



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Química

Daniele Caetano da Silva

**Variações em biomarcadores bioquímicos de contaminação em Tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) de diferentes portes.**

São José do Rio Preto – SP

– 2012 –

DANIELE CAETANO DA SILVA

**Variações em biomarcadores bioquímicos de contaminação em Tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) de diferentes portes.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química junto ao Programa de Pós Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto, SP

- 2012 -

Silva, Daniele Caetano da.
Variação em biomarcadores bioquímicos de contaminação em
Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de diferentes portes / Daniele
Caetano da Silva. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.
64 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia animal. 2. Toxicologia ambiental. 3. Tilápia (Peixe) –
Efeito da poluição da água. 4. Marcadores biológicos. I. Almeida,
Eduardo Alves de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 574.64

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

DANIELE CAETANO DA SILVA

**Variações em biomarcadores bioquímicos de contaminação em Tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) de diferentes portes.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química junto ao Programa de Pós Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof.^a Dr.^a Eny Maria Vieira
Professor Doutor
USP – São Carlos

Prof.^a Dr.^a Cláudia Regina Bonini Domingos
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 13 de fevereiro de 2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Isabel, ao meu irmão Leonardo, a minha sobrinha Luísa e ao meu pai Jorge, que por causa de uma das etapas desta pesquisa, não pude estar ao lado dele quando meu avô, seu pai faleceu.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jorge e Isabel, pelo incentivo, paciência, amor, carinho e por acreditarem em mim.

Ao meu irmão Leonardo, a minha cunhada Greice e a minha sobrinha Luísa, pelos poucos, mas, inesquecíveis momentos juntos de muita alegria, amor e carinho.

Ao meu namorado Lenard, por ter me ajudado bastante na realização de toda a minha pesquisa, além dos momentos descontraídos, por todo amor e carinho.

Ao meu orientador, professor Doutor Eduardo Alves de Almeida, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, pela atenção, paciência, ensinamentos e conselhos concedidos durante este trabalho.

Ao pescueiro Clube dos Trabalhadores Rurais, de Catanduva, e à professora Doutora Eliane Gonçalves de Freitas, da UNESP/IBILCE, por terem cedidos os peixes utilizados no experimento.

À FAPESP pelo financiamento (2009/13291-8).

À equipe do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LABCA), pelo auxílio nos experimentos.

Ao meu irmão, pela ajuda e opinião na redação da dissertação.

À Lilian, por ter me ajudado nas estatísticas.

Aos técnicos Carlos (do biotério) e Luis (do laboratório), por auxiliarem na coleta dos peixes.

Às professoras Dr^a. Cláudia Regina Bonini Domingos e Dr^a. Eny Maria Vieira por terem disponibilizado seus tempos e por terem aceitado a participar da minha banca de defesa com seus conhecimentos e sugestões.

Às professoras Dr^a. Gisela de Aragão Umbuzeiro e Dr^a. Vera Aparecida de Oliveira Tiera por, também, terem aceitado participar da minha banca de defesa como suplentes.

As minhas eternas amigas, Maraíssa Silva Franco, Priscilla P. P. de A. Villela (Morango), Priscila G. E. Xavier (Dark) e Giovana Graciano, pela grande amizade e companheirismo em todos os momentos.

E a todos que de alguma forma ajudaram na minha formação. Obrigada.

EPÍGRAFE

"Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve
que renunciar para conseguir".

(Dalai Lama)

RESUMO

Estudos de alterações bioquímicas em espécies aquáticas expostas a poluentes são abundantes na literatura. Todavia, existem poucas pesquisas voltadas a compreender de que forma animais de uma mesma espécie, mas com pesos diferentes, respondem a contaminantes. Então, identificar a influência deste fator nas respostas de peixes a contaminantes ambientais é extremamente importante para estudos ecotoxicológicos. No presente estudo, tilápias do Nilo de diferentes portes (jovens, adultas de menor peso e adultas de maior peso) foram tratadas com benzo(a)pireno ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), diazinon ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), cádmio ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e cobre ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) por três dias. Após as exposições, as tilápias foram anestesiadas com benzocaína ($40,0 \text{ mg L}^{-1}$) e sacrificadas para retirada do cérebro, fígado e brânquias para análise de biomarcadores: tais como de estresse oxidativo (que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutiona peroxidase (GPx)); enzimas de fase I e II de biotransformação (7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e glutiona S-transferase (GST), respectivamente); enzimas esterases (acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE)); e níveis de peroxidação lipídica. Os resultados mostraram que a exposição ao diazinon e ao cádmio provocou inibição das esterases nos fígado e nas brânquias das tilápias adultas. A atividade da SOD e da CAT foi afetada (diminuiu) apenas nas tilápias jovens, enquanto que a GPx foi afetada nas tilápias adultas, porém, esses efeitos não implicaram em aumento nos níveis de peroxidação lipídica dos peixes. Já as enzimas de biotransformação de fase I e II apresentaram indução significativa para a exposição ao benzo(a)pireno nas tilápias jovens e adultas de menor peso, indicando o envolvimento das mesmas na detoxificação do composto. A falta de indução no grupo adulto de maior peso pode ser decorrente de uma maior capacidade de estocagem (bioacúmulo) dos contaminantes neste grupo, em função do maior conteúdo de gordura, por exemplo, deixando o benzo(a)pireno bio-indisponível para exercer seu efeito indutor das enzimas de biotransformação. Deste modo, os resultados indicaram que houve variação nas respostas enzimáticas ao longo do desenvolvimento, com o aumento de peso e em diferentes tecido. Este estudo também enfatizou que as brânquias são os tecidos que mais respondem aos contaminantes, possivelmente devido a seu contato direto com o ambiente, e primeiro órgão de contato com os contaminantes. Portanto, o porte do peixe afetou as respostas bioquímica aos contaminantes testados em condições experimentais, devendo ser considerado em estudos ambientais. FAPESP (2009/13291-8).

Palavras chave: Biomarcadores de contaminação, porte, estresse oxidativo, enzimas, biotransformação, tilápias.

ABSTRACT

Studies of biochemical changes in aquatic species exposed to pollutant are abundant in literature. However, there are little researches aimed to understand whether animals of the same species, but with different weights, respond to contaminants. Then, the identification of the influence of this factor in the responses of fish to environmental contaminants is of primordial importance for ecotoxicological studies. In this study, Nile tilapia of different sizes (juvenile, adults of lower weight and adults of higher weight) were exposed to benzo(a)pyrene (0.5 mg L^{-1}), diazinon (1.0 mg L^{-1}), cadmium (0.5 mg L^{-1}) and copper (0.5 mg L^{-1}) for three days. After the exposure, the tilapias were anesthetized with benzocaine (40.0 mg L^{-1}) and sacrificed to remove the brain, the liver and the gills for analysis of biomarkers: such as of oxidative stress (that include the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx)); enzymes of phase I and II biotransformation (7-etoioresorufina-O-deetilase (EROD), glutathione S-transferase (GST), respectively); esterase enzymes (acetylcholinesterase (AChE), carboxylesterase (CbE)); and levels of lipid peroxidation. The results showed that exposure to diazinon and to cadmium caused inhibition of esterases in the liver and in the gills of the adults tilapias. The activity of SOD and CAT was affected (decreased) only in juvenile tilapia while GPx was affected in adult tilapia, however, these effects did not result in increases in the levels of lipid peroxidation of the fish. Since the phase I and II biotransformation enzymes showed significant induction to exposure the benzo[a]pyrene only in juvenile tilapia and in adults of lower weight tilapia, it would be suggested the involvement of the same in the detoxification of the compound. The lack of induction in adults of higher weight tilapias may be due a greater storage capacity (bioaccumulation) of contaminants in this group, due to the higher fat content, for example, turning benzo(a)pyrene bio-unavailable to perform its inductive effect of biotransformation enzymes. Thus, the results indicated that there was variation in enzymatic responses throughout the development, with increasing weight and in different tissues. This study also emphasized that the gills were the most responsible tissue, possibly due to their direct contact with the environment, and the first organ of the body contact with the contaminants. Therefore, the weight of the fish affects the biochemical responses for the tested contaminants at the experimental conditions, and should thus be considered in environmental studies. FAPESP (2009/13291-8).

Keywords: Biomarkers of contamination, weight, oxidative stress, enzymes, biotransformation, tilapias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo catalítico do CYP-450.....	15
Figura 2 - Reação do CYP450 sobre a 7-etoxi-resorufina.....	16
Figura 3 - Defesas enzimáticas antioxidantes.....	19
Figura 4 - Esquema geral da cadeia de reações da peroxidação de lipídeos levando à formação de aldeídos tais como o malondialdeído. X [·] = radical.....	21
Figura 5 - Hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético por meio da AChE.....	23
Figura 6 - Fórmula estrutural de um pesticida organofosforado.....	23
Figura 7 - Montagem do experimento.....	31
Figura 8 - Atividade da AChE em brânquias, fígado e cérebro de <i>O. niloticus</i>	38
Figura 9 - Atividade da CbE em brânquias e fígado de <i>O. niloticus</i>	41
Figura 10 - Atividade da SOD em brânquias e fígado de <i>O. niloticus</i>	43
Figura 11 - Atividade da CAT em brânquias e fígado de <i>O. niloticus</i>	44
Figura 12 - Atividade da GPx em brânquias e fígado de <i>O. niloticus</i>	46
Figura 13 - Nível de MDA em brânquias e fígado de <i>O. niloticus</i>	48
Figura 14 - Atividade da EROD em brânquias e fígado de <i>O. niloticus</i>	51
Figura 15 - Atividade da GST em brânquias e fígado de <i>O. niloticus</i>	54

LISTA DE FOTOS

Foto 1 - <i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia do Nilo).....	27
Foto 2 - <i>Oreochromis niloticus</i> (Peciforme, Cichlidae).....	30
Foto 3 - Aquários utilizados no experimento.....	32
Foto 4 - Tecidos que foram removidos.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
AhR	Ligantes Aril hidrocarboneto
B(a)P	Benzo(a)Pireno
BSA	Soro Albumina Bovina
CAT	Catalase
CbE	Carboxilesterase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cd	Cádmio
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CM	Carbamatos
Cu	Cobre
CYP450	Citocromo P-450
CYP1A	Isoforma do CYP-450 da família 1A
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DTT	DL-Ditiotreitol
EROD	7-Etoxiresorufina O-desetilase
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
Fe ³⁺	Ferro no estado férrico
Fe ²⁺	Ferro no estado ferroso
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
GST	Glutathione-S Transferase
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
LABCA	Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática
LPO	Peroxidação Lipídica
MDA	Malondialdeído
MFO	Monooxigenase de Função Mista
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
O ₂	Oxigênio Molecular
HO•	Radical Hidroxila
O ₂ ^{•-}	Radical Superóxido
OP	Organofosforado
PCB	Bifenilas Policloradas
PCDD	Dibenzo-p-dioxina policloro
PCDF	Dibenzofurano policloro
PMSF	<i>Phenylmethanesulfon Fluoride</i>
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
Tris	Hidroximetilaminometano
XO	Xantina Oxidase
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Enzimas de fase I da biotransformação.....	14
1.2 Enzimas de fase II (GST).....	16
1.3 Enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx).....	18
1.4 Peroxidação lipídica (LPO).....	20
1.5 Esterases (AChE e CbE).....	22
1.6 Fatores que diferenciam respostas entre organismos de uma mesma espécie.....	25
1.7 Organismo teste: Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	27
2 OBJETIVO	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos.....	29
3 MATERIAL E MÉTODO	30
3.1 Material biológico.....	30
3.2 Bioensaio.....	30
3.3 Preparo das amostras para análise das enzimas AChE e CbE.....	33
3.4 Preparo das amostras para análise das enzimas SOD, CAT, GPx, EROD e GST.....	33
3.5 Preparo das amostras para análise da peroxidação lipídica.....	33
3.6 Acetilcolinesterase (AChE - EC 3.1.1.7) e Carboxilesterase (CbE - EC 3.1.1.1).....	34
3.7 Superóxido Dismutase (SOD - EC 1.15.1.1).....	34
3.8 Catalase (CAT - EC 1.11.1.6).....	34
3.9 Glutathione Peroxidase (GPx - EC 1.11.1.9).....	34
3.10 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD).....	35
3.11 Glutathione S-transferase (GST - EC 2.5.1.18).....	35
3.12 Análise da peroxidação lipídica.....	35
3.13 Análise de proteína.....	36
3.14 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Efeitos das exposições dos contaminantes nos biomarcadores.....	37
4.1.1 AChE.....	37
4.1.2 CbE.....	40
4.1.3 SOD.....	42
4.1.4 CAT.....	44
4.1.5 GPx.....	45
4.1.6 MDA.....	47
4.1.7 EROD.....	50
4.1.8 GST.....	53
5 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de ambientes aquáticos é uma preocupação mundial devido à aceleração do processo industrial e ao aumento das atividades agrícolas e urbanas. Muitos produtos químicos são gerados anualmente e lançados direta ou indiretamente de forma indevida em rios, mares e lagos (CAJARAVILLE et al, 2000). Dentre os vários compostos liberados nos ecossistemas aquáticos destacam-se os pesticidas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e os metais tóxicos.

A partir da década de sessenta, a população começou a ter ciência dos malefícios, em curto e longo prazo, que estes compostos poderiam causar ao ecossistema aquático e ao ser humano (BRAGA et al, 2005; LOPEZ-BAREA; PUEYO, 1998; RASHED, 2001; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Desta forma, estudos de monitoramento ambiental são de primordial importância para se avaliar e identificar as condições ambientais, por meio de coleta de dados, visando mudanças comportamentais a fim de melhorar a qualidade de vida ambiental e humana.

Uma das formas utilizada para avaliar os danos causados pelos poluentes nos organismos aquáticos é por meio da análise de biomarcadores bioquímicos, ou seja, por alterações em parâmetros bioquímicos que refletem as interações ocorridas entre as substâncias tóxicas e o sistema biológico, em nível molecular, fisiológico e/ou celular, dado que, além de fornecer medidas sensíveis e respostas rápidas do comportamento gerado pelo estresse, também expressam o grau de exposição do organismo aos poluentes (WALKER et al, 1996; LOPEZ-BAREA; PUEYO, 1998; SILVA; PATHIRATNE, 2008).

Segundo Van der Oost, Beyer e Vermeulen (2003), os biomarcadores mais utilizados em experimentos, dentre eles com peixes, são:

- Enzimas de biotransformação (fase I e II);
- Parâmetros de estresse oxidativo;
- Produtos de biotransformação;
- Proteínas de estresse;
- Parâmetros hematológicos;
- Parâmetros imunológicos;
- Parâmetros reprodutivos e endócrinos;
- Parâmetros neuromusculares;
- Parâmetros genotóxicos;

- Parâmetros fisiológicos, histológico, e morfológicos;
- Proteômica e genômica.

1.1 Enzimas da fase I da biotransformação

Na fase I do metabolismo de biotransformação de compostos xenobióticos ocorrem as reações de redução, hidrólise e/ou oxidação dos mesmos. Estas reações são responsáveis por introduzir grupos funcionais (-OH, -NH₂, -COOH, etc.) no xenobiótico, resultando em aumento na hidrossolubilidade para que sejam mais facilmente excretados. A maior parte destas reações é catalisada por enzimas do sistema Monooxigenase de Função Mista (MFO) (WHEELOCK et al, 2005), ou seja, pela família de heme proteínas, as enzimas do citocromo P450 (CYP450), um sistema enzimático localizado nas membranas do retículo endoplasmático ou fração microsomal de células de vários tecidos, principalmente no fígado, rins e intestino. Tais reações requerem oxigênio molecular (O₂), além de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) como doador de elétrons (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Nas reações catalisadas pelas enzimas do CYP450 um átomo do O₂ é reduzido à água (H₂O), enquanto o outro é incorporado ao substrato. Na primeira parte, o substrato liga-se ao ferro oxidado (Fe³⁺) do grupo prostético heme do CYP450, que está localizado no retículo endoplasmático liso. Posteriormente, um elétron do NADPH é transferido via flavoproteína NADPH citocromo P450 redutase, reduzindo o Fe³⁺ para Fe²⁺, permitindo assim que o oxigênio se ligue ao complexo CYP450/substrato. Neste ponto, a reação pode prosseguir ou ser interrompida pela autooxidação do oxigênio liberando radical ânion superóxido (O₂^{•-}). Para evitar a perda do oxigênio na forma de O₂, um segundo elétron do NADPH é doado, auxiliando a ligação do O₂ ao sistema, formando um íon peróxido, o qual pode ser perdido também na forma de H₂O₂, caso a etapa seguinte não ocorra de forma adequada. Quando o sistema funciona adequadamente, há o rompimento da ligação covalente do oxigênio, resultando na inserção de um dos átomos do oxigênio ao substrato, e a liberação do outro na forma de água (Figura 1) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; MUNRO; GIRVAN; MCLEAN, 2007).

Como o sistema CYP450 é bastante responsivo a receptores nucleares aril hidrocarboneto (AhR), os quais são ativados por HPAs, dibenzo-p-dioxina policloro (PCDD), dibenzofurano policloro (PCDF) e bifenilas policloradas (PCB), esse complexo enzimático é muito utilizado no biomonitoramento ambiental, pois, tendem a aumentar significativamente

de atividade em resposta a esses compostos (KAMARI et al, 2011; PARENTE; DE-OLIVEIRA; PAUMGARTTEN, 2008; HENCZOVÁ et al, 2006).

Em ambientes contaminados, pode ocorrer a deficiência no controle do ciclo do CYP450 e falta de elétrons, fazendo com que o sistema não acompanhe o nível de atividade das enzimas do complexo favorecendo a produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 .

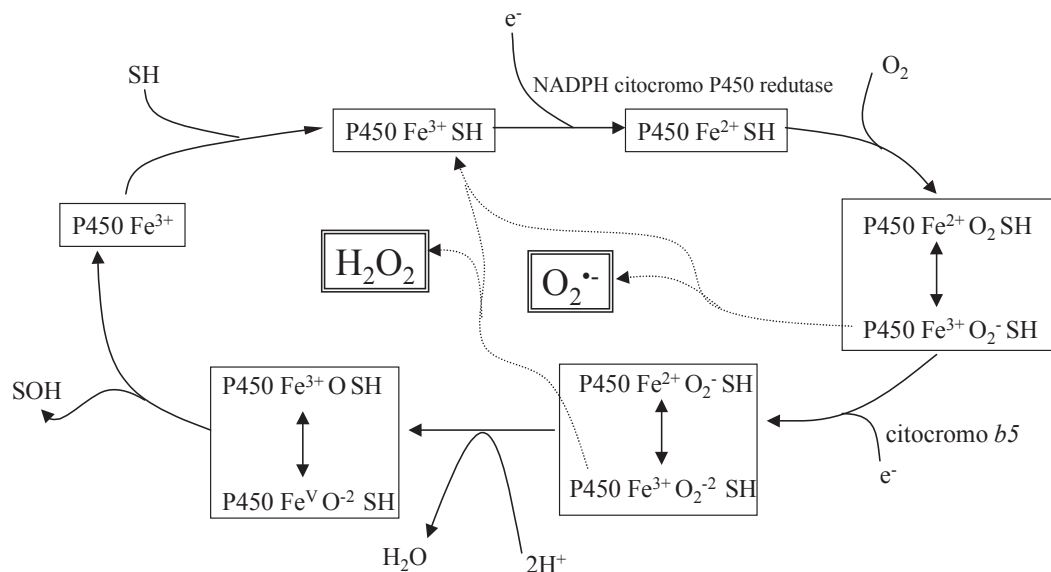


Figura 1 - Ciclo catalítico do CYP-450.
Fonte: Adaptado de Orellana e Guajardo (2004).

Em peixes, com exceção das enguias e salmonídeos, a classe de CYP450 responsável pela biotransformação de muitos compostos orgânicos (HPA, PCB, dioxinas, dentre outros), é a subfamília 1A (CYP1A) encontrada em hepatócitos, principal local de expressão, e que participa da ativação metabólica de agentes genotóxicos e carcinogênicos (PARENTE, DE-OLIVEIRA, PAUMGARTTEN, 2008; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; COSTA et al, 2011).

Uma das atividades enzimáticas encontradas para esta subfamília CYP1A é a 7-etoxioresorufina O-desetilase (EROD), a mais utilizada para a fase I de biotransformação em virtude da facilidade de sua medida em laboratório (PATHIRATNE; CHANDRASEKERA; PATHIRATNE, 2008), a qual é feita pelo aumento da fluorescência do produto gerado devido a sua ação de retirar o radical etil do substrato sintético 7-etoxi-resorufina (Figura 2) (LOPEZ-BAREA; PUEYO, 1998).

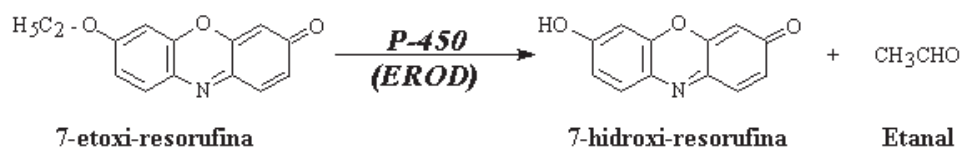


Figura 2 - Reação do CYP450 sobre a 7-etoxi-resorufina.
Fonte: Adaptado de Whyte et al (2000).

Em experimentos laboratoriais, Matsuo e colaboradores (2006) utilizaram tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposto a petróleo puro por dez dias e Aas et al (2000) expôs ao mesmo composto o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) por 30 dias e as duas pesquisas relataram indução enzimática da EROD nestes organismos.

Em um trabalho de campo realizado por Pathiratne, Chadrasekera e Pathiratne (2008) foi verificado, a partir de elevados níveis de EROD hepática de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletadas no lago de Bolgoda, Sri Lanka, a presença de compostos indutores de CYP1A, confirmando os resultados por meio de análise química da água e do sedimento que continham quantidades consideráveis de HPA.

Em estudo de campo, Torres e colaboradores (2002) observaram alta indução da isoforma CYP1A em mexilhões da espécie *Mytella guyanensis* coletados em locais contaminados, supostamente com efluentes domésticos, já que este sistema de monooxigenase é responsável pela biotransformação de poluentes orgânicos. Do mesmo modo que Parente, De-Oliveira e Paumgarten (2008) também constataram a indução hepática em tilápias (*Oreochromis niloticus*) e acarás (*Geophagus brasiliensis*) dos rios Guandu e Jacarépagua, Rio de Janeiro, contaminados por produtos químicos.

1.2 Enzimas da fase II (GST)

Os metabólitos das reações de fase I ou os grupos funcionais presentes no próprio xenobiótico podem ser conjugados com moléculas endógenas para facilitar seu reconhecimento por transportadores celulares na fase III, em que o composto é finalmente exportado para fora da célula para sua excreção posterior. Para os compostos serem metabolizados pela fase II, estes deverão apresentar em sua estrutura grupos funcionais como -COOH, -OH ou -NH₂, caso contrário, haverá primeiro o envolvimento das enzimas de fase I para depois os xenobióticos serem conjugados na fase II (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A fase II envolve reações de acetilação, metilação, sulfatação, glicuronidação, conjugação com glutathione, aminoácidos e ácidos graxos em que o xenobiótico eletrofílico ou metabólito da fase I são conjugados com um ligante endógeno, geralmente grupos polares tais como a glutathione reduzida (GSH), catalisado pela família de enzimas glutathione S-Transferase (GST), dando origem a um conjugado hidrossolúvel de fácil excreção (AHMAD, PACHECO, SANTOS, 2004).

As GST possuem múltiplas funções, dentre elas defesa contra danos oxidativos e produtos de peroxidação lipídica (PALANIKUMAR et al, 2011; BOURAOUI et al, 2009). Estas enzimas apresentam dois sítios ativos, no mínimo, um para a GSH e o outro para os eletrófilos (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008). Com base nos substratos utilizados para medir a atividade enzimática, a GST é agrupada em quatro classes principais, porém a maioria dos estudos determina apenas a atividade da GST total, usando-se no ensaio enzimático o substrato sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), que pode ser conjugado com a GSH por todas as classes de GST (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Em peixes, muitos xenobióticos provocam indução da GST total, conforme foi observado por Jifa e colaboradores (2006) em fígado de robalo japonês (*Lateolabrax japonicus*) após exposição ao benzo(a)pireno (B(a)P) e ao surfactante dodecilbenzeno sulfonato de sódio, do mesmo modo que Palanikumar e sua equipe (2011) também verificaram em peixes-leite (*Chanos chanos*) expostos a B(a)P, em que propuseram que a GST total estaria envolvida na desintoxicação dos compostos, por apresentar alta atividade em brânquias, músculo dorsal e cabeça.

Sabatini e colaboradores (2011) mostram em seu trabalho o aumento da atividade da GST em glândulas digestivas de moluscos (*Diplodon chilensis*) alimentados com algas contaminadas com cobre (Cu) após quatro e cinco semanas. Alta atividade da GST também foi encontrada em fígados e rins de peixes da espécie *Channa punctatus* expostos a deltametrina (SAYEED et al, 2003). Os pesquisadores sugeriram que este aumento seria para fornecer proteção contra danos causados pelas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) assim como Rao (2006) também relata em seu trabalho com tilápias da espécie *Oreochromis mossambicus* expostas a RPR-II, um inseticida organofosforado (OP).

Segundo Elia e colaboradores (2006), que investigaram mudanças nas respostas antioxidantes de cascudo (*Ictalurus melas*) do Lago Trasimeno devido à bioacumulação de metais tóxicos e pesticidas organoclorados, conclui-se que a GST pode ser considerada um bom biomarcador para monitorar contaminação orgânica, como por PCB, visto que sua alta atividade pode estar relacionada à capacidade enzimática de contrabalancear o dano oxidativo

gerado por poluentes ou indicar grande produção de compostos derivados da fase I da biotransformação.

1.3 Enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx)

Muitos poluentes podem causar estresse oxidativo nos animais, que seria um desequilíbrio entre a formação e eliminação de ERO, tais como H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$). Essas espécies são produzidas em decorrência da interação do contaminante com o oxigênio molecular ou interferência do poluente em processos de transferência de elétrons em reações redox, ou gerados nos processos envolvidos em sua detoxificação (ALMEIDA et al, 2007). Estas ERO podem oxidar moléculas originando danos ao DNA, proteínas e lipídios (ALMEIDA et al, 2009), provocando alterações significativas no metabolismo podendo inclusive levar à morte celular.

Para se protegerem, os organismos aumentam a produção de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, de forma a interceptar as ERO formadas. As principais enzimas antioxidantes que constituem este sistema de defesa são: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (LOPEZ-BAREA; PUEYO, 1998; LOPES et al, 2001). Elas são importantes na metabolização de ERO em moléculas não reativas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

As SOD são um grupo de metaloenzimas que participam da primeira linha de defesa contra o dano oxidativo, catalisando a redução do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (Figura 3) (ATLI; CANLI, 2010). A enzima atua como o transportador de elétrons a partir de um radical a outro (JOSEPHY, 1997). A maioria das técnicas que mede a atividade da SOD utiliza-se da competição de um substrato sintético com a SOD pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A CAT é uma enzima encontrada dentro do peroxissomo da maioria das células e contém grupamentos heme que facilitam na degradação do H_2O_2 em O_2 e H_2O (Figura 3). Esta enzima pode atuar como agente oxidante ou redutor na reação, oxidando substratos orgânicos e inorgânicos (JOSEPHY, 1997). A função da CAT está ligada aos peroxissomos ou pequenos corpos associados ao metabolismo de ácidos graxos que gera H_2O_2 durante o processo. A decomposição do H_2O_2 evita a formação de $\text{HO}\cdot$ que danifica membranas (HUGGETT; KIMERLE; MEHRLE, 1992). Um método para medir a atividade da CAT é a análise em espectrofotômetro por meio do consumo de H_2O_2 .

A GPx catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e de peróxidos lipídicos à álcoois envolvendo a GSH como doadora de elétrons para a reação (Figura 3) (JOSEPHY, 1997). A GPx também desempenha papel importante na proteção de membranas contra danos causados pelas peroxidações lipídicas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

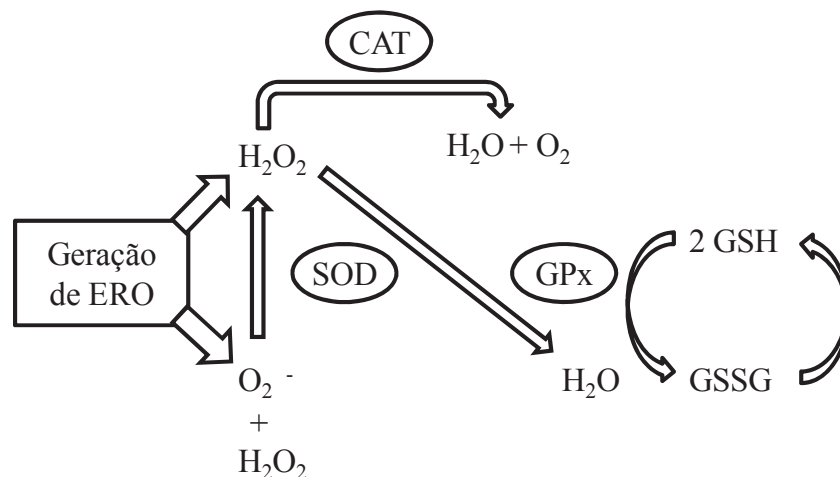


Figura 3 - Defesas enzimáticas antioxidantes.
Fonte: Adaptado de Hermes-Lima (2004).

Existem estudos que empregam a análise de sistemas enzimáticos antioxidantes como ferramenta no monitoramento de organismos frente à contaminação aquática, alertando a importância de se considerar a concentração destes compostos, pois estes xenobióticos influenciam nas respostas das enzimas (ATLI; CANLI, 2007; ALMEIDA et al, 2009). Muitos trabalhos relatam que o sistema antioxidante, em peixes, pode ser utilizado como biomarcador de contaminação. Cao e colaboradores (2010) indicaram que os biomarcadores oxidativos de peixes halibutes-bastardo (*Paralichthys olivaceus*) em diferentes fases de desenvolvimento foram afetados após exposição crônica a cádmio (Cd).

Atli e sua equipe (2006) sugeriram a CAT como um possível bioindicador do sistema de defesa antioxidante, pois após analisarem a atividade enzimática em fígado, rim, brânquias, intestino e cérebro de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a diferentes concentrações de Cu, Cd, zinco (Zn), prata (Pt) e cromo (Cr), observaram aumento e diminuição da atividade e sugeriram a utilização destas informações como banco de dados em pesquisas sobre sistemas antioxidantes em ambientes aquáticos.

Já Oruç e Usta (2007) propuseram que as enzimas antioxidantes neutralizaram o estresse oxidativo em carpas (*Cyprinus carpio*) após exposição ao diazinon, podendo assim, serem utilizadas como biomarcadores para determinar a toxicidade de pesticidas. Durmaz,

Sevgiler e Ünner (2006) relataram que a SOD e a GPx podem ser usadas como biomarcadores frente à exposição sub-letal e subcrônica ao diazinon em tilápias (*Oreochromis niloticus*). Em experimento de campo, Doyotte e colaboradores (1997) indicaram o sistema antioxidante como biomarcador para estimar os efeitos da contaminação em moluscos (*Unio tumidus*) de água doce. Da mesma forma, Atli e Canli (2010) propuseram a importância de se utilizar enzimas antioxidantes na prevenção dos efeitos causados por contaminantes, alertando sobre os possíveis danos que podem ser gerados ao meio ambiente e aos animais aquáticos devido à exposição.

1.4 Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica (LPO) é um processo que ocorre por meio do ataque de um radical livre a um ácido graxo insaturado presente em membranas lipoproteicas celulares, resultando na formação de um radical hidroperóxido lipídico que pode ser metabolizado gerando alcanos, alcenos, aldeídos entre outros. Um exemplo de aldeído comumente gerado como subproduto da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), sendo, portanto um indicativo do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

A peroxidação lipídica é uma seqüência de reações que pode ser dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, o ácido graxo insaturado é atacado por uma espécie reativa com a eliminação de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno. Em meio aeróbio o radical gerado se combina com o oxigênio formando um radical peroxila, o qual pode isolar um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo gerando outro radical, dando origem à etapa de propagação. Nesta etapa, o radical peroxila reage com o átomo de hidrogênio que foi isolado, formando um hidroperóxido lipídico. A última etapa, a de terminação, é realizada pela destruição dos radicais formados gerando produtos não radicalares (Figura 4) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999 apud LIMA; ABDALLA 2001).

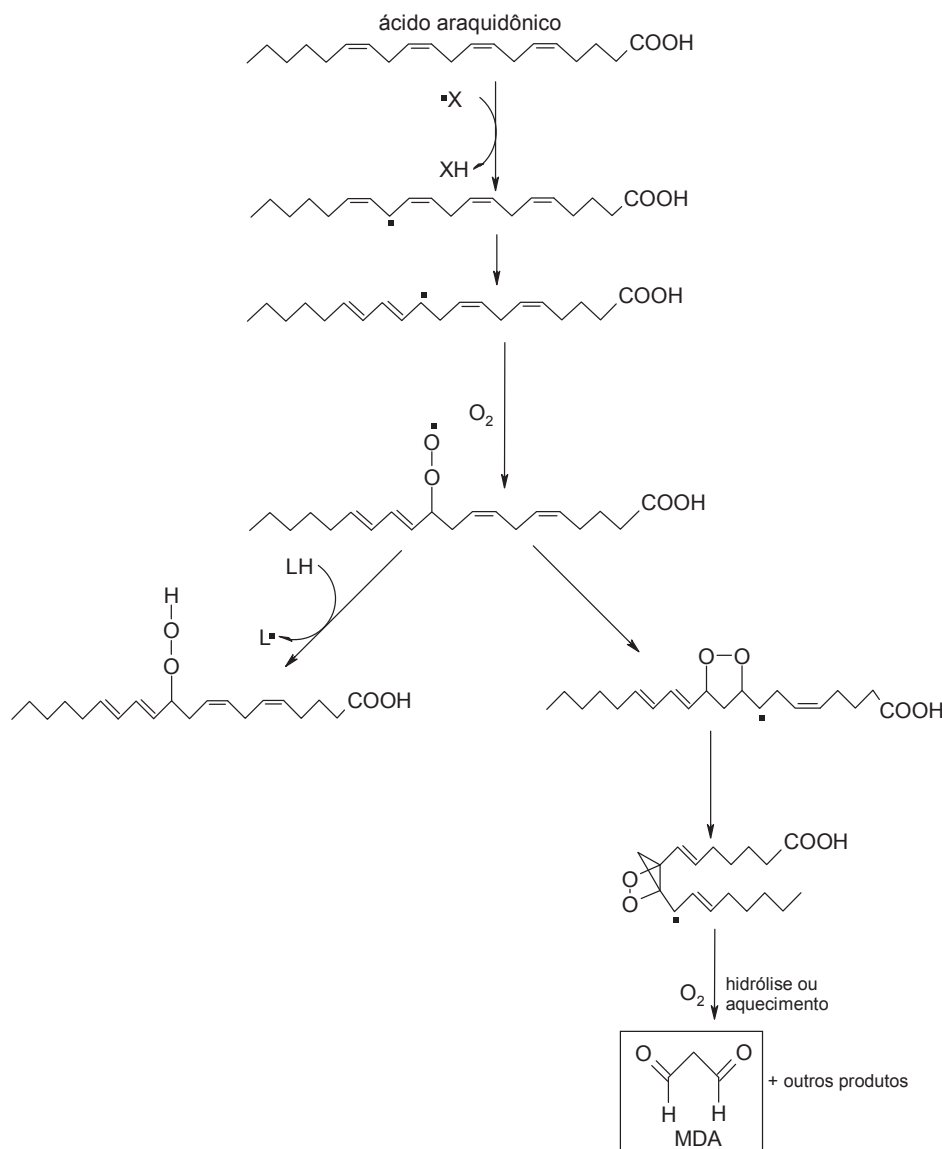


Figura 4 - Esquema geral da cadeia de reações da peroxidação de lipídeos levando à formação de aldeídos tais como o malondialdeído. X = radical.
 Fonte: Adaptado de Halliwell e Gutteridge (1991).

A peroxidação lipídica é uma consequência do estresse oxidativo (ORUÇ; USTA, 2007) ou da ineficiência das defesas antioxidantes (BOURAOUÏ et al, 2009). Em um estudo utilizando mexilhões (*Mytella guyanensis*), foram encontrados altos níveis de peroxidação lipídica quando coletados em locais supostamente contaminados por esgoto sanitário e industriais (TORRES et al, 2002).

Diferentes tecidos podem apresentar discrepâncias na susceptibilidade à peroxidação lipídica, dependendo da quantidade de lipídeos e do conteúdo de antioxidantes. Assim, o nível de peroxidação lipídica pode, por exemplo, ser mais elevado em tecidos com sistemas antioxidantes não muito eficiente como nas brânquias, em comparação com o fígado, aumentando sua vulnerabilidade em relação às ERO, como relatado por Fátima e

colaboradores (2000) em bagres (*Heteropneustes fossilis*), após exposição a esgoto industrial de fábrica de papel. Bouraoui e colaboradores (2009) relacionaram a alta atividade da CAT com aumento nos níveis de MDA em minhocas (*Hediste diversicolor*) após exposição ao Cu e B(a)P e sugeriram que o sistema de defesa antioxidante foi ineficiente. Do mesmo modo que Company e colaboradores (2006) observaram altos níveis de peroxidação lipídica em brânquias de mexilhões, propondo que os mecanismos de defesa (SOD, CAT, GPx) neste tecido não são completamente eficazes frente à contaminação por metais.

Palanikumar e sua equipe de pesquisa (2011) indicaram que o aumento no nível de peroxidação lipídica após exposição ao B(a)P e antraceno em peixes-leite (*Chanos chanos*) pode ter ocorrido porque as enzimas antioxidantes não eliminaram de forma eficaz os produtos intermediários H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$.

Oruç e Usta (2007) correlacionaram o aumento na peroxidação lipídica com a diminuição na atividade da acetilcolinesterase (AChE) após cinco dias de tratamento com diazinon em tecido muscular de carpas (*Cyprinus carpio*). Üner e sua equipe (2006) também associaram a inibição da atividade da AChE em cérebro de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com altos níveis de MDA após sete e 15 dias de exposição ao diazinon. Ainda, Pretto e colaboradores (2010) relacionaram a indução na peroxidação lipídica com a redução da AChE em cérebro de jundiá (*Rhamdia quelen*) após exposição ao Cd.

1.5 Esterases (AChE e CbE)

As esterases são enzimas capazes de hidrolisar ligações do tipo éster carboxílico de uma grande variedade de substratos. São classificadas segundo Aldridge (1953) em:

- *A*-esterases: enzimas que hidrolisam organofosforados;
- *B*-esterases: esterases que possuem o resíduo serina no sítio ativo e são inibidas por organofosforados e carbamatos;
- *C*-esterases: enzimas que não interagem com os organofosforados.

A AChE e a carboxilesterase (CbE) são do tipo *B*-esterases. Esta classe pode ser usada como biomarcador enzimático de exposição a pesticidas anticolinesterases, por estarem envolvidas na detoxicação destes compostos (ROY et al, 2005).

Em peixes, tanto no cérebro quanto nos outros tecidos (embora no cérebro seja a forma mais abundante), a AChE está envolvida na hidrólise rápida e efetiva do neurotransmissor acetilcolina em produtos inativos, como colina e ácido acético nas sinapses

nervosas (Figura 5). A acetilcolina é atraída para o sítio ativo da enzima em que o grupamento hidroxila da serina é acetilado. Após, ocorre a desacetilação e a enzima é novamente livre (FUKUTO, 1990).

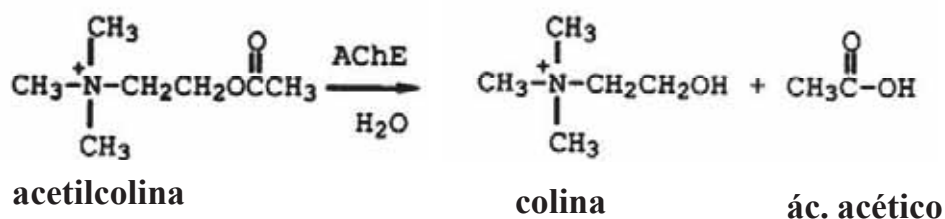


Figura 5 – Hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético por meio da AChE.
Fonte: Adaptado de Fukuto (1990).

O papel atribuído a inibição da AChE em análise ambiental é o efeito causado pela exposição aos pesticidas OP, carbamatos (CM) e metais. Há classes de compostos que exercem ação tóxica direta no sítio ativo da enzima. Entretanto, há OP que na sua forma inicial não são tóxicos, mas, quando metabolizados, esta ativação pode aumentar sua toxicidade (NUNES, 2011), como é o caso dos parathion, malathion, diazinon dentre outros, que são fracos inibidores de AChE por apresentar em suas estruturas P=S (JAKANOVIC, 2001).

Em ambientes contaminados por pesticida OP, o grupamento hidroxila da serina no sítio ativo da enzima é fosforilado. Assim, a enzima deixa de participar da hidrólise da acetilcolina, tornando-se irreversivelmente inibida (FUKUTO, 1990). Isto ocorre quando o pesticida OP é oxidado por enzimas MFO que modificam a ligação P=S (menos reativa) para P=O (Figura 6), gerando um átomo de fósforo mais eletropositivo e reativo, facilitando o ataque do fósforo pela hidroxila da serina da AChE. Muitos compostos já possuem o oxigênio no lugar do enxofre, é o caso do paraoxon, malaoxon, dentre outros (JAKANOVIC, 2001).

Organofosforado

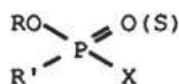


Figura 6 – Fórmula estrutural de um pesticida organofosforado.
Fonte: Adaptado de Fukuto (1990).

A inibição da atividade da AChE é muito utilizada em peixes para avaliação da neurotoxicidade gerada pela contaminação por OP, como mostra o trabalho de Oruç e Usta

(2007), em que observaram o efeito inibidor do pesticida diazinon em baixa concentração e durante um período de cinco, 15 e 30 dias em brânquias, e músculo de carpas (*Cyprinus carpio*). Para exposição à OP e CM, Dembélé, Haubruge e Gaspar (2000) também sugeriram a análise da AChE em cérebro de carpas (*Cyprinus carpio*) como uma boa enzima para se utilizar em programas de biomonitoramento.

Vieira e colaboradores (2008) indicaram que B(a)P, antraceno e óleos combustíveis possuem pelo menos um mecanismo neurotóxico em comum, pois, provavelmente, estes compostos rompem a transmissão colinérgica devido a inibição de AChE em diferentes tecidos de peixes caboz-comum (*Pomatoschistus microps*). O B(a)P também provocou redução da atividade enzimática em glândulas digestivas de mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) e os pesquisadores sugeriram uma possível neurotoxicidade (BANNI et al, 2010).

Em pesquisa com metais, a AChE também é utilizada como biomarcador. No trabalho realizado por Najimi e colaboradores (1997), foi medida a atividade da enzima em mexilhões (*Perna perna*) de uma região poluída por esgoto sanitário e industriais e observaram que após um dia de exposição ao Cd e Zn, a atividade desta enzima diminuiu significativamente. Assim, sugeriram que a AChE pode ser utilizada como biomarcador de efeito de metais. Do mesmo modo que Frasco e colaboradores (2005) mostraram a inibição significativa da AChE por Cu, Cd, Zn e mercúrio (Hg) em drosófilas (*Drosophila melanogaster*), indicando que quanto maior a concentração do metal maior é a redução da atividade enzimática.

A CbE tem múltiplas funções, como a hidrólise de uma série de ésteres de ácidos graxos e outros compostos tóxicos (CALDAS, 2000). Primeiro, o OP é ativado por meio da MFO, para formar a estruturada inibidora (P=O). Desta feita, o pesticida liga-se a esterase e é hidrolizado. Quando a esterase esta fosforilada, há duas opções: liberar o grupo fosfato e recuperar a atividade catalítica ou perder sua atividade ficando permanentemente ligado ao fosfato (WHEELLOCK et al, 2008). A CbE está presente em vários tecidos como fígado, pulmão, coração, rim, cérebro, dentre outros (BARRON et al, 1999).

O estudo *in vitro* feito por Leticia e Gerardo (2008) mostrou a inibição enzimática da CbE frente a exposição ao B(a)P e clorpirifos em diferentes tecidos de roncador-branco (*Haemulon plumieri*) e por meio destes resultados foi sugerido que esta enzima poderia ser empregada como biomarcador. Barron e colaboradores (1999) relataram que a atividade da CbE em peixes influencia no acúmulo e na toxicidade de pesticidas e de outros esteris que entram no ambiente aquático. Portanto, as B-esterases são classicamente utilizadas como indicadoras de exposição à OP, carbamatos e metais.

1.6 Fatores que afetam respostas entre organismos de uma mesma espécie

As diferentes respostas de animais aquáticos frente à contaminação podem ser influenciadas por fatores como temperatura, idade, estado nutricional, disponibilidade de oxigênio (ALMEIDA et al, 2009), dose, espécie, rota de exposição (ATLI; CANLI, 2010), entre outros. Fatores que não estão relacionados à contaminação podem provocar um impacto adicional nos sistemas enzimáticos e interferir nas respostas dos biomarcadores, quando essas condições não são analisadas ou controladas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Figueiredo-Fernandes e colaboradores (2006) sugeriram que o gênero (machos ou fêmeas) de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) influencia em alguns parâmetros bioquímicos como a SOD e GST após 45 dias de exposição ao pesticida paraquat e estes efeitos podem ser vistos em diferentes temperaturas.

Por outro lado, Lopes e colaboradores (2001), relataram que o pH, clima e condutividade são fatores que podem influenciar de diferentes maneiras a biodisponibilidade de elemento ou substâncias presentes no ambiente aquático. Sugerem também que a maturação das gônadas de peixes da espécie *Leuciscus alburnoides* pode refletir nas atividades de diversas enzimas.

Segundo Flammarion, Noury e Garric (2002) e Pathiratne, Chandrasekera e Seram (2008) a atividade da colinesterase pode ser influenciada pelo porte do animal. Quanto maior o animal, maiores seus estoques de gordura, aumentando assim a possibilidade de bioacúmulo de compostos tóxicos, deixando-os bioindisponíveis para exercerem efeitos tóxicos, o que pode explicar a maior toxicidade encontrada para muitas substâncias, numa mesma concentração, para animais de menor porte em relação a animais maiores. Além disso, animais maiores possuem proporcionalmente maiores volumes de órgãos, muitos deles relacionados à metabolização de compostos tóxicos. Assim, animais com fígado maior, por exemplo, podem apresentar uma maior taxa de metabolização de compostos tóxicos, apresentando menos sintoma de intoxicação que animais menores, com menor potencial de metabolização.

Além disso, sabe-se que muitos dos sistemas de defesa do organismo contra intoxicações variam de expressão e atividade de acordo com o desenvolvimento (HWANF; LIN, 1995; PHILLIPS; SUMMERFELT; ATCHISON, 2002), o que muitas vezes explica os diferentes graus de susceptibilidade de animais de uma mesma espécie a uma mesma concentração de um contaminante, ao longo do desenvolvimento.

Na Bacia do Laranjo, rio Aveiro (Portugal), região altamente contaminada por mercúrio, foi observado que em moluscos da espécie *Scrobicularia plana* entre 2-5 anos, os considerados desenvolvidos (cinco anos) apresentaram nível de mercúrio total maior em comparação aos de dois anos. Ahmad Pacheco e Santos (2004) sugeriram que o aumento no acúmulo deste metal pode ter sido em função do crescimento do animal, pois a propensão de inibir as enzimas e aumentar o nível de peroxidação lipídica diminui com a idade.

Diferenças na resposta enzimática em função do porte do animal foram observadas por Chandrasekara e Pathiratne (2007), em que a fase de desenvolvimento de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) influenciou na redução da atividade cerebral de AChE, causada pela exposição a OP e CM. Essa inibição foi duas vezes maior em alevinos de 3-4 cm do que nas tilápias de 10-12 cm. Sugeriram, assim, que em programas de biomonitoramento é importante considerar o comprimento do organismo utilizado como biomarcador.

Este mesmo comportamento foi notado na atividade da EROD em peixes da espécie *Microgadus tomcod* em que no grupo de menor comprimento (15,0-19,9 cm), a atividade foi mais induzida em relação ao de maior tamanho (> 25,0 cm) quando expostos a PCB. Deste modo, Couillard e colaboradores (2004) propuseram que o tempo de vida e o comprimento dos peixes são fatores importantes a se considerar em estudos que utilizam a atividade da EROD como biomarcador de contaminação ambiental.

Do mesmo modo, Khan e Payne (2002) ao analisar a atividade da EROD em peixes da espécie *Pleuronectes americanus* expostos a efluentes de uma fábrica de papel e celulose, notaram que em adultos (225-420 g) a atividade foi significativamente induzida com relação aos animais imaturos (108-210 g). Sendo assim, também sugeriram que a atividade da EROD é influenciada pela maturidade dos peixes.

Desta forma, é importante levar em consideração o comprimento dos animais e a fase de desenvolvimento para se obter melhores resultados em estudos de campo e para compreender como se comportam os sistemas bioquímicos expostos a poluentes ambientais.

Em muitos estudos, é difícil coletar animais com portes estritamente similares, sendo que isto pode acarretar em respostas relacionadas ao tamanho ou estágio de desenvolvimento, e não respostas em decorrência apenas do contaminante, além de refletir grandes desvios padrões, o que dificulta a interpretação correta de dados. Entretanto, são poucas as espécies de animais aquáticos em que essas discrepâncias em relação ao porte do animal foram estudadas.

1.7 Organismo teste: Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A espécie *Oreochromis niloticus* (Peciforme, Cichlidae) (Figura 6), tilápia do Nilo, pertence à família dos ciclídeos. É oriunda da Bacia do rio Nilo, leste da África, e aparece espalhada por ambientes tropicais como Ásia, África e América do Sul (CHANDRASEKARA; PATHIRATNE, 2007). Foi introduzida no Brasil em 1971 da África Oriental (ROCHA-E-SILVA et al., 2004), devido à semelhança do clima, a sua abundância, crescimento acelerado, maturação e o uso intensivo na piscicultura (LINDE-ARIAS et al, 2008; FIGUEIREDO-FERNANDES et al, 2006; FUJIMURA; OKADA, 2007).



Foto 1 - *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo).

Autor: David Hodges.

Fonte: Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/peixe_doce1.php

As tilápias são peixes termofílicos cuja temperatura ideal para sua reprodução e crescimento varia entre 25°C e 30°C, mas, em temperaturas abaixo dos 15°C, o seu crescimento é afetado. A tolerância à temperatura também depende do tamanho do peixe. As tilápias jovens costumam ser mais tolerantes a temperaturas baixas que as adultas (PULLIN; LOWE-MCCONNELL, 1982).

São capazes de viver em habitats em que a salinidade atinge 30%, além de tolerar pH de 8 a 11 e oxigênio dissolvido abaixo de 0,1 mg L⁻¹. Possuem regime alimentar muito diversificado, incluindo algas, insetos, crustáceos, moluscos (SOUZA; TEIXEIRA-FILHO, 1985), cuja intensidade alimentar é máxima entre 12h e 15h, e posteriormente vai diminuindo gradativamente (PULLIN; LOWE-MCCONNELL, 1982).

Esta é uma espécie considerada muito agressiva. Este comportamento depende do tamanho do peixe, do tamanho do território (varia com o tamanho do macho e densidade da população) e do grau de isolamento (GOLDSTEIN, 1988).

Devido às características comentadas anteriormente, a tilápia é muito utilizada como organismos teste em programas de biomonitoramento de poluição aquática em regiões tropicais (CHANDRASEKARA; PATHIRATNE, 2007; PATHIRATNE; CHANDRASEKARA; SERAM, 2008; PEIXOTO et al, 2006; LINDE-ARIAS et al, 2008).

2 OBJETIVO

2.1 Geral

O objetivo principal deste estudo foi verificar as variações bioquímicas em diferentes tecidos de tilápias, da espécie *O. niloticus* de diferentes portes (tamanho e peso), expostas a contaminantes modelos, como o hidrocarboneto policíclico aromático benzo(a)pireno (B(a)P), o pesticida organofosforado diazinon e os metais cobre (Cu) e cádmio (Cd).

2.2 Específicos

Comparativamente, entre tilápias de diferentes portes:

- Avaliar o grau de estresse oxidativo gerado pela exposição a cada contaminante, diazinon, benzo(a)pireno, cobre e cádmio por meio das análises das enzimas antioxidantes catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase e por meio de níveis de peroxidação lipídica;
- Analisar os efeitos do pesticida e dos metais mediante as atividades das B-esterases acetilcolinesterase e carboxilesterase;
- Verificar o grau de indução de sistemas de biotransformação de xenobióticos na fase I e II com base nas análises de 7-etoxiresorufina O-desetilase e glutatona S-transferase, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Material biológico

Os organismos sentinelas utilizados na realização desta pesquisa foram *Oreochromis niloticus* (Peciforme, Cichlidae) machos (Foto 2), com três grupos diferentes de comprimento e peso (Tabela 1). Os espécimes foram cedidos pelo pescador Clube dos Trabalhadores Rurais, localizado na cidade de Catanduva e também pela professora Dr^a. Eliane Gonçalves de Freitas do Departamento de Zoologia e Botânica da UNESP de São José do Rio Preto. Os peixes foram levados ao Biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE - UNESP) e aclimatados por 15 dias em temperatura média de 28 °C.



Foto 2 - *Oreochromis niloticus* (Peciforme, Cichlidae).

Autor: Aline C. F. Rodrigues e Lilian Nogueira.

Fonte: Acervo do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LABCA).

Tabela 1 - Peso e tamanho dos peixes utilizados neste trabalho.

Grupo	Tamanho (cm) ± desvio	Peso (g) ± desvio
Jovens	6,30 ± 0,86	9,60 ± 3,71
Adultos de menor peso	13,77 ± 1,33	68,83 ± 13,29
Adultos de maior peso	17,08 ± 0,89	147,56 ± 26,13

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Bioensaio

Os bioensaios foram feitos em 20 aquários de 40 cm x 60 cm x 50 cm com seis divisórias, com capacidade para 17 L em cada. Para cada grupo controle e tratamento, dos

grupos dos adultos de menor e maior peso, foram utilizados um aquário, com cinco indivíduos em cada, porém para o grupo considerado jovem, foram utilizados dois aquários para controle e tratamento, pois a quantidade de tecido era insuficiente para as análises, sendo assim, cada amostra consistiu de tecidos de dois peixes. Deste modo, foram utilizados um total de 100 peixes durante todo o trabalho, com autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

O experimento foi feito em duas etapas, conforme disponibilidade dos aquários. Na primeira etapa foram utilizados 10 aquários sendo que cinco eram para o grupo adulto de menor peso e os outros cinco para o grupo adulto de maior peso. Na segunda etapa foram utilizados também 10 aquários, porém, para todo o grupo de peixes jovens (Figura 7 e Foto 3).

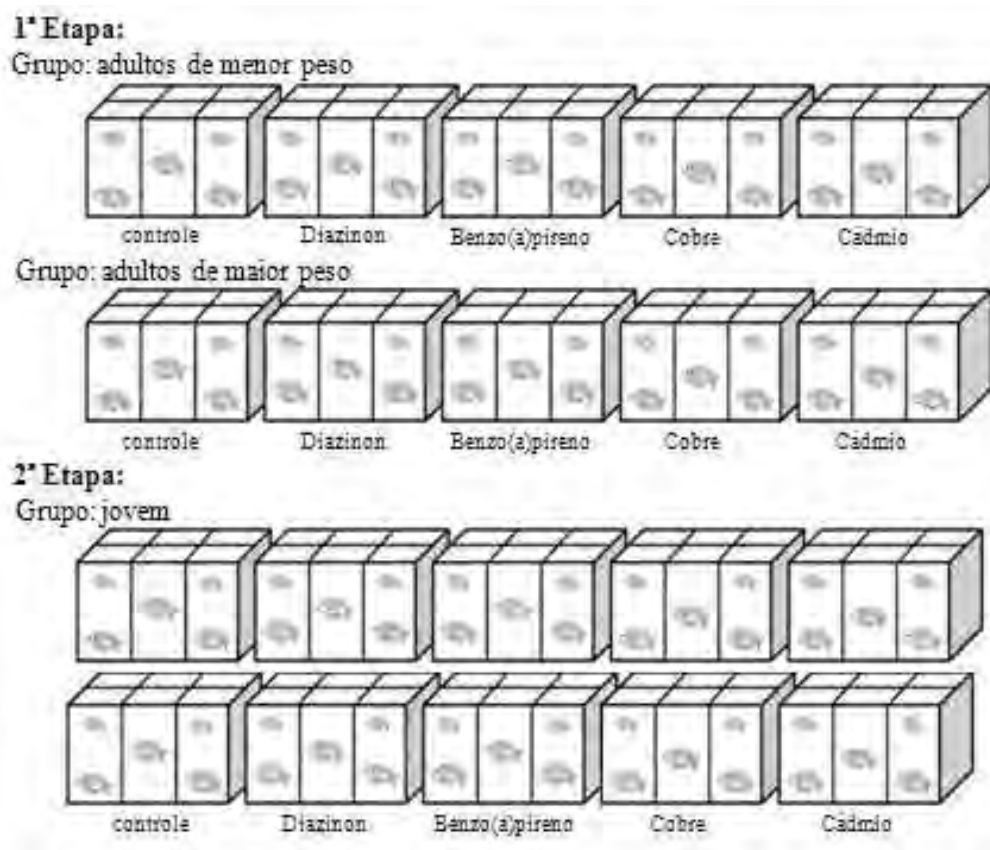


Figura 7 - Montagem do experimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.



Foto 3 - Aquários utilizados no experimento.
Autor: Daniele Caetano da Silva.
Fonte: Acervo do próprio autor.

As concentrações de diazinon, B(a)P, Cd e Cu foram seguidas segundo experimentos prévios feitos no laboratório, nos quais observou-se que foram suficientes para induzir respostas bioquímicas de forma significativa após três dias de exposição. As concentrações utilizadas foram:

- Controle: sem adição de contaminante;
- Diazinon: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$;
- Benzo(a)pireno: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$;
- Cobre (na forma de CuCl_2): $0,5 \text{ mg L}^{-1}$;
- Cádmio (na forma de $\text{Cd}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$): $0,5 \text{ mg L}^{-1}$;

Deste modo, os peixes foram expostos por três dias, quando então foram anestesiados com benzocaína (40 mg L^{-1}) e sacrificados para retirada dos tecidos (fígado, brânquias e cérebro - Foto 4) em que os parâmetros bioquímicos foram avaliados. As amostras de tecido retiradas foram congeladas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análise.



Foto 4 - Tecidos que foram removidos.
Autor: Aline C. F. Rodrigues e Lilian Nogueira.
Fonte: Acervo do LABCA.

Ao final dos experimentos, a água dos aquários foi tratada antes de ser lançada em esgoto comum, passando por filtros de carvão ativado para retirada dos resíduos tóxicos e as carcaças dos animais foram coletadas por empresa especializada em tratamento de resíduos biológicos.

3.3 Preparo das amostras para análise das enzimas AChE e CbE

As amostras de fígado, brânquias e cérebro foram pesados e homogeneizados na proporção 1:4 (massa: volume) em solução tampão Tris 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0). O homogeneizado foi centrifugado por 30 min. a 9.168 x g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e congelado à -80 °C para ser utilizado nas determinações das atividades da AChE e CbE.

3.4 Preparo das amostras para análise das enzimas CAT, GPx, SOD, GST e EROD

As amostras de fígado e brânquias foram pesadas e homogeneizadas (1:4, massa:volume) em solução tampão (20,0 m mol L⁻¹ de Tris; 1,0 m mol L⁻¹ de EDTA; 1,0 m mol L⁻¹ de DL-Ditiotreitol (DTT); 0,5 mol L⁻¹ de sacarose e 0,15 mol L⁻¹ de KCl em pH 7,5) contendo 1,0 m mol L⁻¹ de inibidor de protease *Phenylmethanesulfon Fluoride* (PMSF), em seguida, centrifugadas a 7.426 x g por 20 min. a 4 °C.

A porção sobrenadante foi coletada e submetida a uma segunda centrifugação por uma hora a 50.000 x g para obtenção das frações citosólica e microsomal. Na fração citosólica foram analisadas a atividade das enzimas CAT, GPx, SOD e GST. Na porção microsomal foram adicionados 100 µL de solução tampão (0,1 mol L⁻¹ de Tris; 1,0 m mol L⁻¹ de EDTA; 1,0 m mol L⁻¹ de DTT e 0,1 mol L⁻¹ de KCl em pH 7,5) em cada amostra para análise da atividade da EROD, como indicativo de atividade da isoforma 1A do citocromo P450.

3.5 Preparo das amostras para a análise da peroxidação lipídica

As amostras de fígado e brânquias foram pesadas e homogeneizadas (1:3 massa:volume) em solução tampão Tris, 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0. Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2 mol L⁻¹. As amostras foram incubadas por 40 min. a 90 °C. Em seguida, a reação do MDA com o TBA formou uma solução cor de rosa nas amostras que foram colocadas no gelo para resfriar a -10

°C e adicionado a cada uma delas 1,0 mL de álcool n-butílico. Logo após, foram centrifugadas a $1.123 \times g$ por 3 min. e coletados 700 μL do sobrenadante para posterior análise.

3.6 Análise da Acetilcolinesterase (AChE - EC 3.1.1.7) e Carboxilesterase (CbE - EC 3.1.1.1)

As atividades da AChE e CbE foram determinadas espectrofotometricamente de acordo com a metodologia de Ellman et al (1961), por meio do aumento na absorbância da amostra a 412 nm na presença de acetiltiocolina e ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) como substratos para a análise de AChE no fígado, brônquias e cérebro e para a análise de CbE, na presença do substrato feniltioacetato no fígado e brônquias.

3.7 Catalase (CAT - EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada por meio da decomposição de peróxido de hidrogênio em espectrofotômetro a 240 nm a 30 °C, de acordo com a metodologia de Beutler (1975). A diminuição na absorbância foi feita em cubeta contendo meio de reação (solução tampão Tris $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; $5,0 \text{ m mol L}^{-1}$ de EDTA (pH 8,0) e H_2O_2) e a amostra do extrato enzimático.

3.8 Glutathione Peroxidase (GPx - EC 1.11.1.9)

A GPx foi analisada pela técnica descrita por Sies et al (1979), utilizando meio de reação (solução tampão de fosfato de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e EDTA $5,0 \text{ m mol L}^{-1}$ em pH 7,0, glutathione redutase (GR), NADPH, GSH e água ultra pura). A atividade foi medida por meio do decréscimo de absorbância durante a redução da glutathione oxidada (GSSG), catalisada por GR, em presença de NADPH, monitorada a 340 nm por 1 min.

3.9 Superóxido Dismutase (SOD - EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi medida pelo método de McCord e Fridovich (1969) a 550 nm por 1 min. O meio de reação continha solução tampão fosfato de potássio 50 m mol L^{-1} (pH 7,8), $0,1 \text{ m mol L}^{-1}$ EDTA, citocromo c, $0,2 \text{ U}$ xantina oxidase (XO), solução de xantina e amostra. Na reação, o citocromo c e a SOD da amostra competiram entre si pelo superóxido,

gerado pelo sistema xantina/XO, por meio do aumento da absorbância.

3.10 *Glutathione S-transferase (GST - EC 2.5.1.18)*

A atividade da GST foi medida por meio do aumento da absorbância em 340 nm por 1 min. em espectrofotômetro de acordo com o método proposto por Keen, Habig e Jakoby (1976). A reação utilizou 200 m mol L⁻¹ de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 200 m mol L⁻¹ de GSH como substratos.

3.11 *7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)*

A atividade da EROD foi medida pelo método fluorimétrico na fração microsomal dos extratos protéicos do fígado e brânquias. O método fundamenta-se na formação de resorufina, que é fluorescente ($\lambda_{\text{excit}} = 537 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emiss}} = 583 \text{ nm}$) (BURKE; MAYER, 1983). À cubeta foram adicionados 1950 μL de solução tampão fosfato de potássio 80 m mol L⁻¹ (pH 7,4), 20 μL de solução de 7-etóxi-resorufina (335 $\mu\text{mol L}^{-1}$), 20 μL de NADPH (20 mmol/L) e 10 μL de extrato microsomal. A reação foi observada por 3 min., a 30 °C.

3.12 *Análise da peroxidação lipídica*

A análise foi feita por meio da detecção de HPLC-UV em 532 nm do produto formado entre o MDA e o TBA de coloração rosa, (ALMEIDA et al, 2003, 2004). Foram injetadas 20 μL de amostras de MDA-TBA e monitoradas a 535 nm por 10 min.

A fase móvel consistia de solução de fosfato de potássio monobásico 50 m mol L⁻¹ (pH 7,0) com 40% metanol, bombeada isocriticamente (1 mL min⁻¹). A coluna utilizada foi a LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μm de diâmetro de poro). Para quantificar o MDA formado, foi feita uma curva de calibração, injetada no HPLC, com concentrações conhecidas de MDA derivatizado com o TBA, em que os dados foram expressos em nmol de TBAR g⁻¹ de tecido.

3.13 *Análise de proteína*

A estimativa da concentração de proteína nos extratos foi feita segundo o método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão e lidas em 595 nm em espectrofotômetro.

3.14 *Análise estatística*

Os resultados das análises dos biomarcadores bioquímicos foram feitos com ajuda do *software* Statistica 7.0. Primeiro, foi realizado o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste do tipo ANOVA, seguido do teste *post hoc* de Tukey para comparação entre os tratamentos de um mesmo grupo e entre os controles dos três grupos. Para os dados que não apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. As diferenças encontradas entre os tratamentos foram aceitas significativas apenas os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Efeitos das exposições dos contaminantes nos biomarcadores

4.1.1 AChE

A Figura 8 ilustra a atividade da AChE nas brânquias, fígado e no cérebro de tilápias jovens, adultas de menor e maior peso, expostas a diazinon, B(a)P, Cu e Cd. Como pode se observar, nas brânquias, as tilápias adultas de menor peso apresentaram atividade significativamente maior no controle, em relação ao controle dos adultos de maior peso. No entanto, no fígado não ocorreu nenhuma diferença significativa nos controles. Já no cérebro, as diferenças estatísticas encontradas foram nas tilápias adultas de menor e maior peso com relação ao controle do grupo jovem.

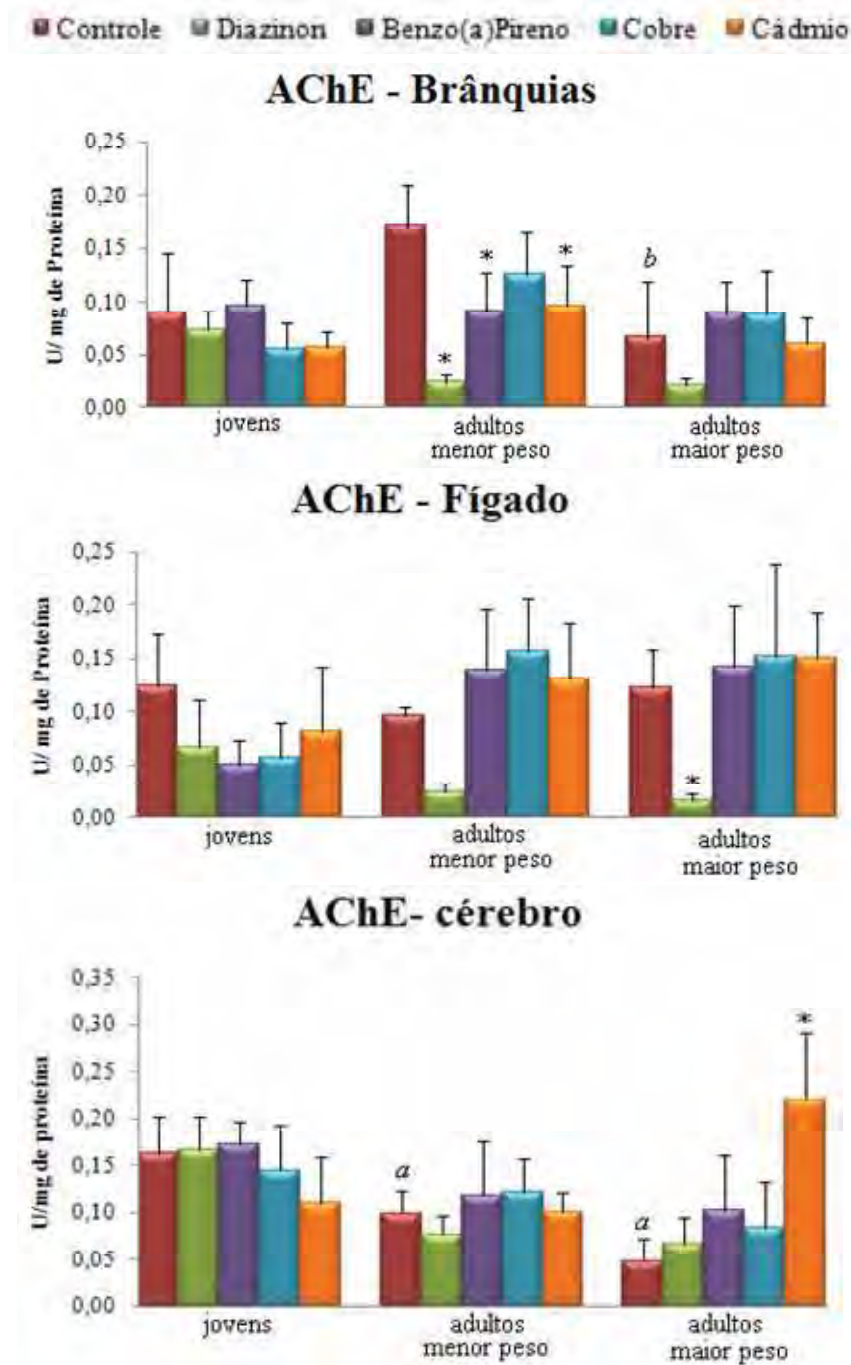


Figura 8 - Atividade da AChE em brânquias, fígado e cérebro de *O. niloticus*.

(*) Diferença significativa em relação ao controle. (a) Diferença significativa em relação ao controle do grupo dos jovens. (b) Diferença significativa em relação ao controle do grupo dos adultos de menor peso, para $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas tilápias jovens, adultas de menor e maior peso, a atividade da AChE foi inibida nas brânquias e no fígado pela exposição ao diazinon. Porém, a atividade da enzima no grupo dos adultos de menor peso, nas brânquias, e no de maior peso, no fígado, foram os que apresentaram resultado significativo. Muitos pesquisadores relataram a inibição da AChE em concentrações de 0,01 a 10,0 mg L⁻¹ de OP (DURMAZ; SEVGILER; ÜNER, 2006; LANG et

al, 1997; DEMBELE; HAUBRUGE; GASPAR, 2000; CHANDRASEKERA; PATHIRATNE, 2005), assim como foi constatado neste trabalho.

Desta forma, considerando as diferenças observadas na atividade da AChE entre os animais controle dos três grupos, o porte do animal influenciou na resposta. No caso de uma inibição, mais sutil, da enzima por concentrações menores do pesticida, provavelmente poderia ocorrer uma redução similar da enzima, entre os grupos. Possivelmente, refletiria em um efeito mais exacerbado naqueles peixes que já apresentaram níveis basais mais baixos da enzima (no caso, os adultos de maior peso).

Em relação aos tratamentos com B(a)P e Cd, ocorreu diminuição estatisticamente significativa da atividade da AChE nas brânquias do grupo de tilápias adultas de menor peso em comparação ao seu controle. O mesmo não foi observado nos outros grupos, para a exposição ao Cd.

Segundo Banni e colaboradores (2010), após 48 e 72h de exposição ao B(a)P, a atividade da AChE em glândulas digestivas de mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) foi inibida e não teve relação com as enzimas de fase I e II, do mesmo modo que foi verificado nesta pesquisa para a enzima de fase I. Eles sugerem que a inibição da AChE pode ser devido a exposição aguda do HPA (diariamente $19 \mu\text{g L}^{-1}$) visto que a enzima é considerada altamente sensível a mudanças bióticas e abióticas.

Por outro lado, Vieira e colaboradores (2008) analisaram o efeito do B(a)P na concentração de $0,016 \text{ mg L}^{-1}$ em peixes caboz-comum (*Pomatoschistus microps*) após 96h e observaram o dano provocado ao peixe por meio da inibição da atividade da AChE e da indução da GST em conformidade com os resultados obtidos para o grupo de tilápias adultas de menor peso.

Comparando-se os diferentes tecidos, os resultados mostraram que as brânquias responderam mais que o fígado e que o cérebro nas condições propostas. Tal fato pode ter ocorrido devido ao contato direto das brânquias com a água tratada com estes compostos. No caso da sensibilidade dos grupos de diferentes tamanhos, os dados puderam indicar a AChE como biomarcador enzimático para o grupo das tilápias adultas, em que nas brânquias o grupo adulto de menor peso apresentou mais resultados, já no fígado foi o grupo adulto de maior peso.

Para a atividade da AChE no cérebro, pode se notar redução da atividade enzimática para o controle e para os tratamentos com diazinon, B(a)P e Cu a medida que aumentou o porte dos peixes entre os grupos. Para a exposição ao Cd foi possível perceber também redução da atividade quando as tilápias passaram de jovens para adultas de menor peso. No

entanto, este resultado não foi observado no grupo adulto de maior peso, visto que a exposição ao Cd causou aumento significativo da atividade enzimática no cérebro.

Segundo Jebali e colaboradores (2006), o Cd ($50,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$) em concentrações baixas causou aumento significativo da AChE em cérebro de peixes Olho-de-boi (*Seriola dumerilli*) após dois dias de exposição. Da mesma forma, Gill, Teware e Pande (1991) verificaram indução da AChE em cérebro de peixes barbos rosado (*Barbus conchoni*) após 48h de exposição ao Cd. Comportamento semelhante também foi observado por Pretto et al (2010) após sete dias de exposição ao Cd ($0,236$ e $0,414 \text{ mg L}^{-1}$), em que a atividade da AChE no cérebro de jundiá (*Rhamdia quelen*) também foi induzida.

Provavelmente este aumento observado na atividade da AChE em cérebro de tilápias adultas de maior peso, indica que o Cd pôde melhorar a formação do complexo enzima-substrato (acetilcolina), aumentando a atividade enzimática ou que o metal interagiu com o neurotransmissor acetilcolina afetando a interação com a enzima e fazendo com que ela aumentasse sua síntese (BAINY et al, 2006).

Por outro lado, Frasco e colaboradores (2005) sugerem que metais como o Cu, Cd, Zn e Hg, causem inibição da atividade da AChE. Relatos tanto de aumento ou diminuição desta enzima frente a metais são comuns na literatura, e são geralmente explicados em função do tempo de exposição, em que o aumento da atividade enzimática é mais observado em exposições mais curtas, enquanto que inibições estão relacionadas a períodos mais prolongados de exposição. Os dados gerados no presente trabalho sugerem que o tecido analisado, o estágio de desenvolvimento e o porte do animal também podem exercer influencia nas respostas.

Muitos estudos também descrevem que a atividade da colinesterase em cérebro de espécies diferentes de peixes pode variar de acordo com o tamanho e idade (CHANDRASEKERA; PATHIRATNE, 2007; PATHIRATNE; CHANDRASEKERA; DE SERAM, 2008; KEIZER et al, 1995).

4.1.2 CbE

A Figura 9 apresenta dados referentes à atividade da CbE nas brânquias e fígado de tilápias com diferentes portes. Da mesma forma que a AChE nas brânquias, a CbE apresentou resultados parecidos com relação aos controles dos três grupos analisados, sendo que a diferença estatística significativa foi para os jovens e para os adultos de maior peso em

relação ao de menor peso. Foi inibida a atividade enzimática nas brânquias de tilápias adultas de menor e maior peso quando expostas ao diazinon.

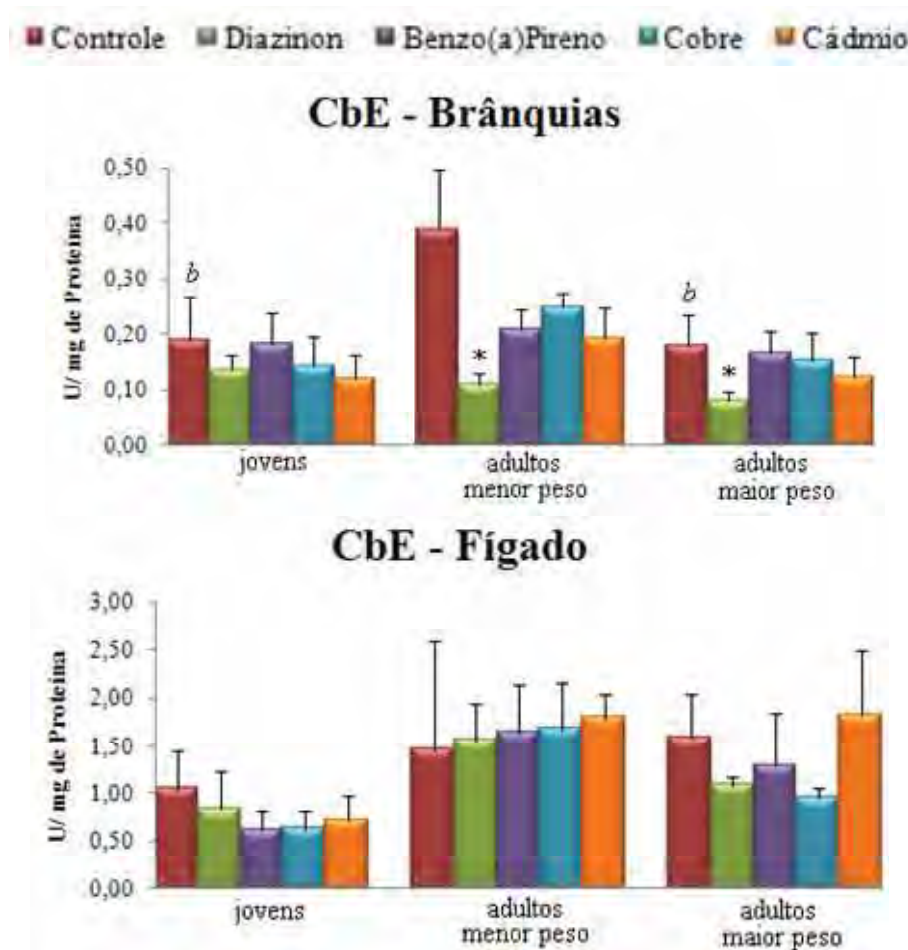


Figura 9 - Atividade da CbE em brânquias e fígado de *O. niloticus*.

(*) Diferença significativa em relação ao controle. (b) Diferença significativa em relação ao controle do grupo dos adultos de menor peso, para $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Fonte: Elaborada pelo autor.

Do mesmo modo que foi observado para a atividade da AChE, em relação à atividade da CbE, as brânquias foram mais responsivas que o fígado nas condições estabelecidas, provavelmente por estarem em contato direto com a água contaminada. Trídico e colaboradores (2010) constataram que a atividade da CbE de tilápias do Nilo foi inibida em brânquias após exposição por dois dias ao diazinon na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e não em fígado em conformidade com os dados apresentados nesta pesquisa, indicando que as esterases nas brânquias são mais sensíveis do que no fígado.

Para a atividade da CbE no fígado, não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum dos tratamentos (diazinon, B(a)P, Cu e Cd) entre animais de diferentes portes. É possível que a concentração usada e/ou tempo de exposição não tenham sido suficientes para

causar efeitos no fígado, indicando a necessidade de novos estudos sob outras condições experimentais. Segundo Barron e colaboradores (1999), os níveis de CbE encontrados em fígado de trutas arco-íris foram maiores que em outros tecidos, assim como observado no presente trabalho. Isto pode justificar uma maior sensibilidade das brânquias frente aos contaminantes.

Em relação à susceptibilidade dos grupos, novamente as tilápias adultas foram mais responsivas que as jovens nas condições propostas neste trabalho, em que nos grupos de menor e maior peso, apresentaram mais resultados, provavelmente as enzimas esterases são mais sensíveis em tilápias adultas que em jovens.

4.1.3 SOD

A Figura 10 ilustra a atividade da enzima SOD em brânquias e fígado de tilápias de diferentes portes, expostas aos contaminantes diazinon, B(a)P, Cu e Cd. Como se pode observar, não houve diferença na atividade enzimática no fígado dos três grupos, nem entre os respectivos controles. Estes resultados provavelmente indicam que a contaminação pelos contaminantes não provocou aumento na produção de radicais superóxidos como também não causou efeito na enzima antioxidante.

Com relação aos grupos controles nas brânquias, não ocorreu resultados estatísticos em nenhum dos grupos analisados. Entretanto, as brânquias se mostraram mais sensíveis que o fígado.

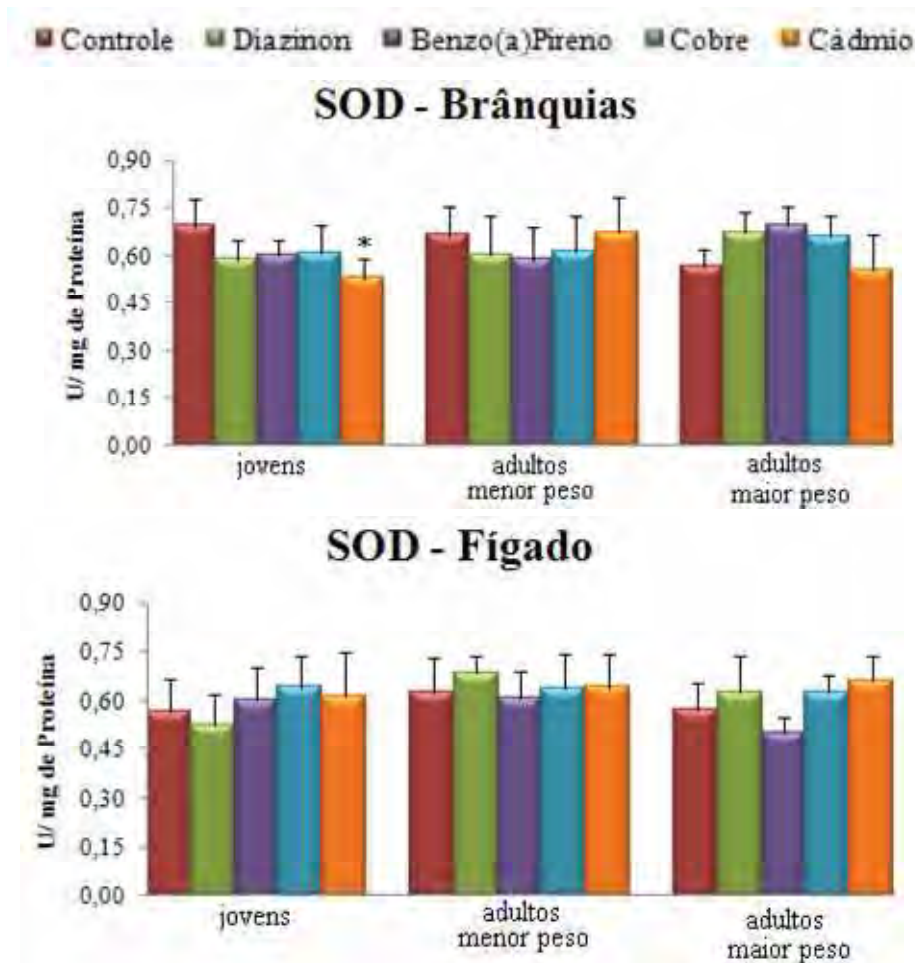


Figura 10 - Atividade da SOD em brânquias e fígado de *O. niloticus*.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Fonte: Elaborada pelo autor.

A SOD foi inibida nas brânquias do grupo das tilápias jovens, apenas para a exposição ao Cd. De acordo com Oruç e Usta (2007), o aumento ou diminuição do sistema antioxidante sob estresse, depende da intensidade e duração da exposição, e da susceptibilidade da espécie que está sendo submetida a esta condição. Peters e Livingstone (1996) observaram em embriões de peixes da espécie *Scophthalmus maximus*, com 11 dias de vida, que a atividade da SOD diminuiu após exposição ao Cd, durante o desenvolvimento do embrião e indicaram que não houve necessidade de detoxificar o radical O_2^{\bullet} .

Resultado semelhante também foi relatado por Cao e colaboradores (2010) quando expuseram por 80 dias larvas de peixes da espécie halibute-bastardo (*Paralichthys olivaceus*) a diferentes concentrações de Cd. Notaram que a $48 \mu g L^{-1}$ a atividade da SOD foi inibida. Por outro lado, quando halibutes jovens foram expostos ao Cd ($12, 24$ e $48 \mu g L^{-1}$) a SOD foi induzida. Deste modo, os pesquisadores sugeriram que mudanças na atividade da SOD, por meio da exposição ao Cd, podem ser afetadas por vários fatores, dentre eles estágio de

desenvolvimento, como é constatado no presente trabalho.

4.1.4 CAT

A Figura 11 ilustra a atividade da CAT em brânquias e fígado de *Oreochromis niloticus* em diferentes portes e expostas a diazinon, B(a)P, Cu e Cd. Para os grupos adultos de menor e maior peso não foram observados resultados significativos nos dois tecidos para nenhuma exposição. Por outro lado, foram apresentados no controle do grupo adulto de menor peso, para o fígado, e nos grupos dos adultos de menor e maior peso, para as brânquias, dados significativamente menores em relação ao controle do grupo jovem nos dois tecidos, indicando resultados diferentes durante a fase de desenvolvimento.

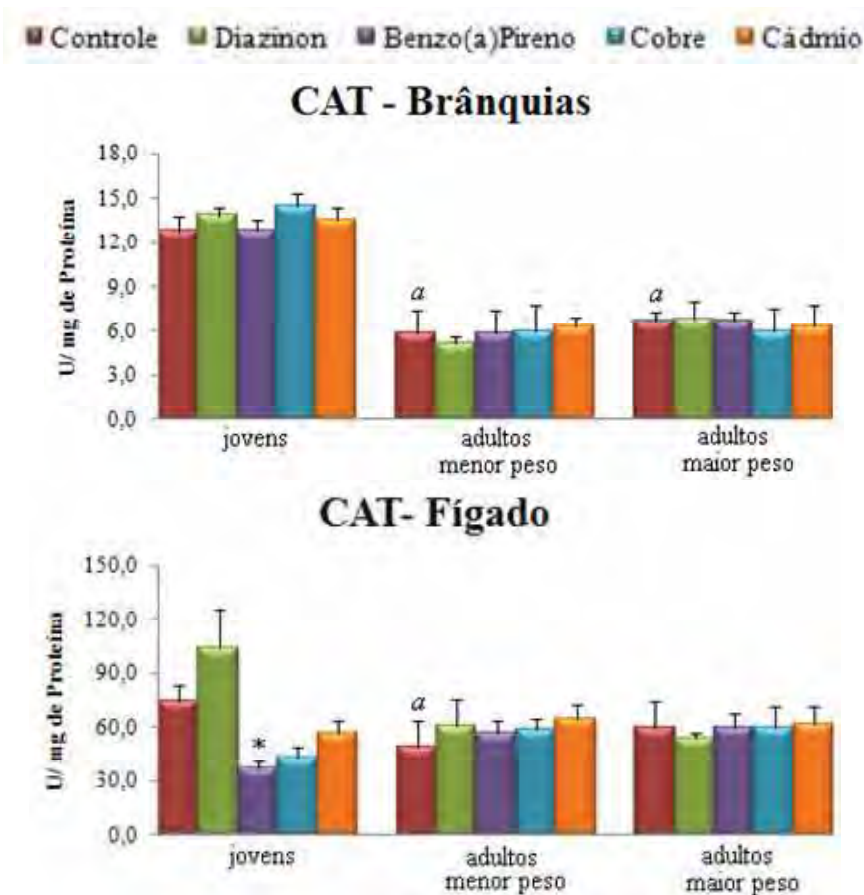


Figura 11 - Atividade da CAT em brânquias e fígado de *O. niloticus*.

(*) Diferença significativa em relação ao controle. (α) Diferença significativa em relação ao controle do grupo dos jovens, para $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Fonte: Elaborada pelo autor.

No grupo das tilápias jovens, a atividade da CAT foi significativamente inibida para a exposição ao B(a)P no fígado provavelmente, este resultado indica que este tecido não foi

afetado pela ação das ERO e não casou estresse oxidativo. Palanikumar e colaboradores (2011) observaram resultados opostos quando peixes-leite (*Chanos chanos*) foram expostos a B(a)P, 0,001; 0,004; 0,007; 0,014 e 0,031 mg L⁻¹, por 96h, em que a atividade da CAT foi induzida na cabeça, brânquias e músculos com o aumento das concentrações, assim, sugeriram que a CAT foi ativada por meio da conversão do H₂O₂ em H₂O.

Maria e Bebianno (2011) também observaram o aumento da atividade da CAT em glândulas digestivas de mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) após exposição por sete dias a 10,0 µg L⁻¹ de B(a)P, sugerindo que este resultado foi um sinal de que ocorreu estresse oxidativo gerado pelo metabólito do xenobiótico. Banni e colaboradores (2010) também notaram que após 24 e 48h de tratamento com B(a)P na concentração de 75 nM, a atividade da CAT nas glândulas digestivas de *Mytilus galloprovincialis* foi induzida, indicando que este efeito foi por conta dos metabólitos do B(a)P.

4.1.5 GPx

A Figura 12 apresenta a atividade da GPx em brânquias e fígado de tilápias jovens adultas de menor e maior peso expostas a diferentes contaminantes. Nas brânquias, as exposições ao B(a)P e ao Cu causaram inibição significativa da atividade da GPx no grupo dos adultos de menor peso. No fígado, os dados também foram semelhantes nos grupos das tilápias jovens e adultas de maior peso exceto para a exposição ao diazinon. Todos os tratamentos causaram inibição estatisticamente significativa em relação ao controle no grupo adulto de maior peso. Provavelmente, estas inibições podem provocar aumento da susceptibilidade das células a lesões oxidativas.

Entre os controles dos dois tecidos não ocorreram diferenças significativas entre os grupos. No entanto, os dados indicam que as tilápias adultas foram mais responsivas nas condições propostas que as jovens.

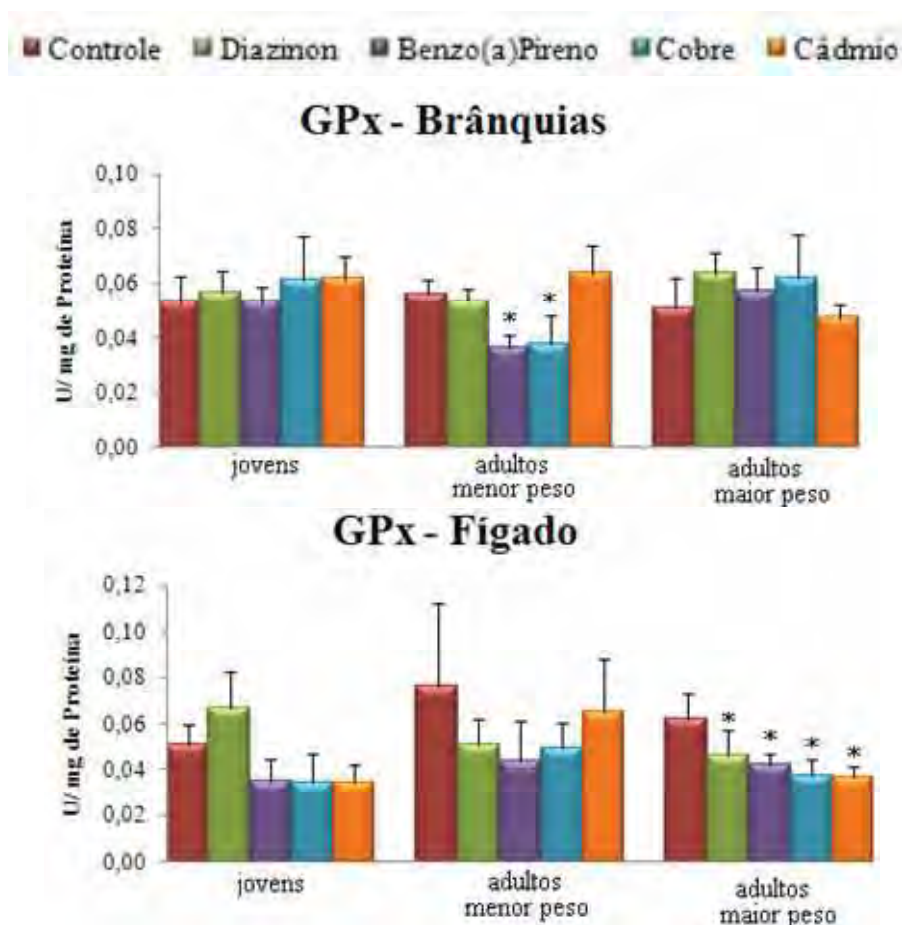


Figura 12 - Atividade da GPx em brânquias e fígado de *O. niloticus*.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Fonte: Elaborada pelo autor.

Vieira e colaboradores (2008) relataram que HPA são capazes de produzir $O_2^{\bullet-}$, em peixes da espécie *Pomatoschistus microps* após 96h de exposição ao B(a)P nas concentrações de 4, 8 e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$, que foi catalisado pela SOD convertendo-o em H_2O_2 , que em seguida degradado pela ação da CAT e GPx. No entanto, no presente trabalho não foi possível constatar esta hipótese provavelmente o B(a)P não gerou radicais superóxidos nas tilápias do Nilo.

As reduções observadas da atividade da GPx em brânquias e fígados podem indicar também que outras enzimas antioxidantes não testadas tenham sido eficazes contra a formação de ERO, contrabalanceando a diminuição de enzimas antioxidantes, tais como a GPx. Este resultado foi parecido com o estudo proposto por Atli e Canli (2010) em que a baixa atividade da GPx foi compensada pela alta da CAT após exposição de 48h pelo Cd (10 μM) em rim de tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

Para a exposição ao diazinon no fígado, a GPx foi inibida no grupo da tilapias adultas de maior peso. A diminuição da atividade enzimática também foi observada por Oruç e Usta

(2007) em rins de carpas coloridas (*Cyprinus carpio*) expostas a concentração de $0,018 \mu\text{g L}^{-1}$ de diazinon por 15 dias, em que propuseram que a redução da atividade indica ineficiência do tecido em neutralizar os danos provocados pelas ERO. Por outro lado, Durmaz, Sevgiler e Üner (2006) sugeriram que a CAT e a GPx pode competem entre si pelo mesmo substrato o que gerou no caso uma redução na atividade da GPx do trato digestivo de tilápias do Nilo após um e 30 dias de exposição ao diazinon (1 e 2 mg L^{-1}).

No grupo das tilápias adultas de maior peso o Cd e o Cu também provocaram redução na atividade da enzima. Almeida e colaboradores (2009) observaram diminuição da GPx em fígado de tilápias do Nilo após 96h de exposição ao Cd ($0,75 \text{ mg L}^{-1}$), Liu e sua equipe (2006) também notaram inibição da atividade, entretanto, para fígado de peixe dourado (*Carassius auratus*) após 40 dias de tratamento com Cu nas concentrações de $0,005$ e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, indicando que o acúmulo de H_2O_2 é capaz de prejudicar a função CAT e GPx.

4.1.6 MDA

A Figura 13 mostra os dados relativos à análise de MDA nas brânquias e no fígado de tilápias do Nilo com diferentes portes. Nenhum dos grupos expostos aos contaminantes apresentou variações significativas no nível de MDA no fígado. No entanto, entre os controles, o grupo das tilápias jovens apresentou redução estatística nos níveis de MDA formado com relação às adultas de menor peso.

Nas brânquias o grupo adulto de maior peso apresentou níveis menores e significantes em relação ao controle dos adultos de menor peso, mesmo este apresentando elevado desvio padrão. Estes resultados sugerem que em estudo de campo é importante considerar o porte dos indivíduos de uma mesma espécie, pois, respondem de forma diferente visto que foi comparado, neste caso, tilápias jovens e adultas.

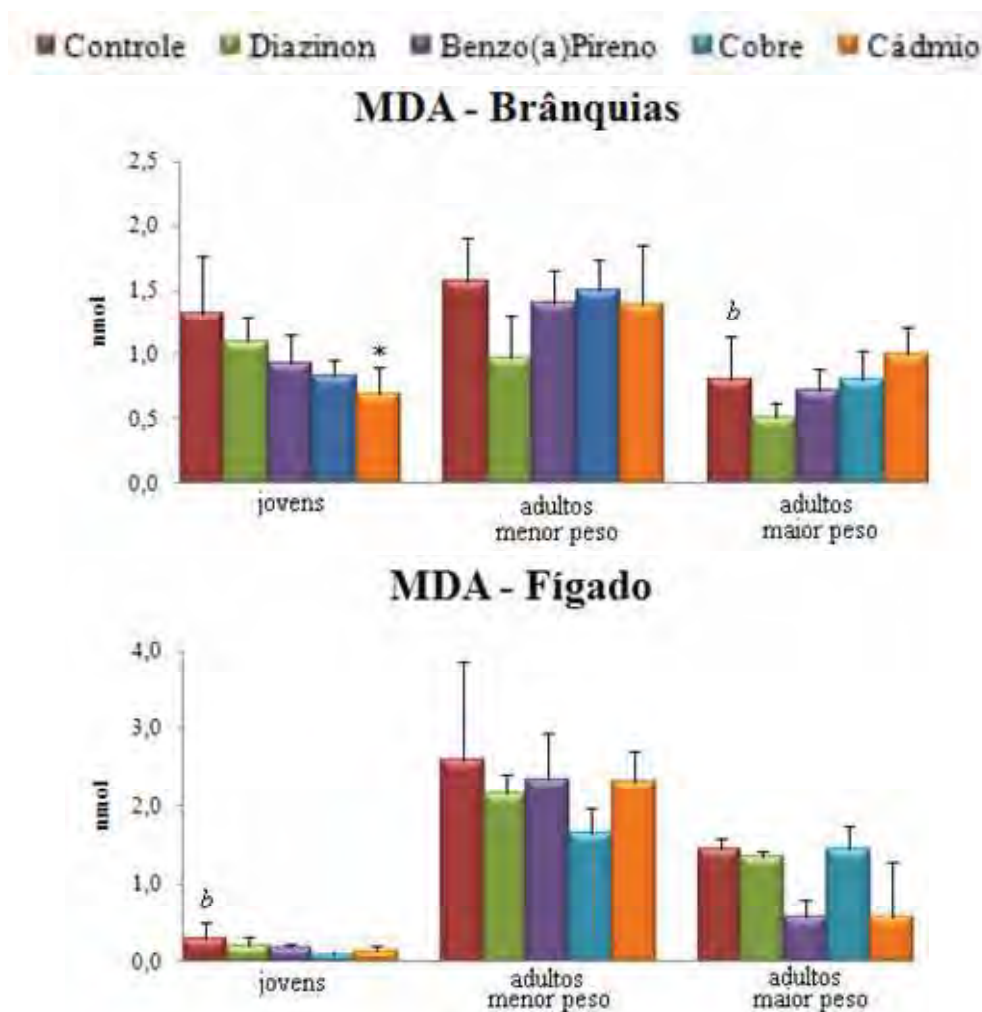


Figura 13 - Nível de MDA em brânquias e fígado de *O. niloticus*.

(*) Diferença significativa em relação ao controle. (b) Diferença significativa em relação ao controle do grupo dos adultos de menor peso, para $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Fonte: Elaborada pelo autor.

Não foi possível observar, no presente estudo, a relação entre as alterações nas enzimas antioxidantes analisadas e os níveis de peroxidação lipídica no fígado de tilápias. Pode ser que outras enzimas antioxidantes não analisadas nesse trabalho tenham apresentado aumento de atividade, o que ocasionaria uma maior proteção celular, causando diminuição dos níveis de MDA.

Os níveis de MDA foram reduzidos nas brânquias do grupo de tilápias jovens, no entanto, apenas para a exposição ao Cd foi significativa. No estudo feito por Almeida e colaboradores (2009), foi observado aumento significativo no nível de lipoperoxidação em fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostos por dois dias a Cd ($0,75 \text{ mg L}^{-1}$). Como o presente trabalho apresentou resultado oposto, isto pode indicar que a concentração de Cd usada, não afetou os grupos.

Foi possível perceber a relação entre as enzimas antioxidantes testadas e os níveis de

peroxidação lipídica nas brânquias. No grupo das tilápias jovens, a CAT e a GPx foram levemente induzidas pelas exposições ao Cu e Cd o que provavelmente provocando redução no nível de MDA. Segundo Bouraoui e colaboradores (2009), o Cu provocou indução da atividade de CAT simultaneamente com aumento nos níveis de peroxidação lipídica em anelídeos *Hediste diversicolor* após 36h de exposição. Deste modo, eles sugeriram que esta defesa antioxidante foi ineficiente. Este resultado foi oposto ao desta pesquisa, possivelmente outras enzimas não testadas se mostraram eficientes, visto que os níveis de MDA formado para a exposição ao Cu no grupo das tilápias jovens nas brânquias foram levemente reduzidos.

No grupo de tilápias adultas de menor peso, esta relação pode ser feita pelas enzimas esterases testadas, como a AChE e CbE, que se mostraram ativadas pela exposição ao diazinon e que provavelmente tenha provocando uma leve diminuição no nível de MDA. Esta relação pode ser atribuída à eficácia da atividade da AChE e CbE nas brânquias para a proteção celular.

De acordo com Oruç e Usta (2007) uma diminuição na atividade da AChE com um aumento na peroxidação lipídica após exposição de cinco dias ao diazinon em músculo de carpas (*Cyprinus carpio*) indicou a participação de ERO no dano oxidativo celular provocado pela toxicidade do diazinon. No presente estudo, essa toxicidade não causou danos oxidativos nas brânquias de tilápias adultas de menor peso. O mesmo comportamento foi observado por Üner e colaboradores (2006) que após 24h de exposição a 1 mg L⁻¹ de diazinon, ocorreu redução nos níveis de MDA no cérebro de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) indicando o efeito protetor de sistemas antioxidantes.

Durmaz, Sevgiler e Üner (2006) também relataram a diminuição nos níveis de MDA no trato alimentar de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) após 7, 15 e 30 dias de exposição a 1 mg L⁻¹ de diazinon, sugerindo a provável decomposição do H₂O₂ pelas enzimas antioxidantes SOD e CAT.

Palanikumar e colaboradores (2011) sugeriram que altos níveis de peroxidação lipídica em peixe-leite (*Chanos chanos*), expostos ao B(a)P foram devido a não eliminação de forma eficaz, de produtos intermediários como H₂O₂ e O₂^{•-}, por meio de enzimas antioxidantes. No entanto, no presente trabalho, enzimas não testadas do sistema antioxidante, em tilápias de maior peso, provavelmente tenham desempenhado seu papel na defesa contra ERO para essa exposição, relacionando com uma leve redução no nível de MDA formado.

Estes resultados indicam que o sistema antioxidante das tilápias jovens foi mais eficiente que o das adultas nas condições testadas neste trabalho. Do mesmo modo, que as brânquias foram mais responsivas que o fígado.

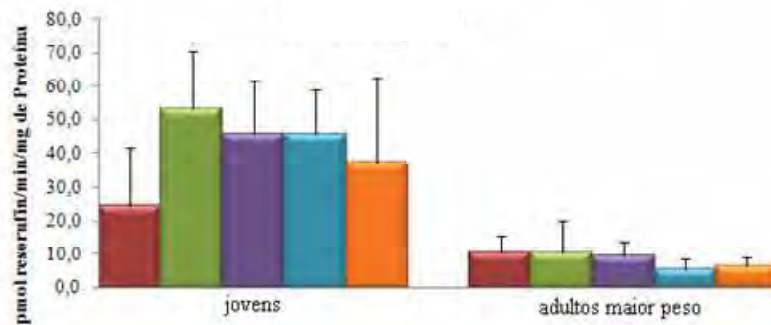
4.1.7 EROD

A Figura 14 ilustra a atividade da EROD no fígado e nas brânquias de *O. niloticus* de diferentes portes expostas a contaminantes. Nas brânquias foi observada baixa atividade da EROD (mesmo assim o grupo das tilápias jovens apresentou indução significativa para a exposição ao B(a)P e um leve aumento para o tratamento com diazinon, indicando a sensibilidade deste grupo e que é possível utilizar as brânquias para análise da atividade da EROD).

Estes dados também sugerem que os OP e os HPA podem ser reguladores de CYP1A em brânquias de tilápias jovens, visto que os dois compostos apresentam aromaticidade, uma importante característica na indução de CYP1A (WHEELLOCK et al, 2005). Como foi sugerido por Costa e colaboradores (2011) em sua pesquisa, as brânquias possuem uma rápida absorção de compostos presentes na água e provavelmente, este tecido trabalhe no metabolismo de primeira passagem de B(a)P.

■ Controle ■ Diazinon ■ Benzo(a)Pireno ■ Cobre ■ Cádmio

EROD - Fígado de jovens e de adultos de maior peso



EROD - Fígado de adultos de menor peso



EROD - Brânquias

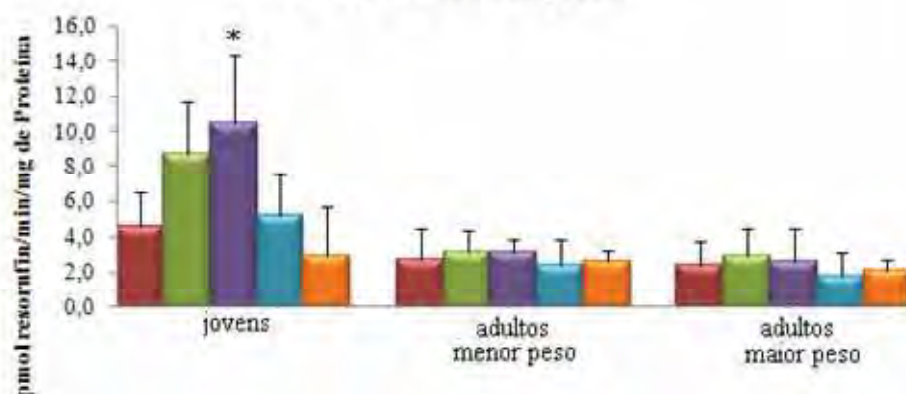


Figura 14 - Atividade da EROD em brânquias e fígado de *O. niloticus*.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação à atividade da EROD no fígado, era esperado um aumento significativo em todos os tratamentos com o B(a)P, pois em resultados anteriores do grupo, este HPA causou aumento significativo na atividade da EROD após três dias de exposição à mesma concentração (TRÍDICO et al, 2010), mas, este dado foi apenas observado no grupo de tilápias adultas de menor peso. Inúmeros trabalhos na literatura relatam um aumento expressivo da atividade da EROD em animais após exposição a diversos tipos de HPA, sendo

esta enzima, portanto, um clássico biomarcador para exposição à HPA.

Parente, De-Oliveira e Paumgarten (2008) relataram que tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie que apresenta uma boa resposta à indução de CYP1A no fígado. Em seu trabalho, expuseram tilápias (± 110 g) a poluentes indutores de CYP1A, como os HPA, e observaram que a atividade da EROD foi significativamente maior em comparação ao controle.

Entretanto, no presente estudo, a exposição ao B(a)P provocou indução na atividade da EROD no fígado apenas para o grupo de tilápias adultas de menor peso, aproximadamente 40 vezes maior que o controle. Resultados semelhantes foram observados em fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) jovens em que a indução da EROD foi por meio da exposição por sete dias e em diferentes concentrações de B(a)P (COSTA et al, 2011).

No estudo feito por Rocha-e-Silva e colaboradores (2004), a atividade da EROD foi avaliada. Porém, esta isoforma não foi considerada um bom biomarcador da presença de indutores de P450. Como utilizaram tilápias (*Oreochromis niloticus*) de alto peso (250–300 g) para biomonitorar a água do reservatório da represa Billings, provavelmente esta deve ser a justificativa para a falta de diferença significativa. Por outro lado, autores observaram essa diferença (BAINY et al, 1996) utilizando tilápias de peso entre 90-200 g. Estes resultados comprovam que a fase de desenvolvimento dos animais é um dos fatores que influenciam as atividades enzimáticas. Do mesmo modo que Khan e Payne (2002) sugeriram que a atividade da EROD é influenciada pela maturidade em peixes da espécie *Pleuronectes americanus*.

Já no grupo jovem e no adulto de maior peso, as atividades apresentaram um valor bem mais baixo que o grupo adulto de menor peso. Tilápias de maior peso possuem proporcionalmente um fígado de maior volume, que, conseqüentemente, apresentará uma bateria maior de enzimas para a metabolização do B(a)P, talvez não sendo assim necessária uma indução significativa de enzimas do P450 para lidar com a intoxicação. Além disso, por serem maiores, possuem também maior quantidade de gorduras, fazendo com que uma maior quantidade do HPA se acumule, e deixando assim uma porção menor do mesmo disponível para exercer seus efeitos tóxicos ou talvez, outras enzimas da família do P450 tenham biotransformado o B(a)P.

No grupo das tilápias jovens esse baixo valor da atividade pode indicar que o sistema de biotransformação não esteja completamente formado para ser afetado pelos metabolitos do composto ou também, que outras enzimas do CYP450 tenham biotransformado o B(a)P. Assim, o conjunto destes fatores pode ter sido responsável pela resposta menos visível do B(a)P no fígado das tilápias jovens e de maior peso.

Com relação ao leve aumento observado no fígado e brânquias do grupo jovem para a exposição ao diazinon, Wheelock e colaboradores (2005), sugeriram que os níveis de proteína presentes em CYP1A de fígado de salmão Rei (*Oncorhynchus tshawytscha*) expostos a clorpirifos por quatro dias foram baixos indicando que quanto menor a quantidade de proteína maior a atividade enzimática.

Por outro lado, alguns trabalhos (FUKUTO, 1990) relatam que a inibição da EROD por OP é devido à dessulfuração do composto por CYP450, em que ocorre a liberação de um íon de enxofre que se ligará ao grupo heme do CYP450. Resultado oposto ao que foi encontrado nesta pesquisa (provavelmente, em função do bom desempenho das esterases no fígado e nas brânquias das tilápias jovens para a exposição ao diazinon). Assim, estes dados indicam que durante a fase de desenvolvimento as respostas são diferentes em relação às enzimas de fase I no processo de biotransformação.

4.1.8 GST

A Figura 15 mostra a atividade da GST nas brânquias e no fígado de *Oreochromis niloticus* jovens e adultas de menor e maior peso expostas a diazinon, B(a)P, Cu e Cd. Em relação ao controle do grupo jovem apenas o controle dos adultos de menor peso sofreu inibição significativa tanto nas brânquias como no fígado. Novamente estes dados demonstram que as respostas enzimáticas são diferentes ao longo do desenvolvimento das tilápias.

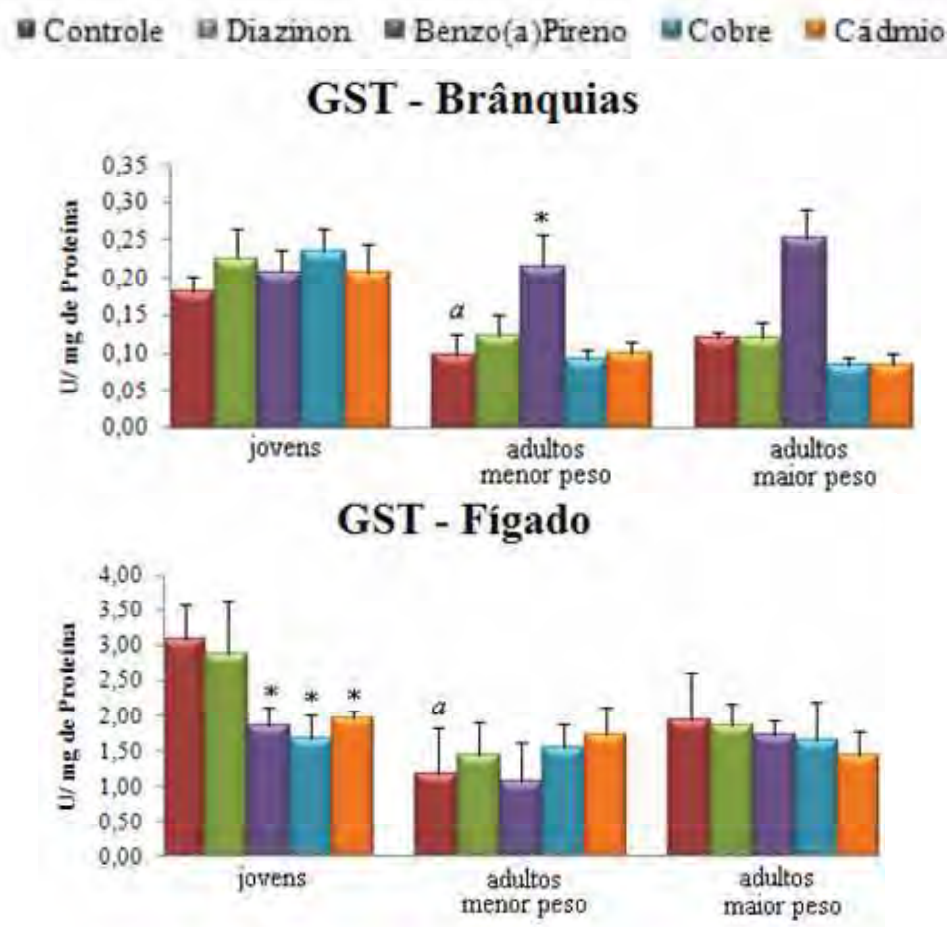


Figura 15 - Atividade da GST em brânquias e fígado de *O. niloticus*.

(*) Diferença significativa em relação ao controle. (a) Diferença significativa em relação ao controle do grupo dos jovens, para $p < 0,05$. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Fonte: elaborada pelo autor.

As exposições das tilápias jovens ao B(a)P, Cu e Cd inibiram a atividade enzimática no fígado. Estes resultados estão de acordo com os dados da pesquisa feita por Atli e Canli (2010) em que expuseram tilápias jovens (*Oreochromis niloticus*) a $10 \mu\text{M}$ de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 48h e observaram a redução da atividade da GST em fígado e sugeriram que o excesso de Cu oxida rapidamente a GSH.

Pretto e colaboradores (2011) relataram a inibição da GST em brânquias de jundiá (*Rhamdia quelen*) após 7 e 14 dias de exposição ao Cd (236 e $414 \mu\text{g L}^{-1}$), por conta da alta produção de radicais, provocada pela exposição ao metal. O mesmo comportamento foi obtido no fígado do grupo de tilápias jovem desta pesquisa.

Cao e colaboradores (2010) também observaram redução da atividade enzimática na fase de metamorfose de larvas da espécie de peixe *Paralichthys olivaceus* após 80 dias de tratamento com Cd, nas concentrações de 6 , 12 , 24 e $48 \mu\text{g L}^{-1}$, e informaram que esta inibição pode ser devido à ação direta ou indireta do Cd na enzima ou por meio da produção

de ERO que interage com a enzima ou pelo esgotamento da GSH.

Nas tilápias adultas de menor e maior peso ocorreu um grande aumento da atividade para a exposição ao B(a)P nas brânquias. No entanto, somente no grupo de menor peso, este aumento de atividade foi significativo. Este mesmo resultado também foi observado por Vieira e colaboradores (2008) em cabeças de peixes da espécie caboz-comum (*Pomatoschistus microps*) após 96h de exposição ao B(a)P (0,016 mg L⁻¹). Neste trabalho eles sugeriram que a conjugação por GSH esta envolvida na remoção de B(a)P indicando a alta afinidade do composto por receptor de hidrocarbonetos aromáticos da GST.

Do mesmo modo que Palanikumar e colaboradores (2011) sugeriram, quando observaram a indução da GST por conta do B(a)P (0,001; 0,004; 0,007; 0,014; 0,031 mg L⁻¹) após 96h, na cabeça, brânquias e músculo dorsal de peixe-leite (*Chanos chanos*). Bouraoui e sua equipe (2009) também notaram aumento da atividade da GST após 36 e 48h de exposição ao B(a)P (1 µM) em minhocas da espécie *Hediste diversicolor*.

No presente trabalho, a GST nas brânquias do grupo jovem indicou atenuação do dano oxidativo provocado pela exposição ao B(a)P. Sayedd e colaboradores (2003) relataram que altos valores na atividade de GST estão relacionados à proteção contra ERO. Por outro lado, resultado oposto foi observado no fígado do grupo de tilápias jovens. Assim, estes dados indicaram que, para esta enzima, o fígado foi mais responsivo que as brânquias.

5 CONCLUSÕES

Os resultados nos permitiram concluir que:

- A AChE no fígado e nas brânquias de tilápias adultas foi mais responsiva aos contaminantes, especialmente ao diazinon e ao cádmio, do que nas tilápias jovens. A CbE também foi a que mais apresentou respostas significativas nas tilápias adultas, entretanto, somente nas brânquias. Estes dados indicaram que as atividades das esterases a estes contaminantes podem ser influenciadas pela fase de desenvolvimento das tilápias, assim como do tecido analisado. Além disso, o aumento da AChE no cérebro do grupo adulto de maior peso exposto ao cádmio, diferente das inibições observadas para outros contaminantes nos outros grupos, mostrou também que o efeito de inibição ou indução pode ser dependente do composto ao qual o organismo é exposto, e/ou ao tempo de exposição.
- Com relação às enzimas antioxidantes analisadas, a SOD e a CAT apresentaram variações apenas no grupo de tilápias jovens, indicando que esse grupo pode ser mais suscetível ao estresse oxidativo gerado pelos contaminantes. No entanto, a atividade da GPx foi afetada no fígado das tilápias adultas de maior peso, e nas brânquias das adultas de menor peso. Apesar disso, não foram observados aumentos nos níveis de peroxidação lipídica em nenhum dos grupos, indicando que apesar dos efeitos negativos dos contaminantes nas defesas antioxidantes, isso não acarretou em prejuízos oxidativos causados por ERO nos indivíduos, nas condições testadas. As respostas variadas apresentadas pelas tilápias jovens, adultas de menor e maior peso podem indicar diferentes rotas de ação dos contaminantes em função de fatores intrínsecos como peso e estágio de desenvolvimento. Esses dados podem ser úteis para esclarecer as distintas susceptibilidades das tilápias aos efeitos tóxicos dos contaminantes, especialmente considerando que as atividades enzimáticas foram semelhantes entre os três grupos, apesar das diferenças significativas de peso entre os peixes.
- Em geral, todos os grupos experimentais estudados apresentaram níveis basais semelhantes na atividade das enzimas de fase I e II de biotransformação, independente do porte do animal e da fase de desenvolvimento. Entretanto, o grupo de tilápias jovens e o adulto de menor peso foram os únicos que apresentaram respostas significativas aos contaminantes, indicando que possivelmente as tilápias de maior peso provavelmente possuem níveis basais destas enzimas suficientemente altos para

lidar com as intoxicações. Por possuírem fígado maior, terão conteúdo mais elevado destas enzimas, e por apresentarem maior peso, usufruem de maior capacidade de distribuição e acúmulo dos xenobióticos em seus tecidos, deixando menos do composto biodisponível para exercer sua ação tóxica, ou para ser biotransformado.

- Dentre os tecidos avaliados, as brânquias foi o tecido que mais apresentou respostas, possivelmente por, estar em contato direto com a água, e isto deve ser levado em conta na análise dos resultados.

Desta forma, o porte e o estágio de desenvolvimento das tilápias afetaram os resultados, indicando que quando se emprega animais para biomonitoramento de contaminação ambiental é importante levar em consideração estes fatores, e sempre se utilizar grupos experimentais o mais uniforme possível para se evitar interpretações errôneas dos resultados.

REFERÊNCIAS

- AAS, E.; et al. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*, v. 51, p. 241-258, 2000.
- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 53, p. 290-302, 2004.
- _____; et al. Lipid peroxidation vs. antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury-Organ specificities and age effect. *Aquatic Toxicology*, v. 103, p. 150-158, 2011.
- ALDRIDGE, W. N. Serum esterases. *Biochemical Journal*, v. 53, p. 110-117, 1953.
- ALMEIDA, E. A.; et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 135, p. 295-303, 2003.
- _____; et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, p. 386-92, 2004.
- _____; et al. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*, v. 145, p. 588-600, 2007.
- ALMEIDA, J. A.; et al. Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, p. 103-108, 2009.
- ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 145, p. 282-287, 2007.
- _____. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 1884-1889, 2010.
- ATLI, G.; et al. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 143, p. 218-224, 2006.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. M. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Carlos: RiMa, 2003.
- BAINY, A. C. D.; et al. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*, v. 34, p. 151-162, 1996.

BANNI, M.; et al. Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 842–848, 2010.

BARRON, M. G.; et al. Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 18, p. 2506-2511, 1999.

BEUTLER, E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune & Stratton, 1975.

BOURAOUI, Z.; et al. Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in *Hediste diversicolor* exposed to copper and benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p. 1893–1898, 2009.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, B; et al. *Introdução à engenharia ambiental*. 2 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Differential effects of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction on the hepatic microsomal metabolism and cytochrome P450-binding of phenoxazone and a homologous series of its n-alkyl ethers (alkoxyresufins). *Chem-Biol Interaction*, v. 45, p. 243-258, 1983.

CAJARAVILLE, M. P.; et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, v. 247, p. 295-311, 2000.

CALDAS, L. Q. A. *Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides*. Rio de Janeiro: Centro de controle de intoxicações de Niterói, 2000.

CAO, L.; et al. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 151, p. 386–392, 2010.

CHANDRASEKERA, L. K. H. U.; PATHIRATNE, A. Response of Brain and Liver Cholinesterases of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, to Single and Multiple Exposures of Chlorpyrifos and Carbosulfan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 75, p. 1228-1233, 2005.

_____. Body size related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to chlorpyrifos and carbosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 67, p. 109-119, 2007.

COSTA, J.; et al. Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, v. 84, p. 1452–1460, 2011.

COMPANY, R.; et al. Hydrothermal vents as a possible natural pollution laboratory: metal detoxification mechanisms in mussels and fishes from Lucky Strike. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 1, p. 75-78, 2006.

COUILLARD, C. M.; et al. Reduction of cytochrome P4501A with age in Atlantic tomcod from the St Lawrence Estuary, Canada: relationship with emaciation and possible effect of contamination. *Aquatic Toxicology*, v. 68, p. 233-247, 2004.

DEMBÉLÉ, K.; HAUBRUGE, C.; GASPAR, C. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 45, p. 49-54, 2000.

DURMAZ, H., SEVGILER, Y., ÜNER, N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 84, p. 215-226, 2006.

ELIA, A. C.; et al. Bioaccumulation of heavy metals, organochlorine pesticides, and detoxication biochemical indexed in tissues of *Ictalurus melas* of Lake Trasimeno. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.76, p. 132-139, 2006.

ELLMAN, G. L.; et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.

FATIMA, M.; et al. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquatic Toxicology*, v. 49, p. 243-250, 2000.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; et al. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 85, p. 97-103, 2006

FLAMMARION, P.; NOURY, P.; GARRIC, J. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution*, v. 120, p. 325-330, 2002.

FRASCO, M. F.; et al. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, v. 10, p. 360-375, 2005.

FUJIMURA, K.; OKADA, N. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. *Development, growth & differentiation*, v. 49, p. 301-324, 2007.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, v. 87, p. 245-254, 1990.

GILL, T. S.; TEWARI, H.; PANDE, J. In vivo and in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoniis* Ham. (rosy barb) *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 100, p. 501-505, 1991.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Clarendon Press, 1991.

HENCZOVÁ, M.; et al. Detection of toxic effects of Cd²⁺ on different fish species via liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 385, p. 652-659, 2006.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism - regulation and adaptation*. Wiley-Liss. p. 319-368, 2004.

HODGES, D. 2011 Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo. Disponível em: < http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/peixe_doce1.php > Acesso em: 06 de jul. 2011.

HWANG, P. P.; LIN, S. W.; LIN, H. C. Different sensitivities to cadmium in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*; Teleostei). *Arch Environmental Contamination Toxicology*, v. 29, p. 1-7, 1995

HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE JR, P. M. *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Flórida: Bergman HL, 1992.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Química nova*, v.31, p. 1-10, 2008.

JEBALI, J.; et al. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 32, p. 93-98, 2006.

JIFA, W.; et al. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 65, p. 230-236, 2006.

JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, v. 166, p. 139-160, 2001.

JOSEPHY, P. D. *Molecular Toxicology*. New York: Oxford University Press, 1997.

KARAMI, A.; et al. The effects of intramuscular and intraperitoneal injections of benzo[a]pyrene on selected biomarkers in *Clarias gariepinus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2011),doi:10.1016/j.ecoenv.2011.05.012.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KEIZER J.; et al. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *The Science of the Total Environment*, v. 171, p. 213-220, 1995.

KHAN, R. A.; PAYNE, J. F. Some factors influencing EROD activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) exposed to effluent from a pulp and paper mill. *Chemosphere*, v. 46, p. 235-239, 2002.

LÁNG, G.; et al. Quantitative distributions of different cholinesterases and inhibition of acetylcholinesterases by metidathion and paraquat in alimentary canal of common carp. *General Pharmacology*, v. 29, p. 55-59, 1997.

LETICIA, A. G.; GERARDO, G. B. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, p. 787-797, 2008.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, p. 293-303, 2001.

LINDE-ARIAS, A. R.; et al. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *The Science of the Total Environment*, v. 399, p. 186-192, 2008.

LIU, H.; et al. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 65, p. 350-354, 2006.

LOPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutation Research*, v.399, p. 3-15, 1998.

LOPES, P. A.; et al. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *The Science of the Total Environment*, v. 280, p. 153-163, 2001.

MARIA, V. L.; BEBIANNO, M. J. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 154, p. 56-63, 2011.

MATSUO, A. O.; et al. Humic substances and crude oil induce cytochrome P450 1A expression in the Amazonian fish species *Colossoma macropomum* (Tambaqui). *Environmental Science Technology*, v.40, p. 2851-2858, 2006.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Biology Chemistry*, v. 244, p. 6049-55, 1969.

MUNRO, A. W.; GIRVAN, H. M.; MCLEAN, K. J. Variations on a (t)heme—novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Natural Product Reports*, v. 24, p. 585–609, 2007.

NAJIMI, S.; et al. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 58, p. 901-908, 1997.

NUNES, B. The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 212, p. 29-59, 2011.

ORELLANA, M. B.; GUAJARDO, V. T. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Revista Médica Chile*, v. 132, p. 85-94, 2004.

ORUÇ, E. Ö.; USTA, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 23, p. 48-55, 2007.

PALANIKUMAR, L.; et al. Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 75, p. 187–197, 2011.

PARENTE, T. E. M.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Induced cytochrome P450 activity in cichlid fishes from Guandu river and Jacarepaguá lake, Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Pollution*, v. 152, p. 233-238, 2008.

PATHIRATNE, A.; CHANDRASEKERA, L.W. H. U.; DE SERAM, P. K. Effects of biological and technical factors and brain and muscle cholinesterases in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: implications for biomonitoring neurotoxic contaminations. *Arch. Environmetal Contamination Toxicology*, v. 54, p. 309-317, 2008.

_____; PATHIRATNE, K. A. S. Use of biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to assess the impacts of pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 156, p. 361-375, 2008.

PEIXOTO, F.; et al. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 85, p. 91-96, 2006.

PETERS, L. D.; LIVINGSTONE, D. R. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot. *Journal of Fish Biology*, v. 49, p. 986-997, 1996.

PHILLIPS, T. A.; SUMMERFELT, R. C.; ATCHISON, G. J. Environmental, Biological, and Methodological Factors Affecting Cholinesterase Activity in Walleye (*Stizostedion vitreum*). *Arch. Environmetal Contamination Toxicology*, v. 43, p. 75-80, 2002.

PRETTO, A.; et al. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Arch. Environmetal Contamination Toxicology*, v. 58, p. 1008-1014, 2010.

RAO, J. V. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 143, p. 492–498, 2006.

RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environment International*, v. 27, n. 1, p. 27-33. 2001.

ROCHA-e-SILVA, T. A. A.; et al. Dynamics of cytochrome P450 inducers in polluted sites of Sao Paulo city reservoirs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 59, p. 109-115, 2004.

ROY, C.; et al. Plasma B-esterase activities in European raptors. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 41, p. 184-208, 2005.

SABATINI, S. E.; et al. Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 154, p. 391–398, 2011.

SAYEED, I.; et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 56, p. 295-301, 2003.

SIES, H.; et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett.* p. 287-290, 1979.

SILVA, K. T. U.; PATHIRATNE, A. In vitro and in vivo effects of cadmium on cholinesterases in Nile tilapia fingerlings: implications for biomonitoring aquatic pollution. *Ecotoxicology*, v. 17, p. 725-731, 2008.

TORRES, M. A.; et al. Oxidative stress in mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, p. 923-932, 2002.

TRIDICO, C. P.; et al. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v.73, p.858-863, 2010.

ÜNER, N.; et al. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 21, p. 241–245, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, 2003.

VIEIRA, L. R.; et al. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Science of The Total Environment*, v. 395, p. 87-100, 2008.

WALKER, C. H.; et al. *Principles of Ecotoxicology*. London; Taylor & Francis, 1996.

WHEELOCK, C. E.; et al. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, p. 117-178, 2008.

WHYTE, J. J.; et al. E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 30, p. 347-570, 2000.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura