris*. A cada 96 h foi realizada a troca parcial da água (50 %) dos aquários. Cada grupo teve um número amostral igual a oito, sendo os peixes expostos em aquários individuais. E cada grupo exposto ao Mn nos diferentes tempos (96 h, 7 14 e 21 dias) foi acompanhado por seu respectivo grupo controle. As condições experimentais que os peixes estavam expostos foram monitoradas durante o bioensaio, e se mantiveram de forma semelhante ao período de aclimação: oxigênio dissolvido ( $6,42 \pm 1,12$  mg/L), pH ( $6,81 \pm 0,19$ ), temperatura ( $22,9 \pm 1,0$  °C), condutividade ( $137,21 \pm 22,5$   $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), alcalinidade ( $14,02 \pm 4,2$  mg/L  $\text{CaCO}_3$ ) e dureza ( $113,62 \pm 23,25$  mg/L  $\text{CaCO}_3$ ).

Ao final dos diferentes tempos de exposição, os peixes foram anestesiados com solução de Benzocaína ( $0,2$  g.L<sup>-1</sup>) e amostras de sangue foram obtidas por punção da veia caudal, para realização do teste do micronúcleo. Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por secção cervical (Winkaler et al., 2007). Parte das amostras de fígado foram removidos e acondicionados em microtubos de polietileno com RNAlater (Sigma – R0901) para realização das análises moleculares. Em seguida, todo material obtido foi congelado a  $-80$  °C, para posterior análise da expressão de proteínas. Amostras de brânquias, fígado e cérebro, foram removidas e estocadas a  $-80$  °C até o momento das análises de acumulação de Mn e das análises bioquímicas.

Outra parte dos peixes ( $n = 72$ ) foi utilizada para a realização de dois diferentes testes de  $C_T$  Max. No primeiro teste os peixes foram distribuídos de forma aleatória em três aquários de polietileno de 60 L ( $n=12$  em cada aquário, em triplicata). Após aclimação de 48 h foram iniciados os testes de

temperatura crítica máxima ( $C_T$  Max) (Beitinger and Bennett, 1999) em condições controle (sem a presença de Mn). Para o controle da temperatura, cada aquário portava um aquecedor acoplado a um termostato (Full Gauge *TIC-17RGTi*). Para a realização do primeiro teste de  $C_T$ Max foi feito um incremento gradual de  $1 \pm 0,1$  °C por hora (Becker e Genoway, 1979) na temperatura da água a partir de 25 °C. Foi considerada a  $C_T$  Max a temperatura que ocasionou a perda do equilíbrio de 50 % dos indivíduos. Os aquários foram mantidos com aeração constante e assim como na aclimatação, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados a cada duas horas ao longo de todo o período experimental: oxigênio dissolvido ( $6,4 \pm 0,69$  mg/L), pH ( $7,16 \pm 0,12$ ) e alcalinidade ( $16,79 \pm 4,39$  mg/L  $CaCO_3$ ).

Para a realização do segundo teste de  $C_T$  Max os mesmos procedimentos realizados no experimento acima foram conduzidos novamente, porém, foi adicionada à água dos aquários, uma solução de manganês na concentração de 6,65 mg/L, a partir de uma solução estoque de Cloreto de manganês tetra hidratado (concentração - 2 g/L; Sigma - M3634). A  $C_T$  Max foi considerada a temperatura que ocasionou a perda do equilíbrio de 50 % dos indivíduos. Os aquários também foram mantidos com aeração constante e os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados a cada duas horas ao longo de todo o período experimental: oxigênio dissolvido ( $6,35 \pm 0,81$  mg/L), pH ( $7,09 \pm 0,29$ ) e alcalinidade ( $16,61 \pm 2,10$  mg/L  $CaCO_3$ ). Durante os dois testes houve coleta de tecido hepático dos peixes em três temperaturas para avaliar alterações na expressão gênica da Catalase.

As três temperaturas foram estabelecidas após um teste piloto de  $C_T$  Max e foram escolhidas de acordo com os seguintes critérios: (i): 25°C, temperatura inicial, antes do incremento de  $1 \pm 0,1$  °C (Becker e Genoway, 1979) na temperatura da água, (ii) 32° C, temperatura no meio do teste de  $C_T$  Max, (iii) 39° C, quando foi observado que 50 % dos organismos apresentaram a perda do equilíbrio. Em cada uma dessas três temperaturas, um peixe de cada aquário (totalizando um  $n=3$  para cada temperatura), foi anestesiado com solução de benzocaína ( $0,2$  g.L<sup>-1</sup>), e eutanasiados por secção cervical (Winkaler et al., 2007), para a extração do fígado para a realização das análises de biologia molecular. O tecido removido foi acondicionado em

microtubos de polietileno com RNAlater (Sigma - R0901) suficiente para que ficassem totalmente imersos. Em seguida, todo material obtido foi congelado a -80 °C, para posterior análise da expressão da Catalase.

Todo o procedimento experimental foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética e Uso Animal da UVV (CEUA - Parecer 508/2018). Após a realização de todo os procedimentos experimentais, o rejeito gerado foi encaminhado para uma empresa de tratamento de resíduos.

## **2.1 QUANTIFICAÇÃO DE MANGANÊS NA ÁGUA E NOS TECIDOS**

Para a quantificação de manganês na água dos aquários testes, as amostras foram coletadas utilizando tubos de polietileno, previamente submergidos em solução de ácido nítrico (10 %) por 48 h, e posteriormente lavados com água Milli-Q. Para análise de metais as amostras foram acidificadas (ácido nítrico, pH < 2), e armazenadas em tubos falcon (ppt) para a quantificação da concentração manganês. A concentração de manganês nas amostras foi determinada utilizando um Espectrofotômetro de Absorção Atômica (Analítica, ASS ICE 3300), no Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab-Peixe/UVV) e expressa em mg/L.

Para a quantificação de manganês nos tecidos branquial e hepático as amostras foram pesadas em balança analítica (*Shimadzu* - AUW220D) e em seguida acondicionadas em tubos de teflon (TFM de alta pureza) com volume interno de 100 ml. Posteriormente, dentro de cada tubo, foi adicionado água, ácido e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) numa proporção 5:2:1 ml. Após a adição dos reagentes, as amostras foram digeridas em forno de micro-ondas (Ethos UP - Millestone) com potência máxima de 1000 W e temperatura de 200 °C. Para garantir a acurácia do método, o mesmo procedimento foi realizado com material de referência certificado (*ERM – BB422 - Fishmuscle*), e resultando numa recuperação de 118 %. Foram utilizados reagentes da mais alta pureza em todo o processo de digestão e as soluções foram preparadas em água ultrapura, com uma resistividade de 18,2 MΩ cm obtida de um sistema Millip-Q Millipore. A concentração de manganês nas amostras digeridas foi determinada utilizando um Espectrofotômetro de Absorção Atômica (Analítica, ASS ICE

3300), no Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab-Peixe/UUVV) e expressa em mg/Kg.

## **2.2 ANÁLISES GENOTÓXICAS**

### **2.2.1 Teste do Micronúcleo**

O sangue de cada peixe (5 µl) foi coletado e misturado a 5 µl de gelatina fetal bovina para posteriormente ser gotejado sobre duas lâminas para a realização de extensões sanguíneas. Após secas (*over night*) em temperatura ambiente, as lâminas foram imersas em Metanol P.A. (100 %) por 5 a 10 minutos para fixação dos eritrócitos. Posteriormente, 0,0045 g do corante alaranjado de acridina foi pesado e diluído em tampão fosfato salino de Dulbecco (diluído 100 x). Após a preparação da solução de coloração, as lâminas foram coradas por 3 a 5 min para imediatamente serem lidas. O material foi observado em microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX43) em resolução de 400x. Foram contados mil eritrócitos por lâmina para a quantificação dos micronúcleos. Os valores de micronúcleos observados correspondem a uma média realizada a partir da contagem de duas lâminas por peixe exposto.

## **2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

### **2.3.1 Preparação do homogeneizado**

Depois de descongeladas, as amostras de brânquias e cérebro foram separadas, homogeneizadas em tampão fosfato (pH 7,0) e centrifugadas (13000 rpm) por 30 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado nas análises de atividades enzimáticas e na determinação de proteínas totais.

### **2.3.2 Proteína total**

O valor de Proteína Total dos tecidos foi determinado utilizando o método descrito por (Bradford, 1976). A proteína total foi calculada a partir da leitura da absorbância  $\lambda = 595$  nm, em um leitor de placa (Molecular Devices – Spectra Max 190). Essa análise foi utilizada a fim de compor os cálculos das enzimas que foram analisadas.

## **2.4 DOSAGEM ENZIMÁTICA NO TECIDO BRANQUIAL**

### **2.4.1 Glutathione S-transferase (GST; E.C. 2.5.1.18)**

A atividade da GST foi determinada utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância ( $\lambda = 340$  nm) em um leitor de placa (Molecular Device – Spectra Max 190). A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDBN (Habig et al., 1974; Habig e Jakoby, 1981). A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 nmol de produto por minuto por miligrama de proteína.

## **2.5 DOSAGEM ENZIMÁTICA NO TECIDO NERVOSO**

### **2.5.1 Acetilcolinesterase (AChE; E.C.3.1.1.7)**

A determinação da atividade da AChE no tecido nervoso (cérebro) foi realizada de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961), o qual utiliza tampão fosfato 100 mM e DTNB (reagente de cor) e iodeto de acetilcolina (meio de reação). Para isso, o tecido foi descongelado e homogeneizado em tampão fosfato 50 mM. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12900 rpm a 4° C e o sobrenadante foi utilizado para a realização dos ensaios enzimáticos. A atividade cinética da AChE foi calculada a partir da leitura da absorbância ( $\lambda = 415$  nm) em um leitor de placa (Molecular Devices).

## **2.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA**

### **2.6.1 Extração do RNA**

Amostras do fígado de *A. lacustris* foram retiradas para a obtenção do RNA. O RNA total foi extraído utilizando o kit Aurum™ Total RNA Mini Kit (BioRad, Hercules, EUA).

## 2.6.2 Quantificação da expressão gênica

A partir de sequências dos transcritos obtidos a partir do sequenciamento da biblioteca de cDNA do fígado de *A. lacustris*, oligonucleotídeos específicos para a análise de expressão gênica foram desenhados (Tabela 1) e utilizados para avaliar a expressão gênica por qPCR. O RNA total das amostras de fígado de *A. lacustris* foi utilizado para a síntese do cDNA utilizando o Kit iScript Reverse Transcription Kits (BioRad, Hercules, EUA). PCR quantitativa foi realizada utilizando o Kit iTaq universal SYBER Green (BioRad, Hercules, EUA) e o equipamento GFX96 (BioRad, Hercules, EUA). Os dados de expressão gênica foram analisados por meio do software CFX Maestro (BioRad, Hercules, EUA).

**Tabela 1.** Primer utilizado para análise de expressão diferencial da catalase

Gene	Sequência do primer (5' – 3')	Tamanho do Amplicon
Calatase	F - GTGATCGTGGACTGCCTGAT	151
	R – CTGCCTCCTCCACAGGAA	

## 2.7 Análises estatísticas

Para as análises dos dados foi realizada uma análise de variância (ANOVA) Two way seguida pelo pós-teste de *Tuckey* para múltiplas comparações. Diferenças estatísticas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média. Todas as análises estatísticas foram realizadas no SigmaPlot, versão 12.5.

## 3. RESULTADOS

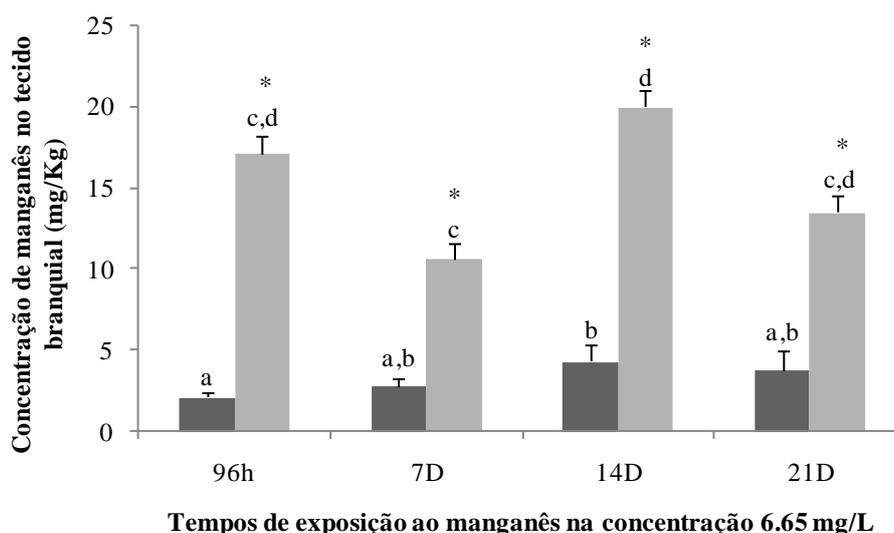
### 3.1 Quantificação de manganês na água

Durante a exposição de exemplares de *A. lacustris* ao manganês a concentração desse metal dissolvido na água dos aquários testes permaneceu em:  $6,64 \pm 1,02$  mg/L para a exposição de 96 h,  $7,3 \pm 0,65$  mg/L para o grupo exposto por 7 dias,  $6,74 \pm 0,8$  mg/L para o grupo exposto por 14 dias e  $6,00 \pm 0,22$  mg/L para o grupo exposto por 21 dias. Não sendo observadas diferenças estatísticas na concentração de manganês dos peixes submetidos aos diferentes tempos de exposição ( $p > 0,05$ ).

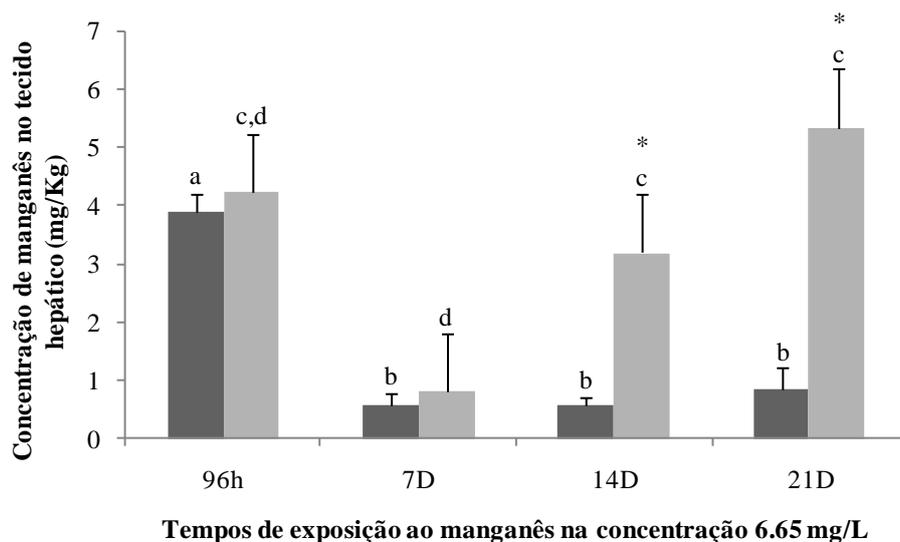
Nos aquários testes nos quais foram realizados os testes de  $C_T$  Max com a presença de manganês, a concentração do metal ao longo do período experimental se manteve em  $5,50 \pm 0,34$  mg/L.

### 3.2 Quantificação de manganês no tecido branquial e hepático

A concentração de manganês no tecido branquial aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) em todos os peixes expostos ao metal, em relação ao seu respectivo grupo controle, independentemente do tempo de exposição (Figura 1). Por outro lado, no tecido hepático a acumulação significativa de manganês ( $p < 0,05$ ) ocorreu apenas nos organismos expostos por 14 e 21 dias, quando comparados ao seu respectivo grupo controle (Figura 2). Esses mesmos grupos (14 e 21 dias) também apresentaram um aumento no acúmulo de manganês quando comparado ao grupo exposto por 7 dias ( $p < 0,05$ ), demonstrando que houve um acúmulo de Mn no tecido hepático ao longo do tempo de exposição.



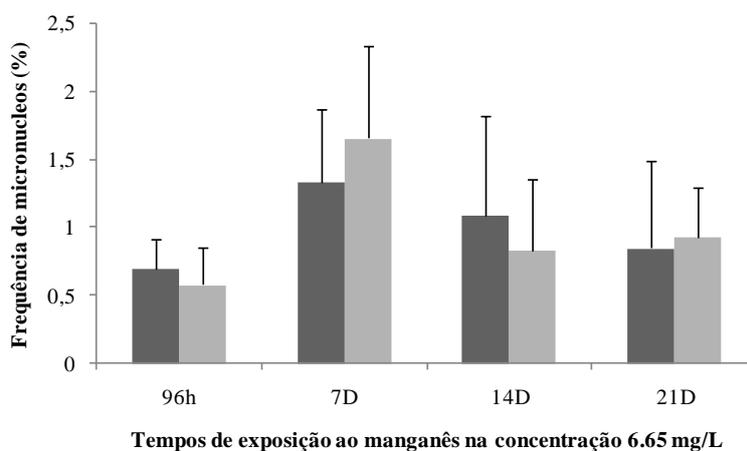
**Figura 1.** Acumulação de manganês no tecido branquial de exemplares de *Astyanax lacustris* expostos a diferentes tempos de exposição (96 h, 7, 14 e 21 dias). Coluna em preto indica o grupo controle, colunas em cinza indicam grupo exposto ao manganês. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA) ( $p < 0,05$ ). (\*) representa diferenças em relação ao seu respectivo grupo controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Acumulação de manganês no tecido hepático de exemplares de *Astyanax lacustris* expostos a diferentes tempos de exposição (96 h, 7, 14 e 21 dias). Coluna em preto indica o grupo controle, coluna em cinza indica grupo exposto ao manganês. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA) ( $p < 0,05$ ). (\*) representa diferenças em relação ao seu respectivo grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Teste do Micronúcleo

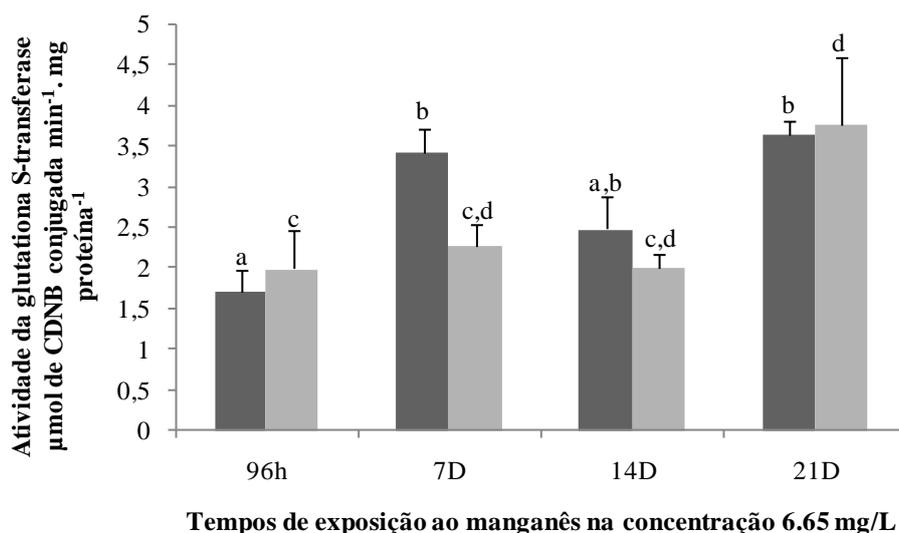
Os resultados obtidos por meio do Teste do MN demonstram que nos diferentes tempos de exposição (96 h, 7, 14 e 21 dias) a concentração de 6,65 mg/L de manganês não induziu um aumento significativo na frequência de eritrócitos micronucleados nos peixes da espécie *A. lacustris* ( $p > 0,05$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Frequência de eritrócitos micronucleados em exemplares de *Astyanax lacustris* expostos ao manganês (6,65 mg/L), em diferentes tempos de exposição (96h, 7, 14 e 21 dias (D)). Coluna em preto indica o grupo controle, coluna em cinza indica grupo exposto ao manganês.

### 3.4 Atividade enzimática da GST no tecido branquial

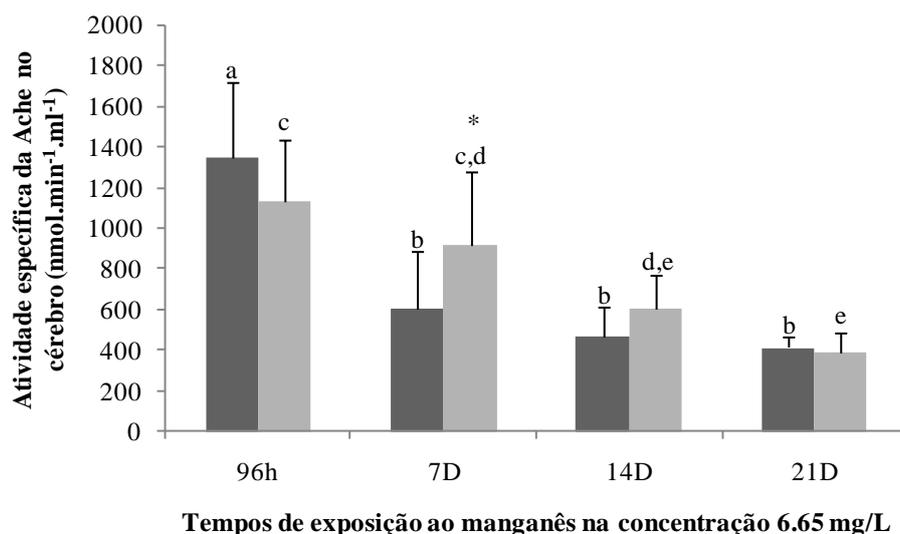
Os resultados obtidos para a atividade da GST no tecido branquial revelam que apenas o grupo exposto ao manganês por 96 h apresentou diferenças em relação ao grupo exposto ao manganês pelo tempo de 21 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 5). Nenhum outro grupo exposto ao manganês diferiu do seu grupo controle e nem dos demais grupos.



**Figura 5.** Atividade da glutatona S-transferase (GST) nas brânquias de exemplares de *Astyanax lacustris* expostos ao manganês (6,65 mg/L), em diferentes tempos de exposição (96h, 7, 14 e 21 dias (D)). Coluna em preto indica o grupo controle, coluna em cinza indica grupo exposto ao manganês. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA) ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Atividade enzimática da AChE no tecido nervoso

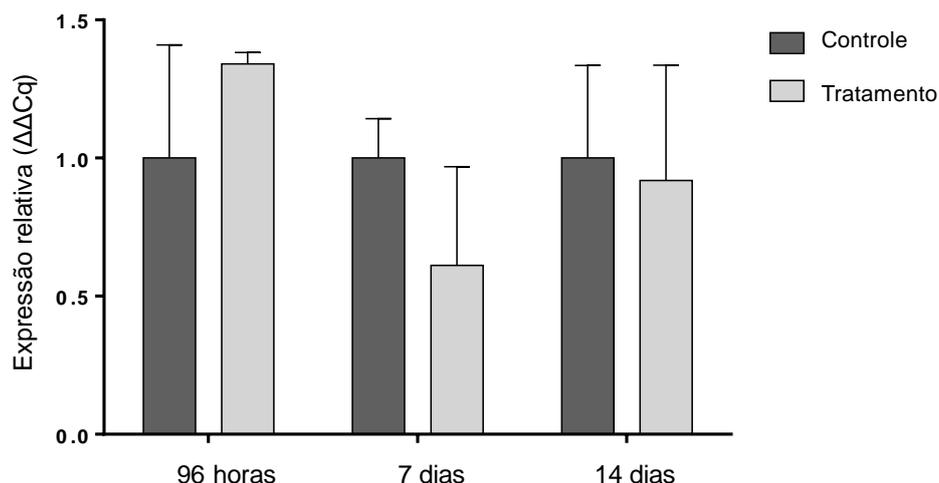
Quando avaliada a atividade específica da acetilcolinesterase pode-se notar que o grupo controle do tempo de 96 h apresenta diferenças dos demais grupos controle (7, 14 e 21 dias) ( $p < 0,05$ ). E que a atividade específica dessa enzima foi maior nos peixes expostos por 96 h quando comparado a 14 e 21 dias de exposição ao metal ( $p < 0,05$ ) (Figura 4). Além disso, nota-se que apenas no grupo exposto por 7 dias ao metal houve diferenças em relação ao seu grupo controle ( $p < 0,05$ ).



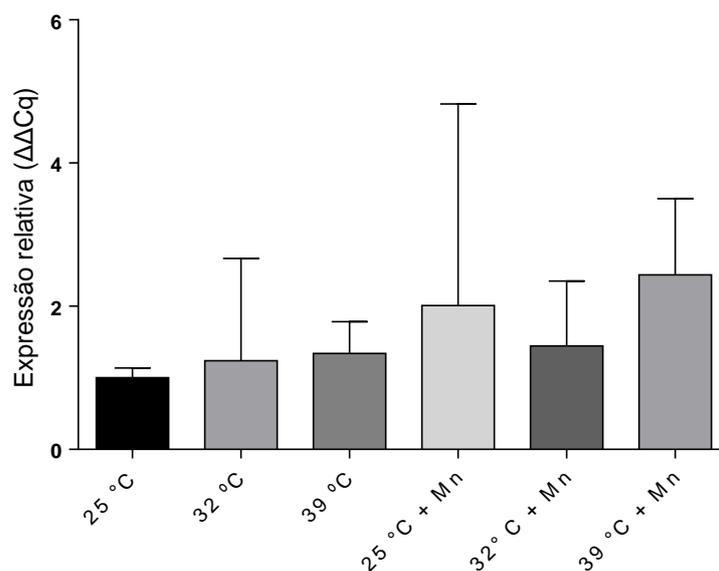
**Figura 4.** Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) no tecido nervoso de exemplares de *Astyanax lacustris* expostos ao manganês (6,65 mg/L), em diferentes tempos de exposição (96 h, 7, 14 e 21 dias (D)). Coluna em preto indica o grupo controle, coluna em cinza indica grupo exposto ao manganês. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA)( $p < 0,05$ ). (\*) representa diferenças em relação ao seu respectivo grupo controle( $p < 0,05$ ).

### 3.6 Quantificação da expressão gênica da catalase

Os resultados obtidos a partir da análise da expressão gênica revelaram que não houve diferenças na expressão da catalaseno fígadodos peixes submetidos aos diferentes tempos de exposição ao manganês (Figura 5), nem nos peixes submetidos aos dois testes de  $C_T$  Max ( $p > 0,05$ )(com e sem a presença de manganês) (Figura 6). Além disso,não foi possível realizar a quantificação da expressão gênica da catalase dos peixes expostos por 21 dias ao manganês, pois, houve um baixo rendimento do RNA nos tecidos coletados.



**Figura 5.** Análise da expressão gênica da Catalaseno tecido hepático de exemplares de *Astyanax lacustris* expostos a diferentes tempos de exposição ao manganês (6,65 mg/L) 96 h, 7, e 14 dias. Coluna em preto indica o controle, coluna em cinza indica grupo exposto ao manganês.



**Figura 6.** Análise da expressão gênica da catalase (CAT) no tecido hepático de exemplares de *Astyanax lacustris* expostos a dois diferentes testes de  $C_T$  Max: (i) elevação da temperatura de  $1 \pm 0,1$  °C por hora na temperatura da água; (ii) elevação da temperatura de  $1 \pm 0,1$  °C por hora na temperatura da água associado a presença de manganês (6,65 mg/L). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). (\*) representa diferenças em relação ao seu respectivo grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.7 Determinação da C<sub>T</sub> Max

A C<sub>T</sub> Max encontrada para os dois testes, sem Mn e com Mn, foi de 39 °C. Nesta temperatura observou-se que 50 % dos exemplares de *A. lacustris* perderam o equilíbrio, não havendo diferenças quando o Mn foi adicionado a água do aquário teste.

## 4. Discussão

Após expor exemplares de *A. lacustris* ao manganês em diferentes tempos de exposição pode-se observar um aumento na quantidade desse metal, tanto no tecido branquial como no tecido hepático. A presença de 6,65 mg/L de Mn na água não chegou a causar danos genotóxicos significativos nesses peixes e alterações nas atividades das enzimas GST e AChE foram identificadas em apenas alguns tempos de exposição. A expressão gênica da CAT também não foi alterada. E por fim a C<sub>T</sub> Max encontrada foi a mesma (39°C) para os lambaris expostos ou não ao Mn.

Nos seres vivos a acumulação dos poluentes nos diferentes tecidos corporais ocorre quando a taxa de absorção é superior à taxa de eliminação desses compostos (Cebrian, et al., 1992). No presente trabalho, observou-se que os lambaris expostos ao manganês apresentaram um incremento na concentração desse metal no tecido branquial em relação aos diferentes grupos controles ( $p < 0,05$ ). Isso foi observado visto que as brânquias são estruturas que atuam como uma primeira barreira de contato com os poluentes do ecossistema aquático. Isso se deve à sua grande superfície e também ao fato de estar em contato direto com a água (Mazon et al., 2002), fazendo com que o metal se acumule mais facilmente nessa estrutura, quando comparado ao tecido hepático. A acumulação de metais nas brânquias dos peixes foi relatada em outros trabalhos, como o desenvolvido por Queiroz et al. (2019), que ao exporem exemplares da espécie *Geophagus brasiliensis* ao cádmio (0,01; 0,07; e 0,67 mg/L) por 14 dias, também observaram uma maior acumulação do metal no tecido branquial quando comparado a outros tecidos avaliados. Gabriel et al. (2013) ao exporem juvenis da espécie *Colossoma macropomum* ao Mn (3,88 mg/L), por 96 h, também constataram um maior acúmulo no tecido branquial quando comparado ao tecido hepático,

corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Estudos relacionados aos impactos da acumulação de metais nas brânquias são importantes, pois elas atuam nos processos de respiração, equilíbrio iônico e equilíbrio ácido-base (Souza et al., 2013) e podem indicar o quanto esse organismo será prejudicado em situações de exposição a esse tipo de substância.

No presente estudo foi observado o acúmulo de manganês no tecido hepático apenas nos peixes expostos por 14 e 21 dias, em relação ao seu respectivo grupo controle. Indicando que em exposições subcrônicas ao Mn na concentração de 6,65 mg/L, mesmo sendo considerado essencial, esse composto consegue ultrapassar a primeira barreira de proteção contra os poluentes (brânquias) ocasionando a sua acumulação no fígado dos organismos. A acumulação desses poluentes nos peixes pode refletir as concentrações do contaminante que são encontradas nos diferentes compartimentos do ecossistema, como a água, assim como podem refletir o tempo de exposição no qual o organismo foi exposto ao xenobiótico (Rajeshkumar and Li, 2018). No trabalho realizado por Marins et al. (2019) peixes da espécie *Danio rerio* foram expostos ao Fe (0,8 e 1,3 mg/L), Mn (0,2 e 0,4 mg / L) e águas coletadas de poços profundos contendo Fe e Mn (Fe 0,8 / Mn 0,2 mg/L e Fe 1,3 / Mn 0,4 mg/L) por 30 dias. Nele pode-se observar que houve a acumulação desses metais no tecido hepático dos organismos, e a alteração de diferentes biomarcadores indicando que exposições de longo prazo a esses contaminantes, podem ser tóxicas aos organismos dessa espécie. A acumulação nesse órgão tende a ocorrer, pois os metais têm a capacidade de se ligarem a polipeptídeos específicos chamados metalotioneínas presentes no tecido hepático (Marins et al., 2019) e é no fígado que ocorrem os processos de biotransformação de xenobióticos (Souza et al., 2013). Esse acúmulo de Mn nos tempos de 14 e 21 dias no fígado dos exemplares de lambari indicam que essa exposição prolongada pode causar prejuízos à saúde desses organismos.

A exposição de organismos à contaminantes pode estimular a formação de micronúcleos, devido a segregação anormal do material genético no momento da divisão celular (Araldi et al., 2015b). No entanto, no presente estudo não foi

observado efeito significativo do Mn na frequência de eritrócitos micronucleados nos exemplares *A. lacustris* ao longo do tempo de exposição. Com isso podemos sugerir que a concentração do contaminante na água não foi suficiente para causar danos ao DNA desses indivíduos, ou que as amostras podem ter sido coletadas em uma etapa do ciclo celular no qual ainda não havia ocorrido a formação dos micronúcleos, visto que a taxa mitótica dos eritrócitos dos peixes é considerada pequena (Belpaeme et al., 1996). Outra possível explicação está relacionada à remoção das células apoptóticas pelo mecanismo de reparo celular, fazendo com que não ocorresse a alteração significativa da frequência de eritrócitos micronucleados nos diferentes tempos de exposição ao Mn. Entretanto, é necessário que haja uma avaliação dos impactos desse mesmo contaminante em indivíduos de espécies diferentes, ou até mesmo, que outros testes de genotoxicidade sejam utilizados para avaliar os efeitos desse metal nos peixes. Visto que existem variações no perfil de genotoxicidade entre as espécies, ou seja, esses elementos podem promover diferentes respostas genotóxicas mediante a presença de contaminantes no ecossistema aquático, conforme relatado por Grisolia et al. (2009). Por exemplo, Tuzuki et al. (2017) observaram incremento na frequência dos eritrócitos micronucleados na espécie *Centropomus parallelus* expostos ao manganês ( $3,18 \text{ mg L}^{-1}$ ), por 96 horas, em duas temperaturas diferentes (24 e 27 °C). Valbona et al. (2018) também observaram um incremento na frequência de eritrócitos micronucleados em *Carassius auratus* após exposição ao Mn (3,88 e 7,52 mg/L) de forma aguda (96 h). Por outro lado, o trabalho desenvolvido por Hariri et al. (2018) avaliou o impacto genotóxico do rio Karaj em *Salmo trutta fario* avaliando a frequência de micronúcleos em diversos tecidos como rim, fígado, sangue e brânquia. Nele foi possível constatar que houve diferenças significativas apenas no rim dos indivíduos coletados. Belpaeme et al. (1996) expuseram exemplares de *Salmo trutta fario* por 3, 9 e 14 dias ao bifenilo policlorado (PCB) (780 e 918 pg/ml), e observaram que não houve um aumento na frequência de células micronucleadas, sugerindo que a taxa mitótica dos eritrócitos e o mecanismo de reparo celular podem ter contribuído para esse resultado, assim como pode ter ocorrido no presente trabalho.

A atividade da GST no tecido branquial foi utilizada como biomarcadora para avaliar se os diferentes tempos de exposição ativariam o sistema de detoxificação em *A. lacustris*, visto que a presença de metais no ecossistema aquático pode ocasionar alterações na atividade das enzimas de biotransformação, como a GST. Isto porque esses componentes são capazes de gerar EROS (espécies reativas ao oxigênio), que ativam as enzimas do sistema de defesa antioxidante (Javed et al., 2015). Entretanto, no presente estudo poucas alterações significativas foram observadas na atividade enzimática da GST ocasionadas pela exposição ao Mn. Sugerindo que a eliminação desse metal nas brânquias dos peixes pode ter ocorrido por outra via de detoxificação, fazendo que não ocorresse a ativação dessa enzima e sim de outras enzimas que fazem parte do sistema de defesa antioxidante. Outra possível explicação para os resultados obtidos, é que não houve a formação de EROS (espécies reativas de oxigênio) suficiente para que ocorresse a ativação do sistema antioxidante das brânquias. Ou até mesmo, que a eliminação desse metal pode ter ocorrido no fígado, que é uma estrutura de extrema importância na metabolização de compostos tóxicos inclusive metais (Awasthi et al., 2018b). Coppo et al. (2018) também observaram que a ativação da GST não ocorreu no tecido branquial de exemplares de *Oreochromis niloticus* expostos ao Mn (0,2; 1,5 e 2,9 mg/L). Entretanto, observaram incremento da atividade dessa mesma enzima no tecido hepático dos animais, o que pode ter ocorrido no presente estudo, entretanto a análise dessa enzima nessa estrutura não foi possível ser realizada no presente trabalho pois ela foi utilizada nas análises moleculares, em virtude do seu pequeno tamanho nos peixes amostrados.

Quando avaliada a atividade enzimática da AChE no cérebro, pode-se observar que apenas os peixes submetidos a 7 dias de exposição ao manganês apresentaram um aumento da atividade dessa enzima em relação ao seu grupo controle ( $p < 0,05$ ). Esse incremento da atividade da AChE foi observado no trabalho desenvolvido por De Lima et al. (2013), ao exporem peixes da espécie *Danio rerio* a diferentes metais, dentre eles o cobre (0,06 mg/L) no qual foi observado um incremento da atividade da AChE, sugerindo que a presença desse metal, durante os 7 dias de exposição, pode ter impedido a ligação da acetilcolina ao seu receptor, causando um aumento na

concentração da AChE para que ocorresse a degradação do excesso do neurotransmissor. Esse mesmo incremento na atividade enzimática da AChE foi observado no cérebro e no músculo esquelético de peixes da espécie *Barbus conchoni* expostos ao cádmio (12,6 mg/L), por 48 h (Gill et al., 1990). Bainy et al. (2006) também observaram um incremento na atividade enzimática da AChE em mexilhões expostos ao chumbo por 12 horas e ao cádmio por 72 horas. A AChE pertence ao grupo da serina esterases (Araújo et al., 2016) e é responsável pela hidrólise da acetilcolina (Ach), ela pode ser encontrada nos glóbulos vermelhos, no sistema nervoso central e no músculo esquelético (De Lima et al., 2013). É devido à sua resposta mediante a exposição aos poluentes que a AChE vem sendo utilizada como biomarcadora em estudos ecotoxicológicos (Al-Ghais, 2013; Araújo et al., 2016; Haverroth et al., 2015; Nunes et al., 2014; Richetti et al., 2011), sendo investigada em diversas espécies de peixes como *Danio rerio* (Haverroth et al., 2015; Marinho et al., 2019), *Parachromis managuensis* (Araújo et al., 2016), *Gambusia holbrooki* (Nunes et al., 2014), *Cnesterodon decemmaculatus* (Menéndez-Helman et al., 2015) e *Channa punctatus* (Kumar et al., 2009). Esses estudos foram conduzidos com a finalidade de avaliar o potencial tóxico de diversos compostos presentes no ambiente, e a sua potencial capacidade em afetar as funções neurais dos indivíduos (Menéndez-Helman et al., 2015). No presente trabalho, a atividade da AChE não se comportou da mesma forma nos demais tempos de exposição (7 e 14 dias), talvez o tempo de exposição possa ter interferido no comportamento da interação do Mn com o receptor da acetilcolina, fazendo que não fossem observadas diferenças na atividade específica dessa enzima. De acordo com Kaizer et al. (2005) as alterações na atividade enzimática da AChE ocorrem devido à interação alostérica entre o cátion e o sítio aniônico periférico da enzima, o que pode não ter ocorrido durante esses tempos de exposição no presente estudo.

Os resultados também demonstram que a exposição dos exemplares de *A. lacustris* aos diferentes tempos de exposição ao manganês e nos testes de C<sub>T</sub> Max não causaram modulação da expressão gênica da catalase. Indicando que não houve a ativação da via metabólica dessa enzima no tecido hepático nesses peixes. Apesar de o fígado ser considerado um importante órgão de

detoxificação de compostos tóxicos (Awasthi et al., 2018b; Gabriel et al., 2013), sabe-se que a superóxido dismutase (SOD), juntamente com a catalase, constituem a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROS)(Gabriel et al., 2013; Sellathurai et al., 2019), que podem ser formadas quando compostos potencialmente tóxicos estão presentes na água(Palermo et al., 2015). Logo, o fato da expressão gênica da CAT não ter sido alterada em ambos os experimentos pode ser explicado pela ativação de outra via de detoxificação ou até mesmo a ativação de outra enzima pertencente ao mesmo sistema de defesa antioxidante, além disso, pode não ter ocorrido um aumento significativo nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos compartimentos celulares, ao ponto de causar alterações na expressão gênica dessa enzima.Outra possível explicação, é que a expressão dessa enzima pode ter apresentado alterações em outros tecidos que não foram avaliados no presente estudo.

Com a realização dos testes de C<sub>T</sub> Max, pode-se observar que, o ponto térmico da perda de equilíbrio de 50 % dos peixes foi o mesmo em ambos os experimentos (39°C). Ou seja, resultado contrário do que era esperado, pois, sabe-se que a elevação da temperatura pode aumentar a ingestão, a toxicidade (Jacquin et al., 2019) e alterar a concentração letal mínima dos poluentes causando uma redução no tempo de sobrevivência dos organismos expostos a eles(Cairns et al., 1975). Na literatura é relatado o aumento da toxicidade dos metais mediante o aumento da temperatura da água (Peter et al., 2016; Pinheiro et al., 2019; Rao and Khan, 2000). O estudo realizado por Dale Becker e Wolford (1980) investigou a resistência térmica da espécie *Oncorhynchus kisutch* exposta ao níquel. Para a realização desse estudo foi utilizado o teste de temperatura crítica máxima (CT Max), no qual a temperatura foi elevada em uma taxa de 6 °C/h. Neste trabalho foi observado que a exposição a 1,5 mg/L do metal suprimiu significativamente a tolerância térmica do peixe, entretanto, a exposição por 28 dias a 0,9 mg/L de níquel não, não foi capaz de causar o mesmo efeito. Esse estudo sugere que como a exposição subletal ao níquel a resistência dos peixes a altas temperaturas diminuiu. Talvez, pelo fato do Mn ser um elemento essencial no organismo, ele não provoque efeitos muito danosos quando em concentrações não muito

elevadas. Embora tenha ocorrido um acúmulo de Mn nas brânquias e no fígado, essas concentrações acumuladas não foram o suficiente para causarem danos intensos aos exemplares de *A. lacustris*, visto que não foram observadas alterações na expressão gênica da CAT e tão pouca presença de danos genotóxicos e alterações expressivas nas enzimas estudadas.

## **5. Conclusão**

Os resultados do presente estudo sugerem que em condições ambientais naturais peixes da espécie *A. lacustris* podem acumular Mn no tecido hepático, em exposições superiores há 14 dias, e no tecido branquial em exposições de curto prazo (96 h). Apesar de ter ocorrido o acúmulo do metal nessas estruturas, não foram observadas alterações nos biomarcadores genotóxicos, moleculares e na atividade enzimática da GST. Tão pouco foram observadas alterações na  $C_T$  Max dos peixes e nem na expressão gênica da Catalase, quando o manganês foi adicionado na água (6,65 mg/L) do teste. Sugerindo que existe a necessidade de avaliar os efeitos causados por essa mesma concentração de manganês por meio de outros biomarcadores moleculares, genotóxicos e bioquímicos que sejam complementares, ou seja, que são capazes de demonstrar se os efeitos do manganês foram manifestados em outras vias. Isso também explicaria o fato de que dos diferentes tempos de exposição a esse elemento também não produziram respostas que pudessem ser avaliadas pelos biomarcadores utilizados no presente estudo. Entretanto, apesar da concentração utilizada no presente estudo não ter provocado alterações em todos os biomarcadores, diversos estudos demonstram que dependendo das concentrações que esse elemento é encontrado no ecossistema ele pode oferecer riscos ambientais aos seres vivos. E para fazer a avaliação desses danos é imprescindível a utilização de um conjunto de biomarcadores para fornecer uma informação mais precisa dos efeitos tóxicos do manganês.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aebi H, (1984) Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105(2):121-26.

- Abdalla, R.P., Kida, B.M.S., Pinheiro, J.P.S., Oliveira, L.F., Martinez, C.B.F., Moreira, R.G., 2019. Exposure to aluminum , aluminum + manganese and acid pH triggers di ff erent antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* ( Teleostei : Characiformes : Characidae ) males. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 215, 33–40. doi:10.1016/j.cbpc.2018.09.004
- Ahmed, K.M., Baki, M.A., Kundu, G.K., Saiful Islam, M., Monirul Islam, M., Muzammel Hossain, M., 2016. Human health risks from heavy metals in fish of Buriganga river, Bangladesh. *Springerplus* 5. doi:10.1186/s40064-016-3357-0
- Al-Ghais, S.M., 2013. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 74, 183–186. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.07.005
- Alonso, M.B., Carvalho, D.R. De, Alves, C.B.M., Moreira, M.Z., Pompeu, P.S., 2019. Changes in trophic characteristics of two fish species of *Astyanax* ( Teleostei : Characidae ) in response to aquatic pollution. *Zoologia* 36, 1–12.
- Araldi, R.P., de Melo, T.C., Mendes, T.B., de Sá Júnior, P., Nozima, B.H.N., Ito, E.T., de Carvalho, R.F., de Souza, E.B., de Cassia Stocco, R., 2015a. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed. Pharmacother.* 72, 74–82. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.004
- Araldi, R.P., Melo, D., Biude, T., Heidi, B., Nozima, N., Tiemi, E., Sa, P.L. De, Franco, R., Carvalho, D., Barreiros, E., Souza, D., Cassia, R. De, 2015b. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies : A review 72, 74–82. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.004
- Araújo, M.C. de, Assis, C.R.D., Silva, L.C., Machado, D.C., Silva, K.C.C., Lima, A.V.A., Carvalho, L.B., Bezerra, R. de S., Oliveira, M.B.M. de, 2016. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. *Aquat. Toxicol.* 177, 182–189.

doi:10.1016/j.aquatox.2016.05.019

Awasthi, Y., Ratn, A., Prasad, R., Kumar, M., Trivedi, S.P., 2018a. An in vivo analysis of Cr6+induced biochemical, genotoxicological and transcriptional profiling of genes related to oxidative stress, DNA damage and apoptosis in liver of fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Aquat. Toxicol.* 200, 158–167. doi:10.1016/j.aquatox.2018.05.001

Awasthi, Y., Ratn, A., Prasad, R., Kumar, M., Trivedi, S.P., 2018b. An in vivo analysis of Cr6+ induced biochemical, genotoxicological and transcriptional profiling of genes related to oxidative stress, DNA damage and apoptosis in liver of fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Aquat. Toxicol.* 200, 158–167. doi:10.1016/j.aquatox.2018.05.001

Bainy, A.C.D., Medeiros, M.H.G., Mascio, P. Di, Almeida, E.A. De, 2006. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. *Biotemas* 19, 35–39.

Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Boussetta, H., Viarengo, A., 2014. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 160, 23–29. doi:10.1016/j.cbpc.2013.11.005

Becker, C.D., Genoway, R.G., 1979. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Env. Biol. Fish* 4, 245–256. doi:10.1007/BF00005481

Beitinger, T.L., Bennett, W. a, 1999. Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environ. Biol. Fishes* 58, 277–288.

Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L., Kirsch-Volders, M., 1996. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 11, 485–492. doi:10.1093/mutage/11.5.485

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brown, C.J., Barlow, J.R.B., Cravotta, C.A., Lindsey, B.D., 2018. Factors affecting the occurrence of lead and manganese in untreated drinking water from Atlantic and Gulf Coastal Plain aquifers, eastern United States—Dissolved oxygen and pH framework for evaluating risk of elevated concentrations. *Appl. Geochemistry*. doi:10.1016/J.APGEOCHEM.2018.10.017
- Cairns, J., Heath, A., Parker, B., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47, 135–171.
- Canalejo, A., Torronteras, R., Co, F., 2012. Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 212–217. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.11.015
- Choi, C.Y., An, K.W., Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2007. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 145, 595–600. doi:10.1016/j.cbpc.2007.02.007
- Coppo, G.C., Passos, L.S., Lopes, T.O.M., Pereira, T.M., Merçon, J., Cabral, D.S., Barbosa, B.V., Caetano, L.S., Kampke, E.H., Chippari-Gomes, A.R., 2018. Genotoxic, biochemical and bioconcentration effects of manganese on *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Ecotoxicology* 27, 1150–1160. doi:10.1007/s10646-018-1970-0
- Couturier, C.S., Stecyk, J.A.W., Rummer, J.L., Munday, P.L., Nilsson, Go.E., 2013. Species-specific effects of near-future CO<sub>2</sub> on the respiratory performance of two tropical prey fish and their predator. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 166, 482–489. doi:10.1016/j.cbpa.2013.07.025
- Dale Becker, C., Wolford, M.G., 1980. Thermal resistance of juvenile salmonids

- sublethally exposed to nickel, determined by the critical thermal maximum method. *Environ. Pollution. Ser. A, Ecol. Biol.* 21, 181–189. doi:10.1016/0143-1471(80)90162-2
- De Lima, D., Roque, G.M., De Almeida, E.A., 2013. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Environ. Res.* 91, 45–51. doi:10.1016/j.marenvres.2012.11.005
- Delunardo, F.A.C., Carvalho, L.R. de, Silva, B.F. da, Galão, M., Val, A.L., Chippari-Gomes, A.R., 2015. Seahorse (*Hippocampus reidi*) as a bioindicator of crude oil exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 117, 28–33. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.03.016
- Dennis, C.E., Kates, D.F., Noatch, M.R., Suski, C.D., 2014a. Molecular responses of fishes to elevated carbon dioxide. *Comp. Biochem. Physiol. - Part A Mol. Integr. Physiol.* 187, 224–231. doi:10.1016/j.cbpa.2014.05.013
- Dennis, C.E., Kates, D.F., Noatch, M.R., Suski, C.D., 2014b. Molecular responses of fishes to elevated carbon dioxide. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 187, 224–231. doi:10.1016/j.cbpa.2014.05.013
- Eme, J., Bennett, W.A., 2009. Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from Sulawesi, Indonesia. *J. Therm. Biol.* 34, 220–225. doi:10.1016/j.jtherbio.2009.02.005
- Fatima, M., Usmani, N., Firdaus, F., Zafeer, M.F., Ahmad, S., Akhtar, K., Dawar Husain, S.M., Ahmad, M.H., Anis, E., Mobarak Hossain, M., 2015. In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 176–177, 17–30. doi:10.1016/j.cbpc.2015.07.004
- Gabriel, D., Paula, A., Isabela, K.R., Etiane, A.F., Llesuy, S.F., 2013. Effects of Subchronic Manganese Chloride Exposure on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Tissues : Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. *Arch Env. Contam Toxicol.* doi:10.1007/s00244-012-9854-4

- Garcia, L.D.O., Okamoto, M.H., Riffel, A.P.K., Saccol, E.M., Pavanato, M. a., Sampaio, L.A.N., 2015. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. Neotrop. Ichthyol. 00–00. doi:10.1590/1982-0224-20140148
- Geszvain, K., Butterfield, C., Davis, R.E., Madison, A.S., Lee, S.-W., Parker, D.L., Soldatova, A., Spiro, T.G., Luther, G.W., Tebo, B.M., 2012. The molecular biogeochemistry of manganese(II) oxidation. Biochem. Soc. Trans. 40, 1244–1248. doi:10.1042/BST20120229
- Gilmour, K.M., 2001. The CO<sub>2</sub>/pH ventilatory drive in fish. Comp. Biochem. Physiol. Part A 219–240.
- Hariri, M., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Taghavi, L., Shahabinia, A.R., 2018. In situ assessment of Karaj River genotoxic impact with the alkaline comet assay and micronucleus test, on feral brown trout (*Salmo trutta fario*). Environ. Toxicol. Pharmacol. 58, 59–69. doi:10.1016/j.etap.2017.12.024
- Haverroth, G.M.B., Welang, C., Mocelin, R.N., Postay, D., Bertoncello, K.T., Francescon, F., Rosemberg, D.B., Dal Magro, J., Dalla Corte, C.L., 2015. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 122, 440–447. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.09.012
- Heinrich, P., Braunbeck, T., 2018. Genetically engineered zebrafish liver (ZF-L) cells as an in vitro source for zebrafish acetylcholinesterase (zfAChE) for the use in AChE inhibition assays. Toxicol. Vitro. 52, 52–59. doi:10.1016/j.tiv.2018.06.003
- Iwasaki, Y., Ormerod, S.J., 2012. Estimating safe concentrations of trace metals from inter-continental field data on river macroinvertebrates. Environ. Pollut. 166, 182–186. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.028
- Jacquín, L., Gandar, A., Aguirre-Smith, M., Perrault, A., Hénaff, M. Le, Jong, L. De, Paris-Palacios, S., Laffaille, P., Jean, S., 2019. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. Ecotoxicol. Environ. Saf.

172, 255–264. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.01.085

- Javed, M., Usmani, N., Ahmad, I., Ahmad, M., 2015. Studies on the oxidative stress and gill histopathology in *Channa punctatus* of the canal receiving heavy metal-loaded effluent of Kasimpur Thermal Power Plant. Environ. Monit. Assess. 187. doi:10.1007/s10661-014-4179-6
- Johnson, J.L., Cusack, B., Davies, M.P., Fauq, A., Rosenberry, T.L., 2003. Unmasking tandem site interaction in human acetylcholinesterase. Substrate activation with a cationic acetanilide substrate. Biochemistry 42, 5438–5452. doi:10.1021/bi027065u
- Kaizer, R.R., Corrêa, M.C., Spanevello, R.M., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Gonçalves, J.F., Schetinger, M.R.C., 2005. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. J. Inorg. Biochem. 99, 1865–1870. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.06.015
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. Mar. Pollut. Bull. 40, 780–791. doi:10.1016/S0025-326X(00)00069-2
- Kumar, A., Rai, D.K., Sharma, B., Pandey, R.S., 2009.  $\lambda$ -cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). Pestic. Biochem. Physiol. 93, 96–99. doi:10.1016/j.pestbp.2008.12.005
- Kumar, G., Denslow, N.D., 2015. Gene Expression Profiling in Fish Toxicology: A Review. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 240, 77. doi:10.1007/398
- Li, G., Xie, P., Fu, J., Hao, L., Xiong, Q., Li, H., 2008. Microcystin-induced variations in transcription of GSTs in an omnivorous freshwater fish, goldfish. Aquat. Toxicol. 88, 75–80. doi:10.1016/j.aquatox.2008.03.007
- Liu, H., He, J., Zhao, R., Chi, C., Bao, Y., 2015. A novel biomarker for marine environmental pollution of pi-class glutathione S-transferase from *Mytilus coruscus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 118, 47–54.

doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.012

Lopes, D.F.C., Assis, C.R.D. de, Sant'Anna, M.C.S. de, Silva, J.F. da, Bezerra, R. de S., Frédou, F.L., 2019. Brain acetylcholinesterase of three perciformes: From the characterization to the *in vitro* effect of metal ions and pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 173, 494–503. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.02.047

Malandrakis, E.E., Exadactylos, A., Dadali, O., Golomazou, E., Klaoudatos, S., Panagiotaki, P., 2014. Molecular cloning of four glutathione peroxidase (GPx) homologs and expression analysis during stress exposure of the marine teleost *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 168, 53–61. doi:10.1016/j.cbpb.2013.11.005

Mansour, S.A., Sidky, M.M., 2002. Ecotoxicological studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. *Food Chem.* 78, 15–22. doi:10.1016/S0308-8146(01)00197-2

Marinho, C.S., Matias, M.V.F., Brandão, I.G.F., Santos, E.L., Machado, S.S., Zanta, C.L.P.S., 2019. Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 222, 11–18. doi:10.1016/j.cbpc.2019.04.005

Marins, K., Lazzarotto, L.M.V., Boschetti, G., Bertoncetto, K.T., Sachett, A., Schindler, M.S.Z., Chitolina, R., Regginato, A., Zanatta, A.P., Siebel, A.M., Magro, J.D., Zanatta, L., 2019. Iron and manganese present in underground water promote biochemical, genotoxic, and behavioral alterations in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-019-05621-0

Martin, S.A.M., Dehler, C.E., Król, E., 2016. Transcriptomic responses in the fish intestine. *Dev. Comp. Immunol.* 1–15. doi:10.1016/j.dci.2016.03.014

Mazon, A.F., Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.* 88, 52–63. doi:10.1006/enrs.2001.4315

Menéndez-Helman, R.J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M., Salibián, A.,

2015. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 236–241. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.10.017
- Molina-villalba, I., Lacasaña, M., Rodríguez-barranco, M., Hernández, A.F., Gonzalez-alzaga, B., Aguilar-garduño, C., Gil, F., 2015. Chemosphere Biomonitoring of arsenic , cadmium , lead , manganese and mercury in urine and hair of children living near mining and industrial areas. *Chemosphere* 124, 83–91. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.016
- Nunes, B., Barbosa, A.R., Antunes, S.C., Gonçalves, F., 2014. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: Effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 6258–6262. doi:10.1007/s11356-014-2584-6
- Omar, W. a., Zaghloul, K.H., Abdel-Khalek, A. a., Abo-Hegab, S., 2012. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 746, 7–14. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.01.013
- Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 19–28. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.02.032
- Peter, Y., Louis, G.C.C., Patrice, B., 2016. Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. *Aquat. Toxicol.* doi:10.1016/j.aquatox.2016.06.008
- Pinheiro, J.P.S., Assis, C.B. de, Muñoz-Peñuela, M., Barbosa Júnior, F., Correia, T.G., Moreira, R.G., 2019. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). *Chemosphere* 220, 266–274. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.143

- Prabhu, A.J., Silva, M.S., Kröeckel, S., Holme, M.H., Ørnsrud, R., Amlund, H., Lock, E.J., Waagbø, R., 2019. Effect of levels and sources of dietary manganese on growth and mineral composition of post-smolt Atlantic salmon fed low fish meal, plant-based ingredient diets. *Aquaculture* 512, 734287. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734287
- Queiroz, E.C., da Silva, B.F., Salla, R.V., Ramos, J.P.L., Gnocchi, K.G., Chippari-Gomes, A.R., 2019. Genotoxic Damages and Bioaccumulation of Cadmium in *Geophagus Brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 181–185. doi:10.1007/s00128-018-2524-0
- Rajeshkumar, S., Li, X., 2018. Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Toxicol. Reports* 5, 288–295. doi:10.1016/j.toxrep.2018.01.007
- Rao, D.G.V.P., Khan, M.A.Q., 2000. Zebra Mussels: Enhancement of Copper Toxicity by High Temperature and Its Relationship with Respiration and Metabolism. *Water Environ. Res.* 72, 175–178. doi:10.2175/106143000X137257
- Richetti, S.K., Rosemberg, D.B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J.M., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2011. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* 32, 116–122. doi:10.1016/j.neuro.2010.11.001
- Rocha-Santos, C., Bastos, F.F., Dantas, R.F., Hauser-Davis, R.A., Rodrigues, L.C., Cunha Bastos, V.L.F., Cunha Bastos, J., 2018. Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in blood and liver from a hypoxia-tolerant fish under oxygen deprivation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 163, 604–611. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.06.089
- Russo, C., Rocco, L., Morescalchi, M.A., Stingo, V., 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 168–174. doi:10.1016/S0147-6513(03)00027-7
- Santos, D., Batoreu, M.C., Aschner, M., Marreilha dos Santos, A.P., 2012.

- Effect of manganese on acetylcholinesterase activity. *Toxicology* 298, 61–62. doi:10.1016/j.tox.2012.04.008
- Sellathurai, S., Priyathilaka, T.T., Lee, J., 2019. Molecular cloning, characterization, and expression level analysis of a marine teleost homolog of catalase from big belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*). *Fish Shellfish Immunol.* 89, 647–659. doi:10.1016/j.fsi.2019.03.064
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B., 2013. Physiological effects of gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*(Characiformes: Prochilodontidae). *Neotrop. Ichthyol.* 11, 683–691. doi:10.1590/S1679-62252013000300022
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology* 20, 1400–1410. doi:10.1007/s10646-011-0697-y
- Siscar, R., Koenig, S., Torreblanca, A., Solé, M., 2014. The role of metallothionein and selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean Sea. *Sci. Total Environ.* 466–467, 898–905. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.081
- Souza, I.C., Duarte, I.D., Pimentel, N.Q., Rocha, L.D., Morozesk, M., Bonomo, M.M., Azevedo, V.C., Pereira, C.D.S., Monferrán, M. V., Milanez, C.R.D., Matsumoto, S.T., Wunderlin, D. a., Fernandes, M.N., 2013. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environ. Pollut.* 180, 136–144. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.017
- Stevanato, D.J., Ostrensky, A., 2018. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes : Characidae). *Neotrop. Ichthyol.* 16, 1–10. doi:10.1590/1982-0224-20170073
- Suárez, Y.R., Silva, E.A., Viana, L.F., 2017a. Reproductive biology of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) in the southern Pantanal floodplain, upper Paraguay River basin, Brazil. *Environ. Biol. Fishes* 100, 775–783.

doi:10.1007/s10641-017-0604-3

- Suárez, Y.R., Silva, E.A., Viana, L.F., 2017b. Reproductive biology of *Astyanax lacustris* (Characiformes : Characidae) in the southern Pantanal floodplain, upper Paraguay River basin, Brazil. *Env. Biol. Fish.* doi:10.1007/s10641-017-0604-3
- Tuzuki, B.L.L., Delunardo, F.A.C., Ribeiro, L.N., Melo, C.P. De, Gomes, L.C., Chippari-gomes, A.R., 2017. Effects of manganese on fat snook *Centropomus parallelus* (Carangaria : Centropomidae) exposed to different temperatures. *Neotrop. Ichthyol.* 15, 1–10. doi:10.1590/1982-0224-20170054
- Valbona, A., Mihallaq, Q., Eldores, S., Valon, M., Caterina, F., 2018. AC SC. *Fish Shellfish Immunol.* doi:10.1016/j.fsi.2018.02.042
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Velusamy, a., Satheesh Kumar, P., Ram, A., Chinnadurai, S., 2014. Bioaccumulation of heavy metals in commercially important marine fishes from Mumbai Harbor, India. *Mar. Pollut. Bull.* 81, 218–224. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.01.049
- Vergauwen, L., Hagenars, A., Blust, R., Knapen, D., 2013. Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: Evidence from transcript expression to physiology. *Aquat. Toxicol.* 126, 52–62. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.028
- Voigt, C.L., da Silva, C.P., Doria, H.B., Randi, M.A.F., de Oliveira Ribeiro, C.A., de Campos, S.X., 2015. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8242–8252. doi:10.1007/s11356-014-3967-4
- Walther, G., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J., I, O.H., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389–395.

- Wang, X., Qu, R., Huang, Q., Wei, Z., Wang, Z., 2015. Hepatic oxidative stress and catalyst metals accumulation in goldfish exposed to carbon nanotubes under different pH levels. *Aquat. Toxicol.* 160, 142–50. doi:10.1016/j.aquatox.2015.01.015
- Winkaler, E.U., Santos, T.R.M., Machado-Neto, J.G., Martinez, C.B.R., 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145, 236–244. doi:10.1016/j.cbpc.2006.12.009
- Zhao, X., Wang, X., Liu, B., Xie, G., Xing, D., 2018. Characterization of manganese oxidation by *Brevibacillus* at different ecological conditions. *Chemosphere* 205, 553–558. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.04.130

## CONCLUSÃO GERAL

As descobertas que foram feitas com a realização da presente tese demonstram que o transcriptoma de *A. lacustris* nos fornece importantes informações a respeito de uma biblioteca de cDNA para estudos ecotoxicológicos, e possibilitou a utilização da catalase como marcador molecular nesse trabalho. Além disso, os resultados obtidos no capítulo 2, após a exposição dos peixes ao manganês (3,33, 6,65 e 13,33 mg/L) por 96 h, indicam que, apesar desse metal ser considerado essencial aos seres vivos, ele pode ser acumulado no fígado e nas brânquias e também causar alterações na atividade específica da acetilcolinesterase no tecido nervoso, sendo assim importante poluente em estudos de risco ambiental. Essa mesma acumulação nesses tecidos pode ser observada quando esses indivíduos foram submetidos a diferentes tempos de exposição (96 h, 7, 14 e 21 dias) ao manganês por 96 h. Também pode-se observar com o teste de CT Max que a elevação da temperatura não foi capaz de promover a redução da termo tolerância dos peixes expostos ao metal. Logo, os resultados sugerem que a espécie *A. lacustris*, mediante todas as suas características e todas as respostas apresentadas por ela no presente estudo, pode ser utilizada como bioindicadora dos efeitos tóxicos do manganês. Entretanto, é necessário que sejam realizados estudos complementares utilizando multimarcadores para que seja realizada uma avaliação mais aprofundada sobre os efeitos desse metal nessa espécie, bem como para avaliar o tempo de exposição em que esse elemento pode causar alterações significativas em diferentes biomarcadores.