



[Ictiologia Neotropical](#)

Versão impressa ISSN 1679-6225 Versão on-line ISSN 1982-0224

Neotrop. ictiol. vol.15 no.4 Maringá 2017 Epub 18 de dez de 2017

<http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20170054>

ARTIGOS

Efeitos do manganês no robalo-tico *Centropomus parallelus* (Carangaria: Centropomidae) exposto a diferentes temperaturas

Bárbara Louise L. Tuzuki [1](#)

Frederico Augusto C. Delunardo [1](#)

Luciana N. Ribeiro [1](#)

Caroliny P. de Melo [1](#)

Levy Carvalho Gomes [1](#)

Adriana Regina Chippari-Gomes [1](#)

¹ Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB PEIXE), Universidade Vila Velha - UVV, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21 anos, Boa Vista, 29102-770 Vila Velha, ES, Brasil. (BLLT) barbara.tuzuki@hotmail.com, (FACD) frederico.delunardo@gmail.com, (LNR) luciana.bio@live.com, (CPM) carol.patriciomelo@gmail.com, (LCG) levy.gomes@uvv.br, (ARCG) adriana.chippari@uvv.br (autor correspondente)

Serviços sob demanda

Diário

- SciELO Analytics
- Google Acadêmico H5M5 (2017)

Artigo

- texto nova página (beta)
- Inglês (pdf)
- Inglês (epdf)
- Artigo no formato xml
- Referências de artigos
- Como citar este artigo
- SciELO Analytics
- Currículo ScienTI
- Tradução automática

Indicadores

Links Relacionados

Compartilhar

- Mais
- Mais
- Permalink

ABSTRATO

Este estudo avalia os efeitos da exposição ao manganês (Mn^{2+}) por 96 horas a duas temperaturas diferentes (24 e 27 ° C) em juvenis de *Centropomus parallelus* através das atividades de glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT), teste de micronúcleos (MN) e ensaio cometa. A atividade de GST não mostrou diferença significativa entre os grupos expostos a Mn^{2+} e os respectivos grupos controle; em contraste, um aumento importante na atividade de CAT foi observado a 27 ° C no grupo exposto a Mn^{2+} comparado ao grupo controle. As análises genotóxicas mostraram que em todos os animais expostos a Mn^{2+} , o número de hemácias com micronúcleos aumentou significativamente em relação aos respectivos grupos controle. Houve também um aumento significativo na incidência de danos no DNA nos grupos expostos ao Mn^{2+} . A uma temperatura de 24°C, os animais expostos ao Mn^{2+} tiveram mais danos no DNA do que aqueles a 27 ° C. É provável que o aumento da temperatura também possa induzir estresse oxidativo. Assim, concluímos que o manganês é tóxico para juvenis de robalo, causando dano genotóxico e, quando associado a um aumento na temperatura, o manganês também pode provocar um aumento do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Biomarcadores; Dano ao DNA; Enzimas; Genotoxicidade; Metal; Micronúcleos

RESUMO

Este Estudo avaliou OS Efeitos da Exposição manganês AO (Mn^{2+}), apos 96 horas, uma Duas temperaturas (24 e 27 ° C) em juvenis de *Centropomus parallelus* POR Meio de Análises bioquímicas (Atividade das Enzimas glutaciona S-transferase (GST) e catalase (CAT) e e genotóxicas (teste do micronúcleo e ensaio cometa). A GST de Mn^{2+} foi criada em 27° no grupo exposto ao Mn^{2+} , quando foram ao grupo controle. As análises genotípicas são expostas ao Mn^{2+} sofreu aumento significativo na quantidade de células com micronúcleo em relação aos seus grupos de controles. ----- O DNA também é um DNA significativo nos DNA expostos a esse contaminante. Na temperatura de 24 ° C, os animais expostos ao Mn^{2+} não apresentaram maior relação de DNA em relação a 27 ° C. É provável que o aumento da temperatura possa ser capaz de induzir o estresse oxidativo. Assim, conclui-se que o manganês é tóxico para os juvenis de robalo, genévios danos genotóxicos, e quando associado a um aumento da temperatura, também pode provocar um aumento no estresse oxidativo.

Palavras-chave: Biomarcadores; Danos sem DNA; Enzimas; Genotoxicidade; Metal; Micronúcleo

INTRODUÇÃO

A mudança climática global é um dos desafios críticos que podem afetar a saúde do ecossistema e a segurança química. Os atuais aumentos na temperatura da superfície do mar são considerados como uma das novas e significativas ameaças aos ecossistemas aquáticos ([Daufresne et al., 2009](#) ; [IPCC, 2013](#)). A temperatura da água, por si só, pode atuar como um estressor, uma vez que os organismos marinhos que habitam esses ambientes são principalmente ectotérmicos; como resultado, a temperatura afeta a taxa metabólica, afetando o metabolismo energético e induzindo várias mudanças fisiológicas ([Fales, Brown, 1993](#) ; [Caissie, 2006](#) ; [Vergauwen et al., 2013](#)). Além disso, muitos ambientes aquáticos são afetados pela liberação de contaminantes humanos, resultando em aumento das concentrações de metais ([Gomiero, Viarengo, 2014](#)). Esses fatos podem levar a graves prejuízos aos organismos aquáticos, porque o aumento da temperatura da água pode modificar a química de muitos poluentes ([Schiedek et al., 2007](#)). Esses fatos também podem levar a aumentos na biodisponibilidade de poluentes no ambiente e, conseqüentemente, nas taxas de absorção de metais e sua toxicidade ([Bervoets et al., 1996](#) ; [Vergauwen et al., 2013](#) ; [Lee et al., 2014](#)).

O manganês (Mn^{2+}) é um elemento constitutivo de uma série de enzimas e cofatores essenciais que são fundamentais para a função cerebral, como a glutamina sintetase, superóxido dismutase e outros ([Yokel, 2009](#)), mas pode ser muito tóxico em concentrações acima da média. nível de limiar ótimo ([Vieira et al., 2012](#)). Em águas naturais, manganês dissolvido de fontes antrópicas / influências associadas à mineração de metais e outras atividades industriais podem atingir concentrações muito altas ([McNeely et al., 1979](#) ; [Morillo, Usero, 2008](#)). Recentemente, a bacia do rio Doce (Minas Gerais, Brasil) sofreu um grave impacto ambiental após a ruptura de duas barragens controladas por uma empresa de mineração ([Escobar, 2015](#)), e uma quantidade significativa de metal foi liberada no corpo de água; notadamente, Mn^{2+} foi um dos metais que apresentou maiores concentrações.

Os efeitos deletérios da exposição crônica ou aguda ao Mn^{2+} dependem da espécie e de uma espécie, dependendo da química do tecido e da água do ambiente ([Fish, 2009](#) ; [Arndt et al., 2012](#)). Numerosos estudos mostraram que os efeitos do manganês nos peixes incluem funções prejudicadas do epitélio branquial, como desequilíbrio hidromineral ([Gonzalez et al., 1990](#)) e histopatologia das brânquias ([Dalzell, Macfarlane, 1999](#) ; [Hedayati et al., 2015](#) ; [Dolci et al., 2017](#)). Impactos na hematologia ([Agrawal, Srivastava, 1980](#) ; [Wepener et al., 1992](#)), imunomodulação ([Cossarini-Dunier et al., 1988](#) ; [Hernroth et al., 2004](#)) e interferência hormonal ([Hoseini et al., 2004](#)) também podem ocorrer. Outros danos no sistema metabólico também foram observados, como impactos no metabolismo dos carboidratos ([Nath, Kumar, 1987](#) ; [Barnhoorn et al., 1999](#) ; [Partridge, Lymbery, 2009](#)) e alterações no sistema antioxidante ([Falfushynska et al., 2011](#) ; [Vieira et al., 2012](#) ; [Dolci et al., 2013](#) ; [Gabriel et al., 2013](#)). No entanto, o uso de parâmetros bioquímicos e genotóxicos para entender a interação entre a temperatura da água e a exposição ao manganês em peixes ainda não foi investigado.

Os testes bioquímicos mais utilizados em estudos de peixes são ensaios de enzimas hepáticas envolvidas na desintoxicação de xenobióticos e seus respectivos metabólitos, como as enzimas glutaciona S-transferase (GST) e catalase (CAT) ([Teles et al., 2005](#)). ; [Halliwell, Gutteridge, 2006](#)). As GST são enzimas de fase II que desempenham um papel importante nas reações de conjugação e mecanismos de desintoxicação, reduzindo os hidroperóxidos

orgânicos (ROOH). Os compostos lipofílicos hidrolisados com GST são subsequentemente excretados como um conjugado não reativo solúvel em água ([Simonato et al., 2011](#) ; [Azevedo et al., 2013](#)). A catalase é uma enzima essencial que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, impedindo sua conversão para radicais hidroxila e reduzindo os níveis de estresse oxidativo ([Gonçalves-Soares et al., 2012](#)). A catalase é geralmente regulada por sistemas complexos e interligados, sensíveis à concentração de seus substratos ([Lushchak, 2011](#)). Assim, essas enzimas freqüentemente mostram aumento de atividades quando a produção de ânions superóxido e peróxido aumentam até certo nível ([McCord, Fridovich, 1969](#) ; [Beutler, 1975](#) ; [Lushchak, 2011](#)).

Dentre os testes de genotoxicidade disponíveis, o teste do cometa alcalino e o teste de micronúcleos (MN) são os mais comumente usados e reconhecidos devido à sua robustez, sensibilidade e poder estatístico na avaliação das lesões do DNA. Assim, essas análises podem ser consideradas biomarcadores complementares de danos ao DNA baseados em dois desfechos diferentes ([Tice et al., 2000](#) ; [Udroiu, 2006](#) ; [Heuser et al., 2008](#)). O teste MN é um método rápido de detectar alterações cromossômicas estruturais e numéricas induzidas por agentes clastogênicos e aneugênicos ([Heddle et al., 1991](#) ; [Jha, 2008](#)). Por outro lado, o ensaio cometa mede as quebras das cordas antes que os sistemas de reparo de DNA intervenham; estes podem incluir quebras de cadeia simples e dupla de DNA, locais lábeis em álcalis e eventos de reparo de excisão causados por adutos de DNA simples e volumosos ([Singh et al., 1988](#) ; [Tice et al., 2000](#)).

O robalo-robalo (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) pode habitar águas costeiras, estuários e ambientes de água doce ([Cerqueira, Tsuzuki, 2009](#)) que são comumente caracterizados por alta pressão antropogênica, incluindo a ocorrência de contaminação por metais. Além disso, como o robalo é uma espécie ectotérmica, sua suscetibilidade à toxicidade do metal pode ser modificada pela elevação da temperatura da água através de mudanças nas taxas de processos bioquímicos e fisiológicos e da estabilidade de suas biomoléculas ([Heugens et al., 2001](#) ; [Lannig et al., 2006](#)).

Assim, realizamos bioensaios térmicos de curta duração (96 h) para investigar os efeitos de diferentes temperaturas (24 e 27 °C) sobre a toxicidade de manganês em *C. parallelus*. Para isso, analisamos as respostas à enzima de biotransformação de fase II glutationa S-transferase (GST), a enzima antioxidante catalase (CAT) e análises genotóxicas (ou seja, ensaio de cometa alcalina e teste de micronúcleos).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e aclimação. O robalo, juvenis de *C. parallelus* (Comprovante # MBML 12877) foram obtidos de um incubatório e transferidos para o laboratório. Para a aclimação à temperatura, 72 peixes ($2,46 \pm 0,54$ ge $7,12 \pm 0,52$ cm) foram igualmente divididos em dois tanques limpos (300 L; densidade de peixes = $0,3 \text{ g L}^{-1}$) com temperaturas da água de 24 °C (condições semelhantes da água do mar) ou 27 °C (aumento de aproximadamente 2,5 °C na temperatura da água, conforme concebido pelo cenário moderado de emissões do Painel Intergovernamental sobre as Alterações Climáticas (IPCC)). A temperatura da água foi gradualmente aumentada em $1,0 \pm 0,1$ °C / dia usando um aquecedor acoplado a um termostato (Full Gauge, TIC-17RGT). Os tanques foram preenchidos com água do mar aerada que foi filtrada biologicamente e apresentou um fotoperíodo de 12:12 h (claro: escuro). Durante o período de aclimação (três semanas), os peixes foram alimentados diariamente para saciar com ração comercial de peixe que foi composta por pellets de 1,2 mm com 60% de proteína (NRD INVE, Bélgica) e a água do mar foi substituída duas vezes por semana pela água do mar. mesma temperatura. A alimentação foi suspensa 24 horas antes dos animais serem transferidos para os aquários de teste. Os parâmetros físico-químicos foram monitorados diariamente usando um multiparâmetro YSI (modelo 85, Yellow Springs Inc., Ohio, Estados Unidos). Os parâmetros de qualidade da água para tanques com água a 24°C e 27°C foram: temperatura ($24,2 \pm 0,3$ e $27,1 \pm 0,2$ °C, respectivamente), oxigênio dissolvido ($5,8 \pm 0,5$ e $6,0 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente), salinidade ($25,4 \pm 0,1$ e $25,3 \pm 0,1$ ppt, respectivamente) e condutividade ($25,4 \pm 0,1$ e $25,3 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente). O pH ($8,1 \pm 0,1$ e $8,1 \pm 0,1$, respectivamente) foi monitorizado com um medidor de pH YSI 100 (Yellow Springs Inc., OH, USA). A amônia total ($0,63 \pm 0,3$ e $0,63 \pm 0,4$, respectivamente) e os nitritos totais ($0,3 \pm 0,4$ e $0,3 \pm 0,3$, respectivamente) foram monitorados de acordo com as [diretrizes da APHA \(2005\)](#)).

Teste de toxicidade a curto prazo. Após a aclimação, grupos de seis peixes foram transferidos para 12 aquários de polietileno contendo 20 L de água do mar (densidade de peixes = $0,75 \text{ g L}^{-1}$; salinidade = 32) sob aeração constante e temperatura controlada por um aquecedor acoplado a um termostato digital (0,1 Precisão °C). Os peixes foram mantidos sob as respectivas temperaturas a que estavam acostumados (isto é, $24,2 \pm 0,3$ °C e $27,1 \pm 0,2$ °C). Para cada temperatura, os grupos de peixes foram divididos em dois tratamentos: i) controle (sem adição de contaminantes) ou ii) expostos a uma concentração nominal de manganês ($3,18 \text{ mg L}^{-1}$ ou $26,426 \text{ nM Mn}^{2+}$ como $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), e o experimento durou 96 horas. Um total de quatro tratamentos

foram conduzidos (*ou seja* , as duas temperaturas versus as duas concentrações de Mn^{2+}) (três repetições para cada tratamento; 18 peixes por tratamento). Após contaminação, a concentração de Mn^{2+} dissolvido foi medida na água de todos os aquários no início do experimento, e os valores médios foram de $2,269 \text{ mg L}^{-1}$ (grupo tratamento) e $0,00 \text{ mg L}^{-1}$ (grupo controle). Valores de $0,00$ foram considerados como grupo controle, uma vez que as medidas de Mn^{2+} neste grupo estavam abaixo do limite de quantificação de EAA. Os tratamentos de manganês foram escolhidos de acordo com estudos prévios conduzidos com *Lithobates catesbeianus* ([Veronez et al., 2016](#)). Durante o experimento, um terço da água (da temperatura e nível de contaminante apropriados) foi renovado após 48 h. Nenhuma mortalidade foi observada durante o experimento. Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Vila Velha (CEUA-UUVV), número 198-2011.

Amostragem de material biológico. Imediatamente após a retirada do peixe do aquário, foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), e amostras de sangue foram retiradas da veia caudal com seringas heparinizadas; Amostras de sangue foram utilizadas no ensaio cometa alcalino e no teste de micronúcleos (MN). Em seguida, os animais foram pesados, medidos e eutanasiados por seccionamento cervical. Um fragmento do fado de cada animal foi removido e armazenado a -80 atas anises enzimicas.

Ensaio enzimáticos. Os ensaios da atividade da enzima biotransformadora glutathione S-transferase (GST - EC 2.5.1.18) e da enzima antioxidante catalase (CAT - EC 1.11.1.6) foram realizados de acordo com protocolos bem estabelecidos. Inicialmente, as amostras de fígado congeladas foram pesadas e homogeneizadas (1: 4 - p / v) em tampão Tris 20 mM (pH 7,4) com sacarose 0,5 mM, KCl 0,15 mM e inibidor de protease 1 mM (PMSF). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g durante 20 min a 4 e os ensaios de enzima foram corridos num espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices). A atividade da GST foi determinada utilizando uma solução tampão de fosfato (pH 7,0) contendo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB; 1 mM) e glutathione (GSH; 1 mM) como substrato. A atividade enzimática foi determinada com base no coeficiente de extinção do CDNB ([Habig et al., 1974](#) ; [Habig, Jakoby, 1981](#)). A atividade da catalase foi determinada pela avaliação contínua da diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ([Aebi, 1984](#)). O meio reacional foi preparado com uma solução tampão (1 M Tris HCl e 5 mM EDTA) contendo peróxido de hidrogênio (10 mM). Os resultados são apresentados como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$. A quantificação da proteína de todas as amostras foi determinada em temperatura ambiente controlada (25°C), segundo [Lowry et al. \(1951\)](#).

Ensaio cometa alcalino. As amostras de sangue foram diluídas 1: 120 (v / v) em meio RPMI 1640 (RPMI-Roswell Park Memorial Institute) e utilizadas imediatamente. O ensaio do cometa alcalino foi realizado como descrito por [Tice et al. \(2000\)](#) e [Andrade et al. \(2004\)](#), com algumas modificações. Resumidamente, 5 μl de cada amostra de sangue diluída foram adicionados a 95 μl de 0,75% (p / v) de agarose fundida de baixo ponto de fusão, e uma alíquota da mistura foi espalhada em uma lâmina de microscópio que foi pré-revestida com 1,5% (w / v) agarose ponto de fusão normal e coberto com uma lamela. Depois da solidificação com agarose, as lamelas foram removidas e as linhas foram imersas numa solução de lise (NaCl a 2,5 M, EDTA a 100 mM e Tris a 10 mM, pH 10,0-10,5) contendo Triton X-100 a 1% e DMSO a 20%. As lâminas foram mantidas nesta solução de lise (4°C) e mantidas no escuro por 2-3 h. As linhas foram então incubadas numa solução tampão alcalina preparada de fresco (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH 13) durante 20 min para o desenrolamento do ADN. Eletroforese (15 min a 300 mA e 25 V) foi realizada usando a mesma solução tampão. Cada passo foi realizado sob luz amarela indireta. Após eletroforese, as lâminas foram neutralizadas numa solução Tris (400 mM; pH 7,5), lavadas três vezes com água destilada e secas durante a noite à temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas por 10 min em ácido tricloroacético (15% p / v), sulfato de zinco (5% p / v) e glicerol (5% v / v) e, em seguida, lavadas três vezes com água destilada e secas a 37°C por 2 h. As linhas secas foram reidratadas durante 5 min em água destilada e coradas sob agitação constante durante 35 min utilizando uma solução contendo carbonato de sódio (5% p / v), nitrato de amônio (0,1% p / v), nitrato de prata (0,1% p / v), ácido tungstosilícico (0,25%) e formaldeído (0,15% p / v), que foi preparado de fresco no escuro. As lâminas coradas foram lavadas duas vezes com água destilada, submersas na solução de paragem (ácido acético a 1%), enxaguadas novamente com água destilada, e imediatamente codificado para análise. Um total de 100 células de cada réplica (*isto é*, 50 de cada slide duplicado) foram analisados aleatoriamente em um microscópio óptico (ampliação de 100x) para medir o comprimento da cauda do cometa. A análise das lâminas envolveu 100 células / peixe usando uma classificação visual baseada no grau de migração do fragmento de DNA do núcleo. As células foram classificadas em classe 0 (sem dano), classe 1 (pouco dano - quando o comprimento da cauda era menor que o núcleo), classe 2 (dano médio - quando o comprimento da cauda era entre 1 e 2 vezes o diâmetro do núcleo). 3 (dano extenso - quando o comprimento da cauda era mais de 2 vezes o diâmetro do núcleo) e classe 4 (presença de apoptose) ([Kobayashi et al., 1995](#) ; [Speit, Hartmann, 1999](#)). O índice de dano ao DNA (DI) foi calculado para cada peixe como a soma do número de nucleóides que foram observados para cada classe de dano multiplicado pelo valor de sua respectiva classe de dano (0, 1, 2, 3 ou 4). Os resultados foram expressos como o índice médio de dano ao DNA para cada grupo experimental, onde 0 representou a ausência de dano e 400 indicaram o maior escore de dano.

Frequência de micronúcleos (MN). Amostras de sangue periférico foram obtidas da veia caudal e untadas em lâminas limpas. As lâminas foram secas ao ar após fixação em etanol puro por 20 min, e os esfregaços foram corados com solução de Giemsa a 10% por 25 min. Cada MN foi identificado de acordo com os seguintes critérios: inclusões citoplasmáticas esféricas com um contorno agudo, um diâmetro menor que um terço do diâmetro do núcleo, uma cor e textura parecida com o núcleo, e nenhum contato com o núcleo ([Al-Sabti, Metcalfe, 1995](#) ; [Kirsch-Volders et al., 2003](#)). Um total de 2000 eritrócitos por peixe foram examinados sob um microscópio óptico Olympus (aumento de 1000 ×), e as frequências médias dos MN encontrados em cada grupo experimental foram calculadas e expressas por 1000 células (‰). Apenas as células intactas com membranas nucleares e celulares distintas foram pontuadas.

Análise estatística. Os dados do teste de toxicidade aguda foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade através do teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA two-way para determinar diferenças significativas na exposição a Mn^{2+} , temperaturas e a interação entre estes dois fatores, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações post hoc. Todos os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), e as diferenças foram consideradas significativas em $p \geq 0,05$. O software GraphPad Prisma 5.0 foi utilizado para análises estatísticas.

RESULTADOS

Atividades enzimáticas. A actividade de GST enzima biotransformação não mostraram qualquer alteração significativa como um resultado dos tratamentos de stress de calor ($P = 0,905$; $F = 0,01$) e Mn^{2+} exposição ([Fig. 1](#) um; $P = 0,178$; $F = 1,85$). Além disso, não houve nenhuma interacção significativa entre os dois factores (de temperatura e de Mn^{2+}) ([Fig. 1](#) um; $P = 0,7611$; $M = 0,09$).

Para a actividade da enzima antioxidante CAT, a temperatura não afetou a actividade desta enzima ($P = 0,1154$; $F = 2,55$), e a actividade da CAT não foi afetada pela exposição ao Mn a 24 ° C ([Fig. 1](#) b; $P = 0,1246$; $F = 2,42$). No entanto, a 27 ° C, a actividade enzimática do CAT foi significativamente maior no snook de gordura exposto ao Mn^{2+} em relação ao respectivo controle ([Fig. 1](#) b; $P = 0,0034$; $F = 4,67$).

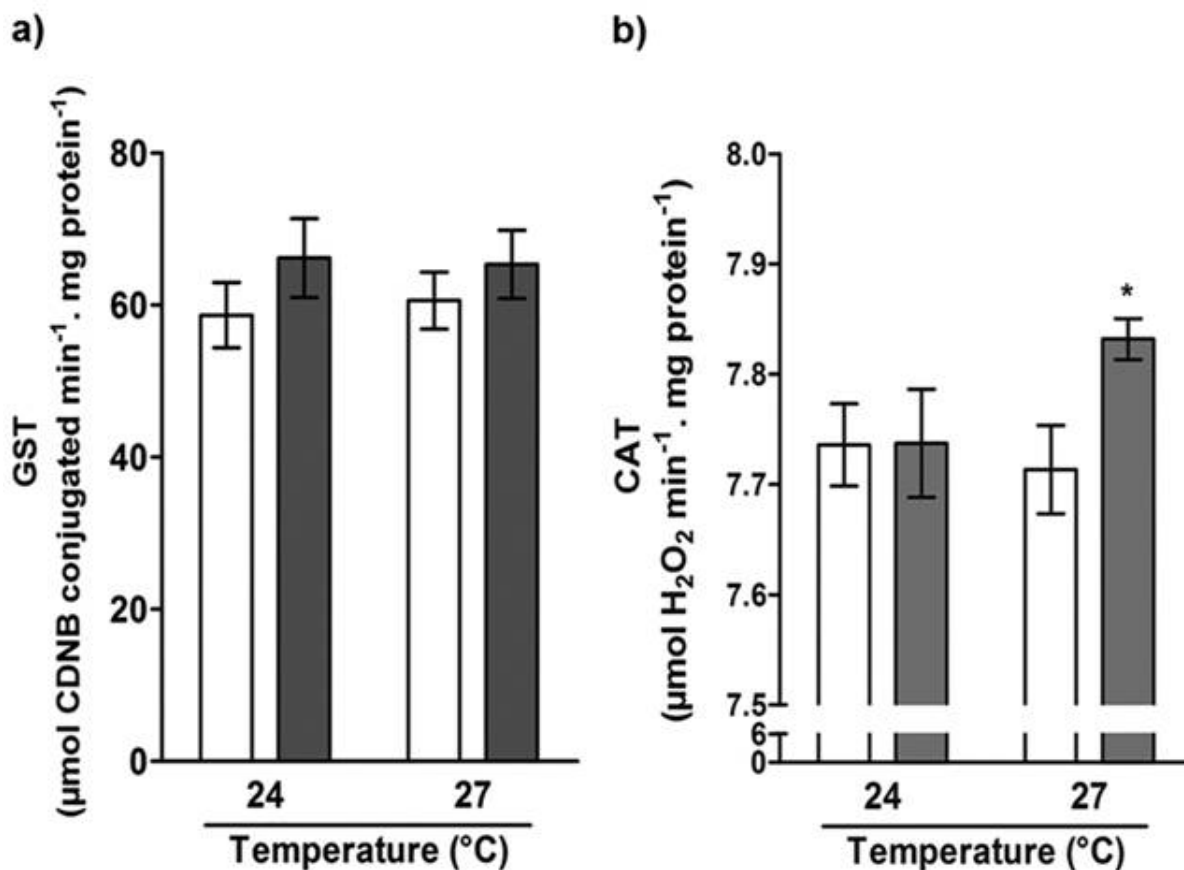


Fig. 1 Atividades de glutatona S-transferase (GST) (**a**) e catalase (CAT) (**b**) no fígado de *Centropomus parallelus* , após 96 h de exposição ao manganês (Mn^{2+}) (barras cinza) em duas temperaturas diferentes, e seus respectivos grupos de controle (barras brancas). Valores representam as médias \pm erro padrão. Cada tratamento foi realizado em triplicado ($n = 6$ por aquário).

Ensaio cometa. O resultado do dano ou fragmentação do DNA, medido como o índice de dano (DI), demonstrou que Mn^{2+} provocou danos no DNA em ambas as temperaturas em comparação com o respectivo grupo controle ([Fig. 2a](#) ; $P < 0,0001$; $F = 56,06$). O aumento de temperatura de 24 a 27 ° C, por si só, não interferiu nos resultados, uma vez que os grupos controle foram semelhantes. No entanto, houve uma interação significativa entre os dois fatores, Mn^{2+} e temperatura ([Fig. 2 a](#); $P = 0,0435$; $F = 4,24$). A 27°C, foi observado que houve uma diminuição na quantidade de danos no DNA causados pela exposição ao Mn^{2+} em comparação com o grupo aclimatado a 24 ° C.

Teste de micronúcleos (MN). O robalo-grosso exposto ao Mn^{2+} apresentou aumento significativo na frequência de micronúcleos nos eritrócitos do robalo aclimatado em duas temperaturas ([Fig. 2b](#); $P < 0,0001$; $F = 48,61$) quando comparados aos respectivos grupos controle. Além disso, observou-se que houve interação significativa entre os dois fatores, Mn^{2+} e temperatura ([Fig. 2 b](#); $P = 0,0073$; $F = 7,64$), pois os peixes aclimataram a 27 ° C e expuseram ao Mn^{2+} apresentou mais micronúcleos em relação aos peixes aclimatados a 24 ° C e expostos ao Mn^{2+} .

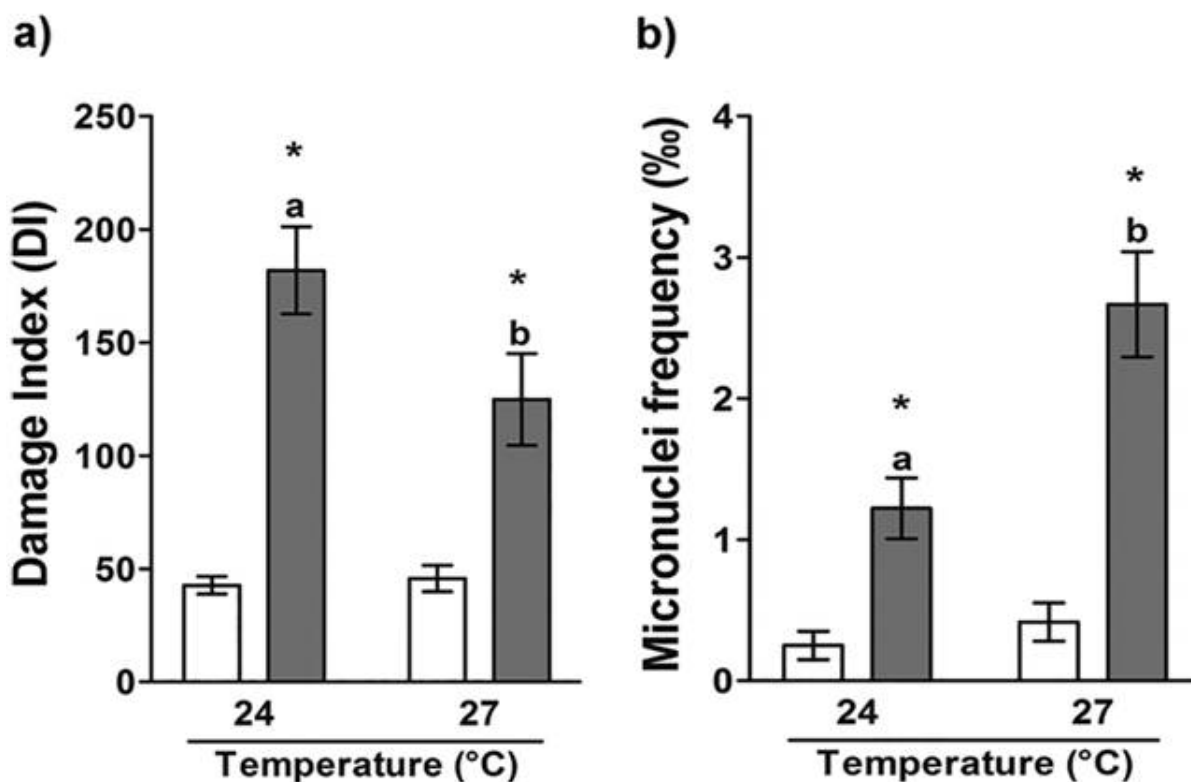


Fig. 2 Índice de dano (DI) (**a**) e frequência de micronúcleos (**b**) nos eritrócitos de *Centropomus parallelus* , após 96 h de exposição ao manganês (Mn^{2+}) (barras cinzas) em duas temperaturas diferentes, e seus respectivos grupos de controle (barras brancas). Valores representam as médias \pm erro padrão. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos de temperatura, asteriscos marcados (*) indicam diferenças significativas ($p \geq 0,05$) em relação aos controles. Cada tratamento foi realizado em triplicado ($n = 6$ por aquário).

DISCUSSÃO

No presente estudo, a interação entre a exposição a curto prazo a uma concentração subletal de Mn^{2+} e um aumento na temperatura da água não afetou a atividade da GST. Algumas mudanças de GST eram esperadas em peixes expostos a Mn^{2+} , já que o GST desempenha um papel significativo no metabolismo, atuando na desintoxicação de alguns compostos eletrofílicos, e alterações nas atividades dessa enzima refletem diretamente distúrbios metabólicos e danos celulares em órgãos específicos de peixes. ([Carvalho-Neta, Abreu-Silva, 2013](#)); no entanto, esta resposta não foi verificada neste estudo. Os presentes resultados podem indicar que o metabolismo de Mn^{2+} ocorre por outra via de biotransformação. Em vez disso, as respostas bioquímicas da biotransformação encontradas neste estudo estão de acordo com as investigações anteriores de estresse térmico por outros autores. Esses estudos relataram que os níveis de enzimas antioxidantes dependentes de GSH, como a glutatona peroxidase (GPx), a glutatona redutase (GR) e a glutatona S-transferase (GST), nos diferentes tecidos de *Carassius auratus* (a 3 e 23 ° C) ([Bagnyukova et al., 2007](#)), *Morone saxatilis* (a 7 e 25 ° C) ([Grim et al., 2013](#)) e *Notothenia coriiceps* (a 0 e 8 ° C) ([Machado et al., 2014](#)) foram levemente afetados por o aumento da temperatura.

Por outro lado, o tratamento a 27 ° C resultou numa estimulação da actividade de CAT, que não foi observada a 24 ° C; É possível que a combinação do aumento da temperatura e da exposição ao Mn^{2+} possa estar relacionada a mudanças nos níveis de estresse oxidativo. Segundo [Daoud et al. \(2007\)](#), o aumento da atividade da CAT está geralmente associado ao aumento das temperaturas, que, por sua vez, aceleram ainda mais a taxa metabólica dos organismos. No presente estudo, isso não foi observado, uma vez que a atividade da CAT de robalos aclimatados a 27 ° C não diferiu daqueles aclimatados a 24 ° C (grupos controle); no entanto, quando Mn^{2+} foi adicionado à água a 27 ° C, a atividade da CAT aumentou significativamente no grupo exposto a Mn^{2+} .

Estes resultados sugerem que a interação entre temperatura elevada e Mn^{2+} influencia a atividade da CAT. No entanto, existem vários relatos sobre padrões de expressão de CAT sob condições indutoras de estresse oxidativo, como toxicidade química e estresse térmico. Essas defesas antioxidantes podem ser aumentadas ([Khessiba et al., 2005](#) ; [Vinagre et al., 2012](#) , [2014](#)), inibidas ([Kaur et al., 2011](#) ; [Sabatini et al., 2011](#)) ou não afetadas ([Mueller et al., 2012](#) ; [Gabriel et al., 2013](#) , [Machado et al., 2014](#)) por agentes estressores do agente. A ocorrência de um tipo de resposta ou outro depende da intensidade e duração do estresse aplicado, da suscetibilidade das espécies que estão expostas e / ou da via de exposição ([Bebiano et al., 2005](#) ; [Sanchez et al., 2005](#)). Além disso, a atividade da CAT pode ser específica da espécie ([Fonseca et al., 2011](#) ; [Madeira et al., 2013](#) , [2014](#)) e específica do tecido ([Viera et al., 2012](#) ; [Vinagre et al., 2014](#)). No presente estudo, pode-se observar que a associação entre as duas condições (temperatura e Mn^{2+}) ao qual os espécimes de robalos de gordura foram expostos induziu a ativação da enzima catalase e, portanto, induziu a ativação do sistema de oxidação.

Neste estudo, também elucidamos os efeitos modulatórios na genotoxicidade de um aumento na temperatura associado à exposição a Mn^{2+} em *C. parallelus* através do teste de cometa alcalino e do teste de micronúcleos. Ambos os ensaios são úteis biomarcadores de testes de genotoxicidade ambiental ([Barsiene et al., 2012](#) ; [Dar et al., 2015](#)). Nossos resultados indicaram que a exposição de *C. parallelus* a concentrações subletais de Mn^{2+} , combinado com o aumento da temperatura da água, induziu danos no DNA significativamente maiores nos tratamentos de temperatura do que no controle; assim, esses resultados indicaram o potencial genotóxico dessas condições experimentais. Estudos anteriores, que também usaram o método do ensaio cometa, associaram estresse térmico com efeitos genotóxicos em organismos aquáticos, como peixes de água doce (*Carassius auratus*), lagostim (*Astacus leptodactylus*) e mexilhões (*Dreissena polymorpha*) ([Anitha et al., 2000](#) ; [Buschini et al., 2003](#) ; [Malev et al., 2010](#)).

No presente estudo, apesar de um aumento significativo na DI ter sido obtido em ambos os tratamentos de temperatura em comparação ao controle, também observamos uma diminuição nos valores de DI à medida que a temperatura da água aumentava. Tal depleção poderia ser explicada pelo potencial citotóxico exercido pelo estresse térmico, levando a mudanças na cinética das células sanguíneas e na reposição eritrocitária ([Çavas, Ergene-Gözükara, 2003](#)). Esta observação encontra apoio na literatura ([Polard et al., 2011](#) ; [Vera-Candiotti et al., 2013](#)); no entanto, a diminuição dos valores de DI pode ser causada por outros agentes citotóxicos que também afetaram as populações de células sanguíneas circulantes.

O ensaio cometa alcalino detecta danos no DNA, como quebras de fita simples de DNA, quebras de fita dupla de DNA ou cross-linking DNA-DNA / DNA-proteína ([Guilherme et al., 2012](#)), que poderiam ter se originado da interação entre o radicais livres formados como resultado do estresse oxidativo e do DNA das células sanguíneas ([Azqueta et al., 2011](#) ; [Nwani et al., 2013](#)). Além disso, diferentemente da indução de micronúcleos, o dano ao DNA detectado pelo ensaio do cometa alcalino é relativamente menor e freqüentemente transitório ([Dixon et al., 2002](#)). Além disso, também podemos sugerir que o aumento da atividade de CAT permite uma diminuição significativa nos valores de DI à medida que a temperatura da água aumenta; repara macromoléculas danificadas, como o DNA, e alivia o estresse oxidativo.

O teste de micronúcleos é considerado um marcador sensível e informativo do dano citogenético causado por compostos mutagênicos ([Arslan et al., 2015](#)) e tem sido aplicado para identificar o potencial adverso de vários agentes genotóxicos ([Barsiene et al., 2012](#)), ambos em espécies de sentinela de água doce e marinha ([Guidi et al., 2010](#)). O aumento na frequência MN foi observado em ambos os grupos de tratamento em comparação com o controle. O aumento da frequência MN é um marcador indireto de irregularidades cromossômicas numéricas e estruturais nas células causadas por muitos agentes ([Arslan et al., 2015](#)); assim, isso indica a capacidade clastogênica e / ou aneugênica do Mn²⁺ exposição combinada com o aumento da temperatura. Além disso, está bem documentado que a temperatura modula a sensibilidade dos organismos aquáticos aos metais, afetando sua tolerância fisiológica, demanda de energia, suprimento de oxigênio e / ou biogênese mitocondrial ([Sokolova, Lanning, 2008](#)).

Os resultados mostram que a combinação de exposição a Mn²⁺ e estresse térmico causou danos significativos no DNA em *C. parallelus* , e o sistema oxidativo também pode ser induzido. Nossos resultados indicam que os endpoints identificados fornecem informações úteis para estudos de biomonitoramento; Além disso, eles sublinham a necessidade de uma pesquisa abrangente sobre a possível influência do aumento da temperatura no mecanismo de toxicidade de metais pesados e Mn²⁺ em peixes.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por uma bolsa de pesquisa da FAPES (Proc. # 61902861). BLL Tuzuki era um mestre da FAPES. FAC Delunardo é Ph.D. bolsista da FAPES (Proc. # 61636509/2013). Os autores agradecem ao Instituto Nacional da Mata Atlântica (INMA) pela aceitação do depósito de espécime de voucher no Museu de Biologia Professor Mello Leitão.

REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Método Enzymol.* 1984; 105 (2): 121-26. [[Links](#)]
- Agrawal SJ, Srivastava AK. Respostas hematológicas em peixes de água doce a intoxicação experimental por manganês. *Toxicologia.* 1980; 17: 97-100. [[Links](#)]
- Al-Sabti K, Metcalfe CD. Micronúcleos de peixes para avaliar a genotoxicidade em água. *Mutat Res.* 1995; 343 (2-3): 121-35. [[Links](#)]
- Anitha B, Chandra N, Gopinath PM, Durairaj G. Avaliação da genotoxicidade do choque térmico em peixes dourados (*Carassius auratus*). *Mutat Res.* 2000; 469 (1): 1-8. [[Links](#)]
- Andrade VM, De Freitas TRO, Da Silva, J. Cometa, utilizando eritrócitos para a detecção de poluentes genotóxicos em meio aquático, utilizando-se eritrócitos de salmãoete (*Mugil* sp.) E bagres-do-mar (*Netuma* sp.). *Mutat Res. - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2004; 560, 57-67. [[Links](#)]
- APHA. Métodos padrão para o exame de água e águas residuais, 21st ed. Associação Americana de Saúde Pública, Washington, DC; 2005. [[Links](#)]
- Arndt A, Borella, MI, Espósito BP. Toxicidade de metalofármacos de manganês contra *Danio rerio* . *Quimiosfera.* 2014; 96 (1): 46-50. [[Links](#)]
- Arslan ÖÇ, Boyacioglu M, Parlak H., Katalay S, Karaaslan MA. Avaliação da indução de micronúcleos em sangue periférico e células branquiais de algumas espécies de peixes de Aliag a Bay Turkey. *Mar Pollut Bull.* 2015; 94 (1-2): 48-54. [[Links](#)]
- Azevedo JS, Braga ES, Silva de Assis HC, Oliveira Ribeiro CA. Alterações bioquímicas no fígado e na guelra de *Cathorops spixii* coletadas sazonalmente em dois estuários brasileiros sob variadas influências de atividades antrópicas. *Ecotoxicol Environ Safe.* 2013; 96: 220-30. [[Links](#)]
- Azqueta A, Meier S, Priestley C, KB Gutzkow, Brunborg G, Sallette J, linha Soussa F, Collins AR. A influência do método de pontuação na variabilidade dos resultados obtidos com o ensaio do cometa. *Mutagenese.* 2011; 26 (3): 393-99. [[Links](#)]
- TV Bagnyukova, Lushchak OV, Storey KB, Lushchak VI. Estresse oxidativo e respostas antioxidantes de defesa por tecidos de peixes-dourados a mudanças agudas de temperatura de 3 a 23 ° C. *J Therm Biol.* 2007; 32 (1):

227-34. [[Links](#)]

Baršiene J, Rybakovas A, T Lang, W Grygiel, L Andreikenaite, Michailovas A. Risco de genotoxicidade ambiental no Mar Báltico durante o período de 2009-2011 avaliada por frequências de micronúcleos em eritrócitos no sangue de linguado (*Platichthys flesus*), arenque (*Clupea harengus*) e eelpout (*Zoarces viviparus*). Mar Environ Res. 2012; 77 (1): 35-42. [[Links](#)]

Barnhoorn I, van Vuren JHJ, du Preez HH. Efeitos subletais do manganês no metabolismo de carboidratos de *Oreochromis mossambicus* após exposição aguda e crônica. S Afr J Zool. 1999; 34: 102-07. [[Links](#)]

Bebianno MJ, Companhia R, Serafim A, RP Cosson, Fiala-Medoni A. Sistemas antioxidantes e peroxidação lipídica em *Bathymodiulus azoricus* de campos de fontes hidrotermais de Mid-Atlantic Ridge. Aquat Toxicol. 2005; 75 (4): 354-73. [[Links](#)]

Bervoets L, Blust R, Verheyen R. Efeito da temperatura sobre a absorção de cádmio e zinco pela larva midge *Chironomus riparius* . Arch Environ Contam Toxicol. 1996; 31: 502-11. [[Links](#)]

Beutler E. Metabolismo das células vermelhas: um manual de métodos bioquímicos. Grune & Stratton, Nova Iorque; 1975. [[Links](#)]

Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C. Efeitos da temperatura na linha de base e dano ao DNA induzido por genotoxicant em hemócitos de *Dreissena polymorpha* . Mutat Res. 2003; 537 (1): 81-92. [[Links](#)]

Caissie D. O regime térmico dos rios: uma revisão. Biol de água doce. 2006; 51: 1389-406. [[Links](#)]

Carvalho-Neta RNF, Abreu-Silva AL. Glutathione S-Transferase como biomarcador em *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) para monitoramento ambiental: o estudo de caso da Baía de São Marcos, Maranhão, Brasil. Lat Am J Aquat Res. 2013; 41: 217-25. [[Links](#)]

Çavas T, Ergene-Gozukara S. Micronuclei, lesões nucleares e regiões organizadoras de nucléolos corados por prata na interfase (AgNORs) como indicadores de *citotoxicidade* em *Oreochromis niloticus* expostos a efluente de fábrica têxtil. Mutat Res. 2003; 534 (1): 93-99. [[Links](#)]

Cerqueira VR, Tsuzuki EMY. Uma revisão da indução da desova, larvicultura e criação juvenil do robalo-robalo, *Centropomus parallelus* . Peixe Fisiol Biochem. 2009; 35 (1): 17-28. [[Links](#)]

Cossarini-Dunier M, Demael A, Lepot D, Guerin V. Efeito de íons de manganês na resposta imune de carpas (*Cyprinus carpio*) contra *Yersinia ruckeri*. Dev Comp Immunol. 1988; 12: 573-79. [[Links](#)]

Dalzell DJB, Macfarlane NAA. A toxicidade do ferro à truta marrom e efeitos nas brânquias: uma comparação de dois graus de sulfato de ferro. J Fish Biol. 1999; 55 (2): 301-15. [[Links](#)]

Daoud D, Chabot O, Audet C, Lambert Y. Variação induzida pela temperatura no consumo de oxigênio nos estágios juvenil e adulto do camarão do norte, *Pandalus borealis* . J Exp Mar Biol Ecol. 2007; 347 (1): 30-40. [[Links](#)]

Dar SA, Yousuf AR, Balkhi MH, Ganai FA, Bhat FA. Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade induzidas pelo endossulfan, manifestada pelas vias de estresse oxidativo, em peixes carpa ciprinídeos de água doce (*Carassius carassius* L.). Quimiosfera. 2015; 120 (1): 273-83. [[Links](#)]

Daufresne M, Lengfellner K, Sommer U. O aquecimento global beneficia os pequenos ecossistemas aquáticos. Proc Natl Acad Sci EUA. 2009; 106 (31): 12788-93. [[Links](#)]

Dixon DR, Pruski AM, Dixon LRJ, Jha AN, ecogenotoxicidade de invertebrados marinhos: uma visão metodológica. Mutagenese 2002; 17 (6): 495-507. [[Links](#)]

Dolci GS, HZ Rosa, LT Vey, CS Pase, RCS Barcelos, Dias VT, L Loebens, Dalla Vecchia P, CA Bizzi, Baldisserotto B, Burger ME. A aclimatização por hipóxia pode causar alterações morfológicas e proteger contra lesões oxidativas induzidas por Mn em bagres prateados (*Rhamdia quelen*) mesmo após reoxigenação? Polluto Environ. 2017; 224: 466-75. [[Links](#)]

Dolci GS, Dias VT, Roversi K, K Roversi, CS Pase, Segat HJ, Teixeira AM, DM Benvegno, Trevisol F, Barcelos RCS, Riffel APK, Nunes MAG, VL Dressler, EMM Flores, Baldisserotto B, Buerger ME. A hipóxia moderada é capaz de minimizar a toxicidade induzida por manganês nos tecidos do bagre prateado (*Rhamdia quelen*). Ecotoxicol Environ Safe. 2013; 91: 103-07. [[Links](#)]

Eales JG, Brown SB. Medição e regulação do estado da tiróide em peixes teleósteos. Rev Fish Biol Fisher. 1993; 3: 299-347. [[Links](#)]

Escobar H. 2015. O tsunami causou destruição ecológica no Brasil. Ciência 350: 1138-39. [[Links](#)]

Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, OB Stoliar, Nam YK. Várias respostas à exposição ao cobre e manganês de *Carassius auratus gibelio* de duas populações. Comp Biochem Physiol C. 2011; 154 (3): 242-53. [[Links](#)]

Peixe JT. Tratamento de água subterrânea para redução de ferro e manganês e estudos de criação de peixes aplicados ao projeto da incubadora de peixes esportivos Ruth Burnett, Fairbanks, Alasca. *Aquacult Eng.* 2009; 41 (2): 97-108. [[Links](#)]

Fonseca VF, França S, Serafim A, Companhia R, Lopes B, Bebiano MJ, Cabral HN. Respostas multi-biomarcador à contaminação do habitat estuarino em três espécies de peixes: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* e *Pomatoschistus microps*. *Aquat Toxicol.* 2011; 102 (3-4): 216-27. [[Links](#)]

Gabriel D, Riffel APK, Finamor IA, Saccol EMH, Ourique GM, LO Goulart, Kochhann D, Cunha MA, LO Garcia, Pavanato MA, AL Val, Baldisserotto B, Llesuy SF. Efeitos da exposição subclônica ao cloreto de manganês sobre tecidos de tambaqui (*Colossoma macropomum*): estresse oxidativo e defesas antioxidantes. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2013; 64 (1): 659-67. [[Links](#)]

Gomiero A, Viarengo A. Efeitos da temperatura elevada na toxicidade do cobre e da oxitetraciclina no modelo marinho, *Euplotes crassus*: uma perspectiva de mudança climática. *Polluto Environ.* 2014; 94 (1): 262-71. [[Links](#)]

Gonçalves-Soares D, Zanette J, Yunes JY, GM Yepiz-Plascencia, Bairy ACD. Expressão e atividade de glutatona S-transferases e catalase no camarão *Litopenaeus vannamei* inoculado com uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa*. *Mar Environ Res.* 2012; 75 (1): 54-61. [[Links](#)]

Gonzalez RJ, Grippo RS, Dunson WA. O rompimento do balanço de sódio em brookchar, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), por manganês e ferro. *J Fish Biol.* 1990; 37 (1): 765-74. [[Links](#)]

Grim JM, Simonik EA, MC Semones, Kuhn DE, Crockett EL. O sistema de defesa antioxidante dependente de glutatona não é modulado pela aclimação da temperatura nos tecidos musculares do robalo, *Morone saxatilis*. *Comp Biochem Physiol A.* 2013; 164 (2): 383-90. [[Links](#)]

Guidi P, Frenzilli G, Benedetti M., Bernardeschi M, Falleni A, Fattorini D, Regoli F., Scarcelli V, Nigro M. Antioxidante, genotóxico e biomarcadores lisossômicos no bivalve de água doce (*Unio pictorum*) transplantado em uma bacia de metal poluída. *Aquat Toxicol.* 2010; 100 (1): 75-83. [[Links](#)]

Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M. Danos no DNA de peixes (*Anguilla anguilla*) expostos a um herbicida à base de glifosato - Elucidação da especificidade de órgãos e o papel do estresse oxidativo. *Mutat Res.* 2012; 743 (1-2): 1-9. [[Links](#)]

Habig WH, Jakoby WB. Ensaio para diferenciação de glutatona S-transferases. *Métodos Enzymol.* 1981; 77: 398-405. [[Links](#)]

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutatona S-transferases. O primeiro passo enzimático na formação do ácido mercaptúrico. *J Biol Chem.* 1974; 249 (22): 7130-39. [[Links](#)]

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Radicais Livres em Biologia e Medicina*, 4ª ed. Imprensa da Universidade de Oxford; 2006. [[Links](#)]

Hedayati A, Hoseini SM, Ghelichpour M. Toxicidade aguda do manganês à base de água para *Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870) - histopatologia das guelras, índices imunológicos, condição oxidativa e resistência à água salgada. *Toxicol Environ Chem.* 2015; 96: 1535-45. [[Links](#)]

Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romanga F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys PH, MacGregor JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol Mutagen.* 1991; 18:277-91. [[Links](#)]

Hernroth B, Baden SP, Holm K, Andre T, Soderhall I. Manganese induced immune suppression of the lobster, *Nephrops norvegicus*. *Aquat Toxicol.* 2004; 70:223-31. [[Links](#)]

Heugens EH, Hendriks AJ, Dekker T, van Straalen, NM, Admiraal W. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment *Crit Rev Toxicol.* 2001; 31(3):247-84. [[Links](#)]

Heuser VM, de Andrade VM, Peres A, Braga LMGM, Chies AB. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol Int.* 2008; 32:1223-29. [[Links](#)]

Hoseini SM, Aliakbar H, Ghelichpour M. Plasma metabolites, ions and thyroid hormones levels, and hepatic enzymes' activity in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) exposed to waterborne manganese. *Ecotoxicol Environ Safe.* 2004; 107:84-89. [[Links](#)]

IPCC, Fifth Assessment Report on Climate Change 2013: The Physical Science Basis, Final Draft Underlying Scientific-Technical Assessment. Intergovernmental Panel on Climate Change. Working group 1, Geneva, 2013. [[Links](#)]

Jha AN. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 2008; 23:207-21. [[Links](#)]

- Kaur M, Atif F, Ansari RA, Ahmad F, Raisuddin S. The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch. *Chemico-Biol Interact.* 2011; 193(1):216-24. [[Links](#)]
- Khessiba A, Romeo M, Aissa P. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environ Pollut.* 2005; 133(2):275-81. [[Links](#)]
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate MJr, Kirchner E, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrales J, Vanhauwaert A, Wakata A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environ Mol Mutagen.* 2003; 540(2):153-63. [[Links](#)]
- Kobayashi H, Suguyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun.* 1995; 2(3):103-15. [[Links](#)]
- Lannig G, Flores JF, Sokolova IM. Temperature-dependent stress response in oysters *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat Toxicol.* 2006; 79(3):278-87. [[Links](#)]
- Lee S, Ji K, Choi K. Effects of water temperature on perchlorate toxicity to the thyroid and reproductive system of *Oryzias latipes*. *Ecotox Environ Safe.* 2014; 108(1):311-17. [[Links](#)]
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75. [[Links](#)]
- Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol.* 2011; 101(1):13-30. [[Links](#)]
- Machado C, Zaleski C, Rodrigues E, Carvalho CS, Cadena SMSC, Gozzi GJ, Krebsbach P, Rios FS, Donatti L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defense system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2014; 172-173:21-28. [[Links](#)]
- Madeira D, Narciso L, Cabral H, Diniz M, Vinagre C. Role of thermal niche in the cellular response to thermal stress: lipid peroxidation and HSP70 in coastal crabs. *Eco Ind.* 2014; 36(1):601-06. [[Links](#)]
- Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Vinagre C, Diniz MS. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comp Biochem Physiol. A.* 2013; 166(2):237-43. [[Links](#)]
- Malev O, Šrut M, Maguire I, Štambuk A, Ferrero EA, Lorenzon S, Klobučar GIV. Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comp Biochem Physiol. C.* 2010; 152:433-43. [[Links](#)]
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244(1):6049-55. [[Links](#)]
- McNeely RN, Neimanis VP, Dwyer L. Water Quality Sourcebook: a guide to water quality parameters. Ottawa: Environment Canada, Inland Waters Directorate, Water Quality Branch; 1979. [[Links](#)]
- Morillo J, Usero J. Trace metal bioavailability in the waters of two different habitats in Spain: Huelva estuary and Algeciras Bay. *Ecotoxicol Environ Safe.* 2008; 71(1):851-59. [[Links](#)]
- Mueller IA, Devor DP, Grim JM, Beers JM, Crockett EL, O'Brien KM. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of white but not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. *J Exp Biol.* 2012; 215(20):3655-64. [[Links](#)]
- Nath K, Kumar N. Toxicity of manganese and its impact on some aspects of carbohydrate metabolism of a freshwater teleost, *Colisa fasciatus*. *Sci Total Environ.* 1987; 67:257-62. [[Links](#)]
- Nwani CD, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Lakra WS. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; 36(2):539-47. [[Links](#)]
- Partridge GJ, Lymbery AJ. Effects of manganese on juvenile mullet (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity - implications for inland mariculture. *Aquaculture.* 2009; 290:311-16. [[Links](#)]
- Polard T, Jean SLG, Laplanche C, Merlina G, Sánchez-Pérez JM, Pinelli E. Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aquat Toxicol.* 2011; 101(1):126-34. [[Links](#)]
- Sabatini SE, Rocchetta I, Nahabedian DE, Luquet CM, Eppis MR, Bianchi L, Ríos de Molina MC. Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. *Comp Biochem Physiol. C.* 2011; 154:391-98. [[Links](#)]
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Ait-Aissa S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005; 19(1):177-83.

[[Links](#)]

Schiedek D, Sundelin B, Readman JW, Macdonald RW. Interactions between climate change and contaminants. *Mar Pollut Bull* . 2007; 54:1845-56. [[Links](#)]

Simonato JD, Fernandes MN, Martinez CBR. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology*. 2011; 20:1400-10. [[Links](#)]

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1998; 175:184-91. [[Links](#)]

Sokolova IM, Lanning G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Res*. 2008; 37(1):181-201. [[Links](#)]

Speit G, Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*. 1999; 113(1):203-12. [[Links](#)]

Teles M, Pacheco M, Santos MA. *Spa rus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 β -estradiol (E₂) or E₂ combined with 4-nonylphenol. *Sci Total Environ* . 2005; 336:57-69. [[Links](#)]

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay, guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* . 2000; 35(3):206-21. [[Links](#)]

Udroiu I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat Toxicol* . 2006; 79:201-204. [[Links](#)]

Vera-Candiotti V, Soloneski S, Larramendy ML. Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. *Ecotoxicol Environ Safe* . 2013; 98(1):368-73. [[Links](#)]

Vergauwen L, Knapen D, Hagenars A, Blust RR. Hypothermal and hyperthermal acclimation differentially modulate cadmium accumulation and toxicity in the zebrafish. *Chemosphere* . 2013; 91(4):521-29. [[Links](#)]

Veronez ACS, Salla RV, Baroni VD, Barcarolli IF, Bianchini A, Martinez CBR, Chippari-Gomes AR. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquat Toxicol* . 2016; 174 (1):101-108. [[Links](#)]

Vieira MC, Torronteras R, Córdoba F, Canalejo A. Acute toxicity of manganese in gold fish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicol Environ Safe* . 2012; 78(1):212-17. [[Links](#)]

Vinagre C, Madeira D, Mendonça V, Dias M, Roma J, Diniz M, Effect of temperature on multiple biomarkers of oxidative stress in coastal shrimp. *J Therm Biol* . 2014; 41(1):38-42. [[Links](#)]

Vinagre C, Madeira D, Narciso L, Cabral H, Diniz M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass *Dicentrarchus labrax*. *Ecol Ind*. 2012; 23(1):274-79. [[Links](#)]

Wepener V, VanVuren JHJ, Du Preez HH. Effect of manganese and iron at a neutral and acidic pH on the hematology of the banded tilapia (*Tilapia sparrmanii*). *Bull Environ Contam Toxicol*. 1992; 49(1):613-19. [[Links](#)]

Yokel RA. Fluxo de manganês através da barreira hematoencefálica. *Neuromol Med*. 2009; 11 (4): 297-310. [[Links](#)]

Recebido em 30 de junho de 2017; Aceito: 14 de novembro de 2017



Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License

Universidade Estadual de Maringá
Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura / Coleção Ictiologia
Av. Colombo, 5790
87020-900 Maringá, PR, Brasil
Tel .: (55 44) 3011 4632



neoichth@nupelia.uem.br