

Daína de Lima

Estudo do efeito de metais em esterases de zebrafish
(*Danio rerio*)

São José do Rio Preto
2011

Daína de Lima

Estudo do efeito de metais em esterases de zebrafish
(*Danio rerio*)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração - 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
2011

Lima, Daína de.

Estudo do efeito de metais em esterases de zebrafish (*Danio rerio*) / Daína de Lima. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.
50 f. : il. ; 30 cm.

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

1. Genética animal. 2. Metais – Toxicologia. 3. Esterases. 4.
Peixe zebra. I. Almeida, Eduardo Alves de. II. Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas. III. Título.

CDU – 597.554.3

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

Daína de Lima

Estudo do efeito de metais em esterases de zebrafish
(*Danio rerio*)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Química, Área de Concentração – Química Ambiental, 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
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
UNICAMP – Limeira

Prof. Dr. Lilian Castiglioni
UNIRP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
10/agosto/2011

Dedico este trabalho
A meus pais, por todo o amor, força e apoio
em todos os momentos,
Às minhas irmãs, cuja alegria e amor continuam a
iluminar a minha vida,
À Tatiana, amiga e irmã que a vida me deu,
A todos meus poucos e verdadeiros amigos,
E ao meu orientador que me apoiou durante
toda a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador e grande incentivador desse trabalho, o Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida.
- À Dra. Lucilene R. Maschio e ao Prof. Dr. Altair B. Moreira, por terem feito parte da minha banca de qualificação, e assim, enriquecido esse trabalho.
- À Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro e Profa. Dra. Lilian Castiglioni, por gentilmente participarem dessa banca.
- A toda minha família pelo incentivo e carinho, e por sempre acreditarem na minha capacidade. Principalmente ao meu primo Geovanny, que a seu modo, sempre esteve ao meu lado.
- A todos os amigos do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática por todo o apoio e ajuda na realização de todas as etapas deste trabalho, por todas as risadas e piadas de depois das 18h, sempre as mais engraçadas! E em especial ao Gabriel M. Roque, que me auxiliou na realização deste trabalho.
- A todos os amigos que estiveram ao meu lado, me apoiando nos momentos difíceis e compartilhando os bons momentos.

RESUMO

Ambientes naturais próximos a áreas urbanas e industrializadas são comumente contaminadas com descargas de poluentes, as quais são muitas vezes compostas por agentes químicos que não são removidos por sistemas de tratamento de efluentes convencionais, resultando num grande aporte de substâncias potencialmente tóxicas no ambiente aquático. Os metais são componentes naturais presentes nos ecossistemas. Estes elementos são indispensáveis para processos bioquímicos e fisiológicos nos seres vivos. No entanto, muitos desses elementos, quando em níveis elevados, podem ter efeitos adversos na saúde humana. Sabe-se que as enzimas esterases são fortemente inibidas por praguicidas organofosforados (OP) e carbamatos (CM), porém estudos recentes apontam o potencial efeito de alguns metais como compostos interferentes na atividade das esterases. Portanto, a avaliação da inibição de esterases em organismos aquáticos tem sido amplamente utilizada como um indicador de contaminação ambiental por esses compostos. O presente trabalho teve como objetivo o estudo da interferência dos metais cobre, chumbo, ferro e cádmio, na atividade da acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE), em zebrafish. A AChE foi significativamente inibida *in vitro* pelo cobre, ferro, chumbo e cádmio nas maiores concentrações testadas (10 e 20 mmol/L), enquanto CbE foi inibida apenas na concentração de 20 mmol/L. *In vivo* somente o chumbo e o cádmio foram capazes de causar inibição na AChE nas maiores concentrações testadas, o ferro não causou nenhuma alteração e o cobre promoveu um aumento na atividade da AChE na concentração de 0,06 mg/L. A CbE não sofreu nenhuma alteração em nenhum dos tempos e concentrações testadas, exceto na exposição ao cobre, onde apresentou decréscimo em sua atividade. Além disso, de acordo com dados cinéticos obtidos, observa-se que todos os inibidores apresentam tipo de inibição mista. Entretanto o tratamento com iodoacetamida não alterou a atividade da AChE e CbE, o que não indicaria a presença de cisteínas próximas ao sítio ativo das enzimas de forma a causar uma possível inibição da mesma. Esses resultados indicam os metais como importantes inibidores de esterases em zebrafish, e devem ser considerados em estudos de monitoramento ambiental que utilizam a inibição de esterases como biomarcadores de exposição à OP e CM.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, carboxilesterase, metais, zebrafish.

ABSTRACT

Natural environments close to urbanized and industrialized areas are commonly contaminated by discharges of pollutants, which are often composed by chemicals that aren't removed by conventional wastewater treatment systems. Metals are natural components in the ecosystems, being essential to biochemical and physiological process in living organisms. However, if these elements are in excess, they can impose adverse effects on living organisms. Esterases are strongly inhibited by organophosphate (OP) and carbamate (CM) pesticides, but recent studies pointed to the potential effect of some metals as interfering compounds on the esterases activity. The present work aimed to study the interference of the metals copper, lead, iron and cadmium in the activity of acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CbE) in zebrafish. AChE was significantly inhibited *in vitro* by copper, iron, lead and cadmium at higher concentrations (10 and 20 mmol/L), whereas CbE was inhibited only at a concentration of 20 mmol/L. *In vivo*, only lead and cadmium were able to cause AChE inhibition at higher concentrations, iron didn't cause any changes and copper promoted an increase in the AChE activity at concentration of 0.06 mg/L. CbE activity did not change in any of the times and concentrations tested, except in the copper exposure, which showed a decrease in its activity. Furthermore, according to kinetic data obtained, it is noted that all inhibitors showed mixed inhibition type. Indeed, iodoacetamide treatment did not change AChE neither CbE activities, indicating that the metal inhibiting effect is probably not due to binding to thiol groups close the active site of the enzyme. These results indicate metals as important inhibitors of esterase in zebrafish, and should be considered in environmental monitoring studies that uses esterase inhibition as OP and CM exposure biomarkers.

Key-words: acetylcholinesterase, carboxylesterase, metals, zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar da espécie <i>D. rerio</i> utilizado nos experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	17
Figura 2 - Esquema da montagem dos experimentos de exposição <i>in vivo</i>	24
Figura 3 - Fotos da montagem dos experimentos de exposição <i>in vivo</i> aos metais.....	25
Figura 4 - Gráfico da variação da concentração de substrato para AChE.	27
Figura 5 - Efeito de diferentes volumes de amostra na atividade da AChE em vísceras de zebrafish (<i>D. rerio</i>).....	28
Figura 6 - Gráfico de estabilidade enzimática da AChE e CbE ao longo do tempo.	29
Figura 7 – Efeito <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de Fe e Cu na atividade da AChE e da CbE de vísceras de zebrafish (<i>D. rerio</i>).	30
Figura 8 – Efeito <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de Cd e Pb na atividade da AChE e da CbE de vísceras de zebrafish (<i>D. rerio</i>).	31
Figura 9 - Gráfico do duplo-recíproco para inibição da AChE pelo Cu e Fe.....	33
Figura 10 - Gráfico do duplo-recíproco para inibição da AChE pelo Pb e Cd.	34
Figura 11 - Efeito <i>in vitro</i> do clorpirifos (OP) e do carbaril (CM) na atividade da AChE e CbE em vísceras de <i>D. rerio</i>	36
Figura 12 - Efeito <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de Ácido Iodoacético na atividade da AChE e CbE em <i>D. rerio</i> em incubação de 30 e 60 minutos.	37
Figura 13 - Zimogramas mostrando bandas esterásicas de extratos protéicos <i>D. rerio</i> incubados com diferentes concentrações de Cu, Fe, Pb e Cd.....	38
Figura 14 - Efeito da diluição da AChE previamente incubada com os metais, em 30 vezes o volume de tampão de amostra.	39
Figura 15 - Atividade da AChE e da CbE em vísceras de zebrafish (<i>D. rerio</i>) expostos a 0,1 e 0,5 mg/L de chumbo e ferro por 2 e 7 dias. “B” e “b” indicam diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao grupo controle “A” e “a”	41
Figura 16 - Atividade da AChE e da CbE em vísceras de zebrafish (<i>D. rerio</i>) expostos a 0,02 e 0,06 mg/L de cádmio e cobre por 2 e 7 dias. “B” e “b” indicam diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao grupo controle “A” e “a”.	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição do gel de poliacrilamida 10%, não desnaturante.	23
TABELA 2 - Composição da solução descorante para gel de poliacrilamida.	24
TABELA 3 – Peso e tamanho dos peixes utilizados nas exposições <i>in vivo</i> de 2 e 7 dias.	25
TABELA 4 - Valores de IC ₅₀ da AChE frente a exposições <i>in vitro</i> aos metais e praguicidas.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OP – organofosforado

CM – carbamato

AChE – acetilcolinesterase

CbE – carboxilesterase

ACh – acetilcolina

TCh - tiocolina

DTNB – ditionitrobenzeno

TNB – 5-tio-2 nitrobenzeno

TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina

IARC – Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Câncer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Metais e a contaminação ambiental	12
1.2 Inibição de esterases como biomarcadores de contaminação aquática.....	14
1.3 Metais e a inibição de esterases	15
1.4 <i>Danio rerio</i>	16
2 OBJETIVOS	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 Material biológico.....	19
3.2 Reagentes.....	19
3.3 Processamento das amostras, análise das esterases e quantificação de proteínas	19
3.4 Estudos <i>in vitro</i>	20
3.4.1 Padronização dos ensaios das esterases.....	20
3.4.2 Testes de inibição <i>in vitro</i> das esterases de <i>D. rerio</i> pelos metais, iodoacetamida e praguicidas carbamato e organofosforado	21
3.4.3 Estudo da reativação das enzimas inibidas por diluição e determinação do tipo de inibição.....	21
3.4.4 Estudo das esterases por eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturante.....	22
3.5 Exposições <i>in vivo</i>	24
3.6 Análise estatística dos dados.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Estudos <i>in vitro</i>	27
4.1.1 Padronização dos ensaios das esterases.....	27
4.1.2 Testes de inibição <i>in vitro</i> das esterases de <i>D. rerio</i> pelos metais, iodoacetamida e praguicidas.....	30
4.1.3 Estudo das esterases por eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturante.....	37
4.1.4 Estudos de inibição por metais e reativação enzimática por diluição.....	39
4.2 Exposições <i>in vivo</i> e análises das esterases de <i>D. rerio</i>	40
4.3 Discussão integrada dos resultados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	43
5 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metais e a contaminação ambiental

Ambientes naturais próximos a áreas urbanas e industrializadas são comumente contaminados com descargas de poluentes, as quais são muitas vezes compostas por agentes químicos que não são removidos por sistemas de tratamento de efluentes convencionais, resultando num grande aporte de substâncias potencialmente tóxicas no ambiente aquático (ROMANI et al., 2003). A detecção de agentes químicos potencialmente perigosos nos recursos hídricos é feita por diversos métodos analíticos. No entanto, a identificação dessas substâncias lançadas na natureza, assim como seus metabólitos, pode representar um grande desafio, devido às inúmeras possibilidades de compostos que podem co-ocorrer num mesmo local de estudo, demandando um grande esforço de trabalho e muitas vezes necessitando de equipamentos analíticos sofisticados e de alto custo (AMORIM, 2003). Além disso, a caracterização das consequências biológicas da exposição a substâncias tóxicas com base apenas em análises químicas é muito difícil, devido às suas limitações na predição de efeitos sinérgicos e antagônicos de contaminantes, em misturas ambientais complexas. Por outro lado, ensaios biológicos são capazes de caracterizar os efeitos de contaminantes ambientais causados pelas exposições crônicas ou agudas, sem necessidade de conhecimento prévio dos componentes químicos presentes na água (BARBOSA et al., 2010).

Os metais são componentes naturais presentes nos ecossistemas. Alguns destes elementos são indispensáveis para processos bioquímicos e fisiológicos nos seres vivos. No entanto, muitos desses podem causar efeitos adversos à saúde humana (BARBOSA et al., 2010). A descarga de efluentes industriais e agrícolas contendo compostos potencialmente tóxicos como os metais são uma preocupação crescente nas últimas décadas devido aos seus efeitos adversos a longo e curto prazo na biota (HOLTH et al., 2008).

O chumbo (Pb) é considerado um contaminante ambiental devido seu amplo emprego industrial, como na indústria extrativa, petrolífera, de tintas e corantes, de cerâmica e bélica. A exposição a esse contaminante é devido à constante emissão pelas indústrias, ou ainda pela ingestão de alimentos sólidos e líquidos contaminados (DUARTE; PASQUAL, 2000). Os efeitos adversos que podem ser causados pelo Pb são bem conhecidos, incluindo sua ação no sistema nervoso. Alguns compostos de chumbo apresentam um potencial carcinogênico, o

que classifica esse elemento como um composto potencialmente cancerígeno para os humanos, de acordo com a Agência Internacional para a Pesquisa sobre Câncer (IARC) (RICHETTI et al., 2011).

O cádmio (Cd) é um elemento não essencial e sua distribuição é relativamente rara na crosta terrestre. Pode entrar no ambiente como sub-produto de refinação do zinco, combustão do carvão, resíduos de minas, processo de galvanoplastia, produção de ferro e aço, pigmentos, fertilizantes e praguicidas (USEPA, 2001). Além de não ser um elemento não essencial, o Cd é um elemento não biodegradável e possui alta persistência no ambiente e no organismo. Devido seu baixo potencial de biodegradabilidade, possui a propriedade de se bioacumular em sedimentos e organismos aquáticos (PRETTO et al., 2010). Os efeitos do cádmio sobre a saúde são inúmeros e variam desde dano renal, danos aos ossos e variados tipos de câncer, sendo também classificado pela IARC como cancerígeno para os seres humanos (RICHETTI et al., 2011).

O ferro (Fe) é um dos elementos químicos mais abundantes do planeta e em determinadas concentrações é um elemento essencial para a grande maioria dos seres vivos. O Fe está envolvido em diversos processos metabólicos como o transporte de oxigênio, o transporte de elétrons, a síntese de DNA e atua como cofator de muitas proteínas. Porém a sua forma livre pode ser tóxica, baseada no mecanismo de Fenton, onde o Fe pode reagir com intermediários reativos de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para produzir espécies altamente reativas, como o radical hidroxil ($\bullet OH$). Células do sistema nervoso possuem poucas defesas antioxidantes e podem ser alvos da toxicidade do Fe (SANT'ANNA et al., 2010; SALVADOR; URANGA; GIUSTO, 2011).

O cobre (Cu) é um metal amplamente utilizado em materiais de construção, em telhas de cobre e madeira tratada, na confecção de autopeças, como por exemplo, pastilhas de freio, e na formulação de praguicidas. Dessa forma, apesar de ser também um elemento essencial para os organismos vivos, o cobre é um potencial contaminante do ambiente aquático em áreas agrícolas e urbanas. Exposições de curta duração a esse metal podem interferir no olfato e no sistema sensorial de algumas espécies de peixes (BALDWIN; TATARA; SCHOLZ, 2011). Metais como o Cu, podem causar, também, anormalidades comportamentais em animais aquáticos, manifestadas como deficiência de natação (TILTON; BAMMLER; GALLAGHER, 2011).

Considerando todos os efeitos que os metais podem causar em organismos não alvo, faz-se necessária a busca de ferramentas eficazes para estudos de monitoramento ambiental, a

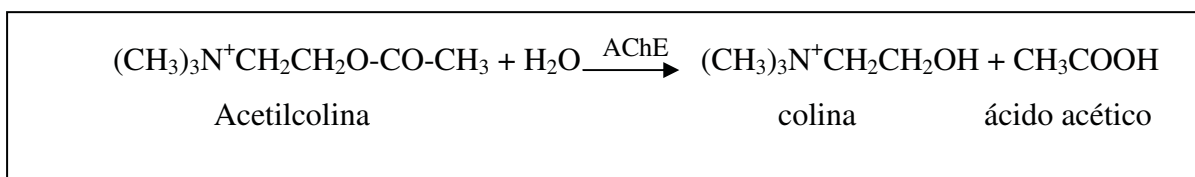
fim de detectar e minimizar essas potenciais fontes de contaminação. Uma ferramenta útil no monitoramento de ambientes aquáticos, que podem ser alvo da contaminação por metais e diversos outros compostos, é uso de biomarcadores de contaminação.

1.2 Inibição de esterases como biomarcadores de contaminação aquática

O termo *biomarcador* é utilizado de forma ampla, incluindo quase qualquer medida que possa refletir a interação entre o sistema biológico e um agente ambiental, que pode ser químico, físico ou biológico (AZEVEDO; CHASIN, 2003). A resposta biológica a mudanças causadas no ambiente sejam elas de origem antrópicas ou naturais, pode ser evidenciada em qualquer nível de organização, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares ou reações bioquímicas intracelulares (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Esterases representam um grupo de hidrolases que catalisam a clivagem e a formação de ligações do tipo éster (LIU et al., 2004). Sabe-se que as enzimas esterases, como a acetilcolinesterase (AChE) e a carboxilesterase (CbE), são fortemente inibidas por praguicidas organofosforados (OP) e carbamatos (CM), e também são afetadas por metais. Por isso a avaliação da inibição de esterases em organismos aquáticos tem sido amplamente utilizada como um indicador de contaminação ambiental por esses compostos (BAINY et al, 2006). Fatores como a sensibilidade a diversos contaminantes ambientais, o baixo custo de análise e a facilidade nos ensaios de quantificação, boa reprodutibilidade e sua relevância ecológica, tornam os estudos de inibição de esterases cada vez mais comum entre a bateria de biomarcadores mais utilizados na avaliação ecotoxicológica. (NUNES, 2011)

O principal papel da AChE é a hidrólise da acetilcolina (Reação 1), um éster liberado nas fendas sinápticas quando um impulso nervoso é transmitido de uma célula nervosa para outra. Ela é encontrada nos eritrócitos, sistema nervoso central e placa motora de músculos esqueléticos. Quando a AChE é inibida ocorre um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica causando hiperestimulação dos receptores de acetilcolina, o que impede a contração muscular normal (VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Em mamíferos a morte é causada por asfixia, mas a ação em organismos aquáticos é menos conhecida, uma vez que, enquanto a água estiver em contato com os órgãos respiratórios ocorre transferência de oxigênio (BARATA; SOLAYAN; PORTE, 2004).



Reação 1: Hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético, pela AChE, Adaptado de Miao et al., 2010.

As CbE, outra classe de esterases, hidrolisam ácidos graxos provenientes de xenobióticos, e acredita-se que tenham um papel importante na metabolização de diversos praguicidas, o que aumenta a tolerância dos organismos a estes compostos (BONACCI, 2004; VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007). CbEs são encontradas em muitos tecidos, incluindo fígado, pulmão, intestino delgado, coração, rim, músculo, cérebro, tecidos adiposo, nasal e respiratório, leucócitos e sangue. No entanto, sua atividade e expressão são dependentes do tecido e do organismo (WHEELLOCK, 2008). São também inibidas pelos praguicidas OP e CM.

1.3 Metais e a inibição de esterases

Um ponto interessante a ser abordado nos estudos de inibição de esterases é o comportamento dessas enzimas quando na presença de metais. Diversos autores têm demonstrado que metais são capazes de alterar significativamente a atividade de esterases em animais aquáticos, apesar de esta enzima ser na maioria das vezes usada como biomarcadora para exposição a praguicidas OP e CM (VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007; BARATA; SOLAYAN; PORTE, 2004).

Diversos estudos reportam efeitos opostos para metais específicos na atividade de esterases durante a exposição aguda de diferentes organismos. A exposição de organismos a metais pode resultar em estimulação, não alteração, ou diminuição da atividade da enzima, dependendo do tempo de exposição e das concentrações testadas (BAINY et al, 2006; RICHETTI et al, 2011; NAJIMI et al., 1997). Como exemplos, podemos citar o aumento da atividade da AChE em músculos esqueléticos e cérebro de peixes (*Barbus conchoni*) expostos a 12,6 mg/L de Cd por 48 horas (GILL; TEWARI; PANDE, 1991), sua diminuição em peixes (*Danio rerio*), expostos a 20 µg/L de Pb por 24 horas (RICHETTI et al., 2011).

Os mecanismos pelos quais os metais alteram a atividade das esterases são ainda desconhecidos. Entretanto existem algumas hipóteses para se tentar explicar por que alguns metais afetam a atividade dessas enzimas. Uma delas é de que metais ocasionariam a

desnaturação da proteína. O metal se ligaria ou alteraria as interações iônicas existentes entre as cadeias laterais de aminoácidos da proteína, causando mudanças na conformação estrutural da enzima, resultando na perda da atividade catalítica (ROMANI et al., 2003; SANT'ANNA et al., 2010).

Outra hipótese seria que os metais se ligariam aos receptores da acetilcolina nas membranas das células pós-sinápticas, impedindo a ligação da mesma ao receptor. Assim, a acetilcolina se acumularia causando um aumento inicial na expressão da enzima para degradar o excesso do neurotransmissor. Com o tempo, após o efeito prolongado dos metais nos receptores, menos acetilcolina é produzida, causando diminuição progressiva da enzima que o degrada (BAINY et al., 2006).

Uma terceira hipótese ainda diz que os metais poderiam se unir a algum resíduo de aminoácido próximo ao sítio ativo da enzima, impossibilitando o encaixe do substrato para a catálise enzimática (BAINY et al., 2006). Um forte candidato seria um resíduo de cisteína, contendo grupo sulfidril, que tem afinidade por certos metais. A inativação da enzima, como resultado da ocupação de seu sítio ativo por metais tóxicos foi sugerida por Shaw e Panigrahi (1990), que investigou peixes expostos a Hg (GONÇALVES et al., 2010).

1.4 *Danio rerio*

Atualmente, inúmeros trabalhos reportam a utilização de *D. rerio* (Figura 1) em estudos ecotoxicológicos. Os principais benefícios do uso desta espécie como um modelo toxicológico em relação a outras espécies de vertebrados relacionam-se com o seu pequeno porte (2,54 – 3,81 cm) e facilidade de criação (HILL et al., 2005), além do que é uma espécie cujo genoma já está sequenciado, facilitando estudos de biologia molecular.

O *D. rerio*, conhecido no Brasil como paulistinha, e no resto do mundo como *zebrafish*, é um peixe de pequeno porte naturalmente encontrado em rios do Sudeste asiático. Esta espécie ciprinícola vem sendo estudada em ecotoxicologia desde os anos trinta, devido à sua disponibilidade, baixo custo e facilidade de cuidados em ambientes de laboratório. Além disso, é amplamente utilizado como modelo de estudos do desenvolvimento dos vertebrados, para ensaios neurobiológicos e toxicológicos (BARRIONUEVO; FERNANDES; ROCHA, 2010).



Figura 1 - Exemplar da espécie *D. rerio* utilizado nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Já foram reportadas na literatura pesquisas utilizando o zebrafish em estudos ecotoxicológicos na presença de alguns metais (RICHETTI et. al, 2011;). Mas como mencionado anteriormente, o mecanismo de inibição de esterases por metais ainda não é conhecido. Portanto um estudo mais aprofundado sobre a resposta de diferentes esterases nesses organismos frente a exposições controladas a metais, assim como em comparação com efeitos de praguicida carbamato e organofosforado, podem indicar a relevância do uso destas enzimas como biomarcadoras sensíveis a estes compostos, além de trazerem novas informações a respeito dos efeitos dos metais na fisiologia do zebrafish.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo principal, estudar o efeito *in vitro* e *in vivo* dos metais Cu, Cd, Pb e Fe na atividade da AChE e da CbE de vísceras de zebrafish. De forma a contemplar essa proposta, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar e otimizar os métodos para medida da atividade AChE e CbE em vísceras de zebrafish.
- Avaliar a sensibilidade da AChE e CbE após exposições *in vitro* a diferentes concentrações dos metais Cu, Fe, Pb e Cd e dos praguicidas carbaril e clorpirifos.
- Avaliar a sensibilidade da AChE e da CbE frente à iodoacetamida, composto que liga-se covalentemente à resíduos tiólicos de proteínas, no intuito de verificar se isso interfere na atividade da enzima.
- Avaliar se há reativação das enzimas inibidas após a diluição de extratos protéicos previamente inibidos pelos metais, em tampão de amostra, assim avaliando o grau de interação do metal com a enzima.
- Avaliar a sensibilidade da AChE e CbE dos peixes após exposições controladas a diferentes concentrações e tempos de exposição aos metais cobre, ferro, chumbo e cádmio.

3 METODOLOGIA

3.1 Material biológico

Os organismos teste utilizados para a realização da pesquisa foram espécimes de *D. rerio* adquiridos diretamente de lojas de aquário. Após serem trazidos para o laboratório, os animais foram anestesiados com benzocaína (100 mg/L de água) e decapitados, sendo então retiradas as vísceras (somatório de todo trato digestivo, coração, rins e gônadas) para homogeneização.

3.2 Reagentes

Acetato de chumbo [$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$], cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sulfato de ferro ($\text{FeO}_4\text{S} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), cloreto de cobre (CuCl_2), carbaril (CAS number 63-25-2), clorpirifos (CAS number 2921-88-2), ácido iodoacético (sal sódico). Acetiltiocolina iodada, feniltioacetato, 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), albumina de soro bovino, reagente de bradford, acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, acetato de 1-naftil, acetato de 2-naftil, fast blue RR salt, persulfato de amônio, N,N,N',N'-tetrametilolilenodiamino (TEMED), etanol, n-propanol, foram todos obtidos de Sigma-Aldrich.

3.3 Processamento das amostras, análise das esterases e quantificação de proteínas

As vísceras dos animais foram homogeneizadas na proporção 1:4 (m/v) de tampão Tris 0,1 mol/L, pH 8,0 e centrifugados por 30 minutos a $9168 \times g$, a 4°C . A fração sobrenadante foi coletada e congelada à -80°C .

A atividade das esterases foi medida e caracterizada segundo a metodologia descrita por Ellman et al. (1961), medindo-se, em espectrofotômetro, a formação do produto derivado

da reação entre o composto tiólico produzido pela ação da enzima sobre o substrato, e o ditionitrobenzeno (DTNB), em 412 nm, a 25 °C. Iodeto de acetiltiocolina e feniltioacetato foram utilizados como substrato da AChE e CbE, respectivamente.

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). O reagente de Bradford contém o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* em solução ácida, este ao se ligar às proteínas forma um complexo aniônico estável, causando uma visível mudança na coloração de castanho para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. Esse complexo tem sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm. O valor de absorbância é determinado por espectrofotometria em 595 nm e a comparação dos resultados à curva padrão, com valores de concentração conhecidos, fornecem a concentração da proteína em estudo.

3.4 Estudos *in vitro*

3.4.1 Padronização dos ensaios das esterases

As melhores condições de ensaio para a AChE e CbE foram padronizadas, primeiramente determinando-se a melhor concentração de substrato, acetiltiocolina e feniltioacetato, através de experimentos em que foram testadas concentrações crescentes de iodeto de acetiltiocolina, 0,5 a 50,0 mmol/L (AChE) e feniltioacetato, 1,0 a 15,0 mmol/L (CbE). Posteriormente foram realizados testes para determinar o volume de amostra mais apropriado para os ensaios, variando-se o volume de amostra de 1,0 a 30,0 µL para ambas as enzimas. Um teste para se verificar a estabilidade da atividade enzimática ao longo do tempo também foi realizado, onde os extratos protéicos foram incubados a 37 °C por 120 minutos. A cada 15 minutos procedeu-se a medida, em espectrofotômetro da atividade enzimática.

3.4.2 Inibição das esterases de *D. rerio* pelos metais, iodoacetamida e praguicidas carbamato e organofosforado

Estudos de inibição *in vitro* das esterases foram realizados incubando os extratos protéicos com concentrações crescentes dos sais dos metais cobre, ferro, chumbo e cádmio, do alquilante iodoacetamida, do pesticida CM carbaril e do pesticida OP clorpirifos.

Uma solução estoque de 100 mmol/L de cada um dos metais e da iodoacetamida foi preparada em água destilada e, a partir desta, diluída em 100 μ L de volume final de amostra nas concentrações de 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 e 20,00 mmol/L. A solução estoque dos praguicidas foi preparada em etanol e igualmente diluída nas amostras em concentrações finais de 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 mmol/L.

Após a adição dos tratamentos, as amostras permaneceram incubando por 30 minutos a temperatura ambiente, quando então foi efetuada a medida da atividade enzimática das esterases conforme descrito no item 3.2. Os tratamentos foram realizados em três réplicas, sendo que a atividade das esterases foi medida em duplicata em cada uma das réplicas.

3.4.3 Estudo da reativação das enzimas inibidas por diluição e determinação do tipo de inibição

Inibidores reversíveis têm seu potencial inibitório aumentado quando presentes em altas concentrações, o que favorece uma alta taxa de interação do inibidor com a proteína. Quando diluídos, se a interação for fraca, pode ser desfeita devido à dispersão do inibidor na solução. Com o intuito de verificar se as inibições observadas nas atividades das esterases são reversíveis ou irreversíveis, após incubação dos extratos protéicos com metais em concentrações que causem a inibição das enzimas, os mesmos foram diluídos em 30 volumes de tampão de homogeneização de amostra. A atividade enzimática foi então novamente medida com volumes proporcionais à diluição, para se verificar se a atividade da enzima aumentou após a diluição.

Para a determinação do tipo de inibição sofrida por cada um dos metais na enzima AChE, os extratos foram incubados por 30 minutos na presença dos metais nas concentrações de 10,0 e 20,0 mM e na ausência dos mesmos para composição do grupo controle. A atividade da AChE foi então medida utilizando concentrações crescentes de acetiltiocolina de 0,1; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mM e esses dados utilizados para a construção do gráfico do duplo-recíproco. Esses gráficos, comparados com dados encontrados na literatura, podem nos fornecer o tipo de inibição enzimática causada pelos metais.

3.4.4 Estudo das esterases por eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturante

Para determinar se as inibições observadas não se deram em função da interferência do excesso de metal no meio de reação que reagem com os substratos usados na metodologia, estudos adicionais foram feitos usando-se a avaliação da inibição da atividade enzimática de esterases através de géis de poliacrilamida e visualização de zimogramas. Adicionalmente, essa técnica permite também evidenciar o efeito reativador da enzima após diluição, visto que uma vez presente no gel, as proteínas inibidas pelo metal são diluídas em 1,5 L de tampão, o que poderia desfavorecer a interação dos metais com a enzima com possibilidade, portanto, de sua reativação.

As esterases são capazes de hidrolisar uma ampla variedade de substratos *in vitro*, o que possibilita os estudos por meio de eletroforese em gel. Entretanto, devido à grande variabilidade de formas, com diferentes padrões de separação em eletroforese apresentada por distintas espécies animais, faz-se necessária uma otimização dos métodos de eletroforese para visualização adequada de bandas esterásicas em zebrafish.

Inicialmente, foram testadas condições já estabelecidas para outros grupos animais em nosso laboratório. As condições eletroforéticas que se apresentaram mais adequadas para girinos, tilápias, cascudos e camarões foram utilizando 10% de ligações cruzadas no gel, e as proporções e compostos adotados ao final das adequações na preparação dos géis encontram-se na Tabela 1. Optou-se pela escolha de um gel não desnaturante para que fossem mantidas as propriedades estruturais das proteínas evitando a perda da atividade das enzimas.

TABELA 1 - Composição do gel de poliacrilamida 10%, não desnaturante.

Solução	Volume
Água bidestilada	20,00 mL
Solução a' (Acrilamida/ Bisacrilamida 30g/1,6g em 100 mL)	16,50 mL
Tampão B (Tris 1,5 mol/L pH 8,8)	12,50 mL
Persulfato de Amônio a 2%	0,80 mL
TEMED	50,00 µL
Volume Total	50,00 mL

As amostras foram preparadas diluindo-se 4 µL de extrato protéico, obtido conforme citado anteriormente na preparação das amostras, em 46 µL de tampão de amostra 0,1 mol/L pH 8,8 (contendo 0,7 mL de tampão Tris 1,5 mol/L, 1,3 mL de glicerol a 87%, 8mL de água bidestilada e 0,5 mL de azul de bromofenol a 0,1%).

Após a montagem da cuba e polimerização do gel o tampão de corrida (Tris-Glicina 0,1 mol/L pH 8,3) foi adicionado, e posteriormente as amostras diluídas foram aplicadas no gel. O tempo de corrida ficou estabelecido em cinco horas de duração e voltagem constante de 180 V, corrente elétrica de 600 mA e 300 W de potência.

Finalizada a corrida de eletroforese, o gel foi retirado das placas e transferido para um recipiente contendo solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 6,2. Permanecendo em pré-incubação durante 30 minutos. Ao término desta, o gel foi submetido à coloração durante uma hora numa solução corante para esterases contendo 60 mg de Fast Blue RR salt diluídos em 50 mL de tampão fosfato e 5 mL de n- propanol, e 20 mg de α - naftil acetato e 15 mg de β - naftil acetato diluídos em 0,5 mL de acetona.

Os isômeros α - naftil e β - naftil funcionam como substrato para as enzimas. O Fast Blue une-se ao produto da reação das esterases (α ou β - naftol) formando um precipitado que é visualizado no caso das esterases com afinidade pelo α - naftil acetato como bandas pretas sobre o gel, e no caso das esterases com afinidade pelo β - naftil acetato como bandas vermelhas. O propanol adicionado melhora a visualização das bandas no gel.

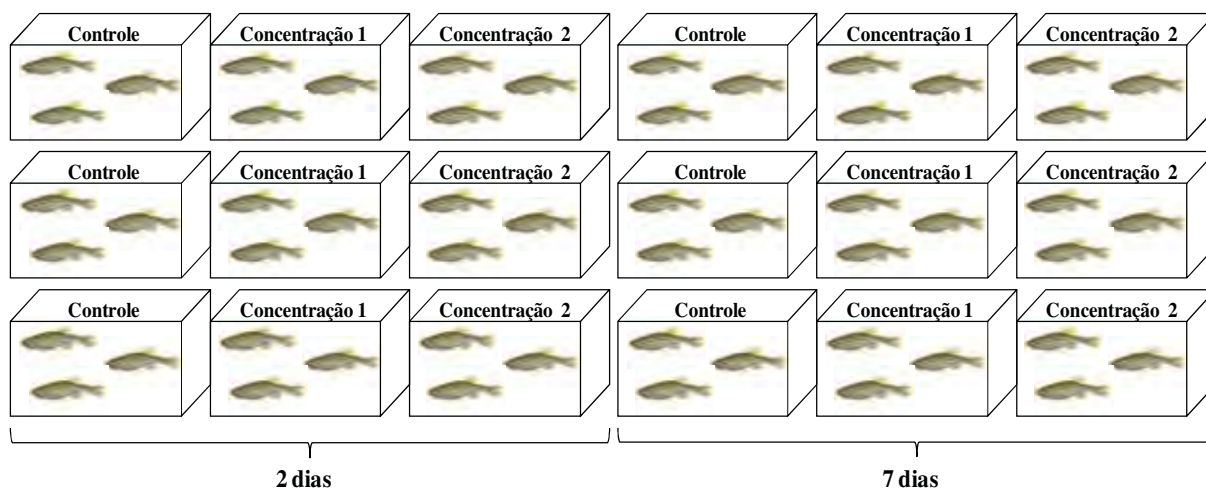
Ao término da coloração a solução corante foi substituída por 50 mL de solução descorante conservante por 24 horas. As proporções dos compostos utilizados na preparação da solução descorante se encontram na Tabela 2.

TABELA 2 - Composição da solução descorante para gel de poliacrilamida.

Solução	Volume (mL)
Água destilada	635
Ácido acético	100
Etanol comercial	250
Glicerol	15
Volume Total	1.000

3.5 Estudos *in vivo*

Para os estudos de inibição das esterases *in vivo* pelos metais, os organismos foram expostos por dois e sete dias a duas concentrações de Pb e Fe (0,1 e 0,5 mg/L) e a duas concentrações de Cd e Cu (0,02 e 0,06 mg/L). Foram utilizados 54 peixes para cada exposição, sendo que para cada tempo de exposição (2 e 7 dias) foram coletados nove animais controle e nove animais expostos a cada uma das concentrações do metal (Figura 2).

**Figura 2** - Esquema da montagem dos experimentos de exposição *in vivo*.

Os experimentos foram realizados em aquários de 1,5 L, com aeração constante e alimento oferecido diariamente (Figura 3). A água e os tratamentos foram trocados a cada três dias. A água contaminada foi armazenada em galões de 20 L e posteriormente tratada em filtro de carvão ativado, para posterior descarte na rede de esgotos.



Figura 3 - Fotos da montagem dos experimentos de exposição *in vivo* aos metais.

Após os referidos tempos de exposição, os animais foram coletados, anestesiados com benzocaína e decapitados. As vísceras foram retiradas e posteriormente processadas e congeladas conforme descrito no item 3.2. Na tabela 3 encontram-se os dados de peso e tamanho dos peixes utilizados em todos os experimentos.

TABELA 3 – Peso e tamanho dos peixes utilizados nas exposições *in vivo* de 2 e 7 dias.

Experimento	Tamanho (cm) $\pm$ desvio	Peso (g) $\pm$ desvio
Chumbo	4,035 $\pm$ 0,387	1,245 $\pm$ 0,320
Cádmio	5,277 $\pm$ 0,510	2,615 $\pm$ 0,680
Ferro	3,750 $\pm$ 0,261	0,823 $\pm$ 0,189
Cobre	3,801 $\pm$ 0,318	1,056 $\pm$ 0,208

3.6 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o programa STATISTICA 7 (StatSoft, Inc.). Foram testadas as diferenças estatísticas entre o grupo controle e as concentrações utilizadas, nos diferentes tempos de exposição testados. Para avaliar a distribuição dos dados ao longo da curva de normalidade e variância foram utilizados, respectivamente, os testes de Shapiro-Wilk's W e Cochran. Resultados com $p > 0,05$, em ambos os testes realizados, foram considerados de distribuição normal e variância homogênea, sendo assim, dados paramétricos. Para identificar possíveis diferenças estatísticas entre os grupos controle e expostos, realizou-se um teste estatístico do tipo ANOVA One-Way para dados paramétricos e Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, onde os dados que apresentaram $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Como teste posterior foi utilizado teste de Fisher LSD, onde é apontado em entre quais grupos existe a diferença estatística indicada pelo teste de ANOVA (ZAR, 1984).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos *in vitro*

4.1.1 Padronização dos ensaios das esterases

No intuito de caracterizar a atividade das enzimas AChE e CbE, antes dos experimentos de inibição *in vitro* e *in vivo* utilizando as vísceras de *D. rerio*, uma série de testes foram realizados para otimizar os ensaios enzimáticos. Estes testes podem ser úteis para o entendimento de respostas encontradas nos experimentos realizados em seguida. Primeiramente, foram testados variações da concentração de substrato, acetiltiocolina e feniltioacetato, para determinação da concentração em que as enzimas apresentam maior atividade. A figura 4 mostra o gráfico da variação da concentração de substrato da AChE, onde é possível observar que o máximo da atividade enzimática é obtido entre 1,0 e 10,0 mmol/L de acetiltiocolina. Em concentrações de substrato superiores a 10 mmol/L a atividade da enzima tem um decréscimo. Isso ocorre em determinadas espécies e pode ser atribuído ao fato de o próprio substrato funcionar como um inibidor alostérico da enzima, em altas concentrações. Comportamento semelhante a este já foi descrito anteriormente por Monserrat, Bianchini e Bainy (2002) em brânquias de *Crassostrea rhizophorae*, por Bonacci et al. (2008) ao analisar brânquias de *Pecten jacobaeus* e Galloway et al. (2002) em *Mytilus edulis*, onde em concentrações maiores que 3,7 mM, 3,0 mM e 10 mM de acetiltiocolina, respectivamente, a atividade da AChE é inibida.

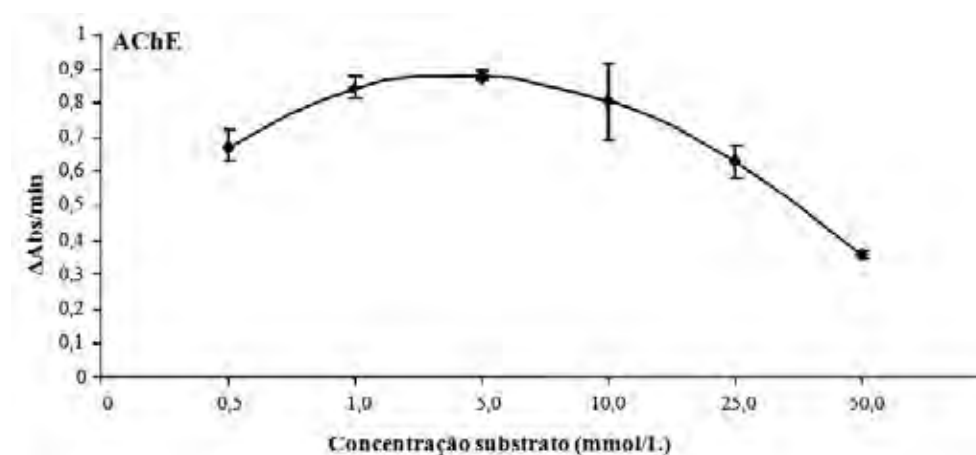


Figura 4 - Gráfico da variação da concentração de substrato para AChE.

O mesmo teste foi realizado para a CbE, porém não há representação gráfica dos resultados, pois com a concentração de 5,0 mmol/L a enzima já atingiu a saturação, tornando o composto de um amarelo muito intenso o que impediu a visualização gráfica. Comportamento semelhante foi observado quando variou-se o volume da amostra, em volumes maiores que 1 μ L de amostra a enzima atingiu a saturação. Assim ficou estabelecido a concentração de 4,5 mmol/L de feniltioacetato e 1 μ L de amostra (10 μ L amostra diluídos em 90 μ L de tampão Tris 0,1 mmol/L pH 8,0) para os ensaios da CbE.

Para a AChE, o resultado da variação do volume de amostra no ensaio pode ser observada na figura 5. O máximo da atividade da enzima é obtido com 10 μ L de amostra. O decaimento na atividade da enzima em quantidades muito grandes de amostras se dá porque a concentração da enzima seria muito alta. Assim, ao se adicionar essa quantidade alta de enzima no meio de reação, o consumo de substrato e a formação do produto se dá de forma muito rápida, não dando tempo de se observar a cinética de variação da absorbância no equipamento.

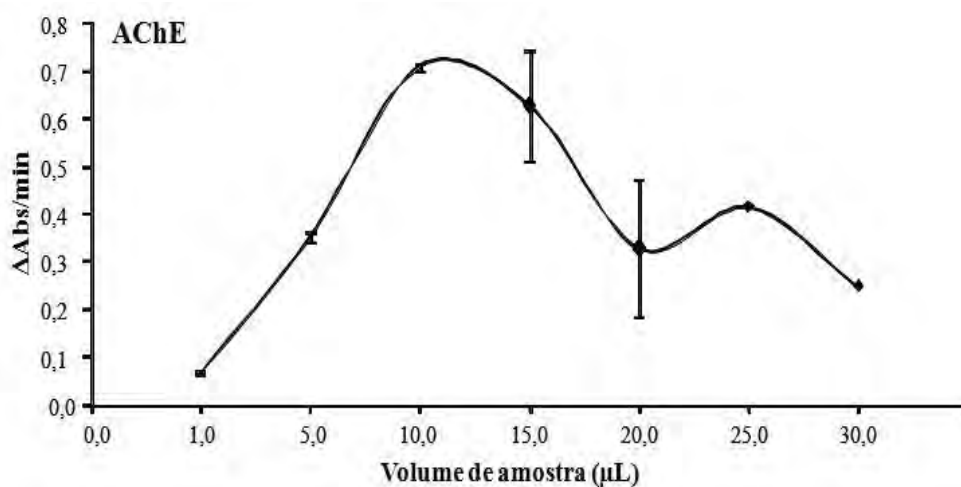


Figura 5 - Efeito de diferentes volumes de amostra na atividade da AChE em vísceras de zebrafish (*D. rerio*).

Uma vez padronizados os volumes de amostras e concentrações de substrato para cada enzima, o próximo passo seria a incubação dos extratos protéicos com os metais, com o intuito de verificar se os mesmos são capazes de inibir as esterases *in vitro*. Esse procedimento exige que os extratos fiquem na presença do metal adicionado por certos períodos de tempo e numa determinada temperatura, neste trabalho fixados em 30 minutos e a 37 °C, assim possibilitando a interação dos mesmos com as enzimas num tempo suficiente para causar algum efeito. Entretanto, sabe-se que muitas enzimas perdem sua atividade ao longo do tempo, seja por processos de desnaturação ou ação de proteases presentes no extrato.

Muitos inibidores de proteases como o PMSF e a leupeptina inibem serina hidrolases e, portanto, afetam a atividade da AChE. Por isso não são usados inibidores de proteases durante o processo de preparo das amostras para medida de esterases (VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007; LEITE et al., 2010).

Com o intuito de saber se o tempo de incubação a 37 °C influencia ou não na perda da atividade enzimática, foi avaliada a atividade da AChE e da CbE de 15 em 15 minutos durante 120 minutos. A figura 6 mostra que a AChE e a CbE mantêm sua atividade frente à incubações de até 120 minutos. Essa estabilidade possibilita inferir que, uma eventual inibição da enzima frente às incubações realizadas com os metais, é exclusivamente causada pelos metais e não pela perda de atividade ao longo do tempo.

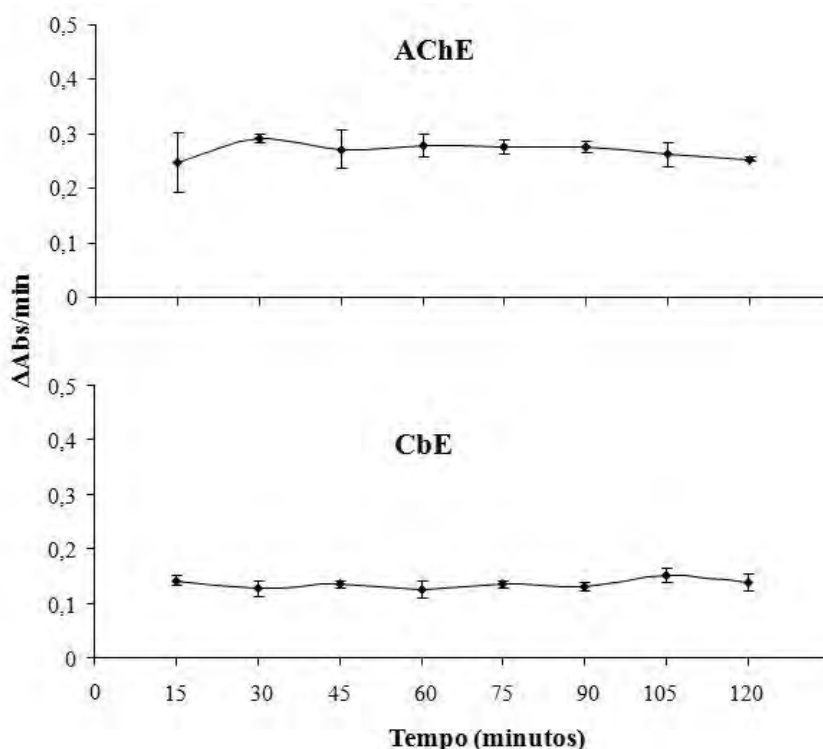


Figura 6 - Gráfico de estabilidade enzimática da AChE e CbE ao longo do tempo.

De acordo com os dados de caracterizações obtidos pode-se afirmar que a espécie escolhida para o presente estudo apresenta atividade significativa das enzimas estudadas, e que as enzimas são bastante estáveis para os testes de inibição.

4.1.2 Testes de inibição *in vitro* das esterases de *D. rerio* pelos metais, iodoacetamida e praguicidas.

Estudos de inibição *in vitro* foram realizados no intuito de observar o efeito dos diferentes metais diretamente nas enzimas. Extratos protéicos de vísceras de *D. rerio* foram incubados por 30 minutos com concentrações crescentes de sais dos metais cobre, ferro, chumbo e cádmio. Em seguida, as atividades da AChE e da CbE foram medidas conforme descrito no item 3.2. De acordo com as figuras 7 e 8, observamos uma ligeira inibição da atividade da AChE por todos metais até a concentração de 10 mmol/L de cada um dos metais. A atividade da CbE não se mostrou inibida em nenhuma das incubações realizadas, exceto para o cobre, nessa mesma concentração. Somente em concentrações muito elevadas do metal (20,0 mmol/L) a atividade da CbE apresentou-se inibida frente aos metais, demonstrando que essa enzima apresenta uma sensibilidade menor a inibições frente aos metais, quando comparada à AChE.

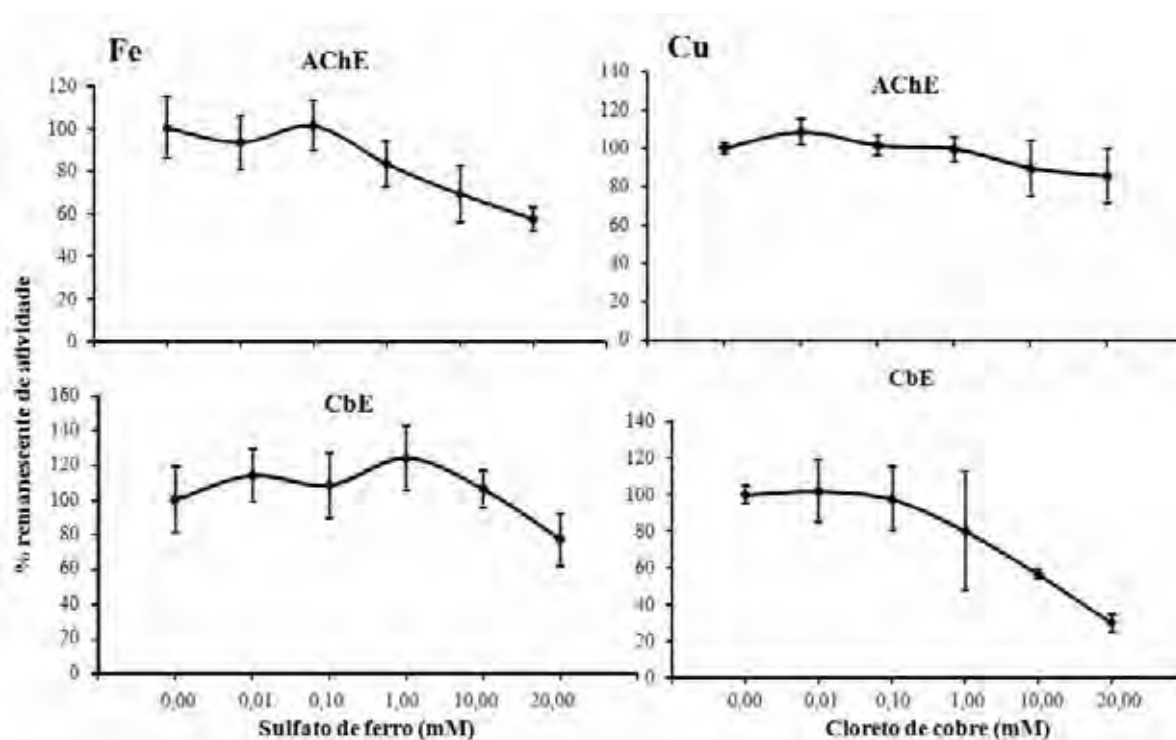


Figura 7 – Efeito *in vitro* de diferentes concentrações de Fe e Cu na atividade da AChE e da CbE de vísceras de zebrafish (*D. rerio*).

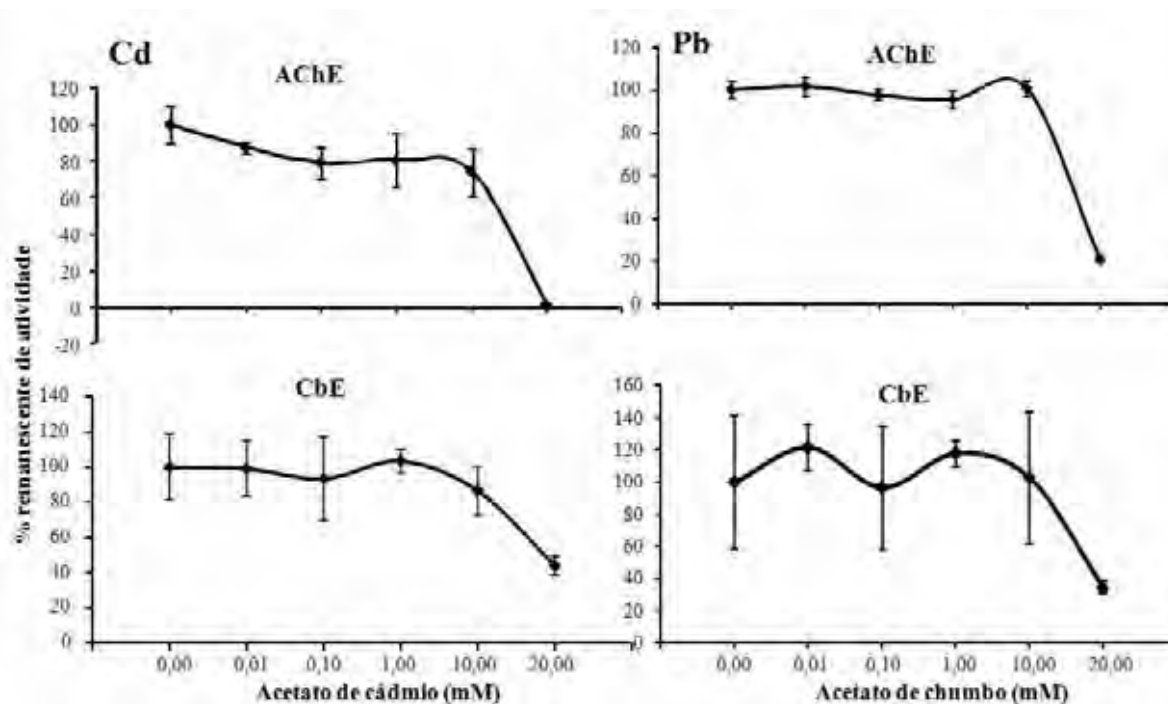


Figura 8 – Efeito *in vitro* de diferentes concentrações de Cd e Pb na atividade da AChE e da CbE de vísceras de zebrafish (*D. rerio*).

Em contraste com o presente trabalho, em outros estudos com zebrafish (SANT'ANNA et al., 2010), o Fe na concentração de 2,6 mM promoveu um aumento *in vitro* significativo da atividade da AChE após 10 minutos de incubação, no cérebro e no fígado. Esses autores sugerem que o aumento da AChE pelo Fe é devido a uma ação direta do metal na enzima sem a influência de outros sistemas biológicos, visto que na concentração utilizada a atividade da AChE foi afetada. A diminuição de atividade da AChE observada no presente trabalho pode estar relacionada com a concentração, tempo de incubação e diferença de tecido que foram utilizados.

Efeito semelhante ao observado no presente trabalho foi relatado por Najimi et al. (1997) em mexilhões *Perna perna* e *Mytilus galloprovincialis*, onde em concentração de 10^{-3} e 10^{-2} M de Fe, a atividade da AChE foi inibida. Segundo esse autor a redução *in vitro* da atividade da enzima pode ser explicada pela ligação dos metais a grupos funcionais da proteína, como imidazol, sulfidril e grupos carboxila. O metal poderia se ligar a um sítio de desativação da molécula, e essa ligação de cátions metálicos às enzimas poderia alterar sua atividade, não somente inibindo, mas em certos casos estimulando a função catalítica dessas enzimas.

No presente trabalho o Cd inibiu a atividade da AChE em 100% na concentração de 20 mM. A inibição *in vitro* pelo Cd já foi observada anteriormente em diferentes tecidos de *Pecten jacobaeus*, onde foram utilizadas concentrações crescentes do metal de 10^{-9} a 10^{-3} mM

(BONACCI et al., 2008). O mesmo efeito inibitório também foi observado por Najimi et al., 1997 em mexilhões *Perna perna* e *Mytilus galloprovincialis*, quando expostos à concentração de 10^{-3} e 10^{-2} M de Cd, apresentou significativo decréscimo na atividade da AChE. Conforme mencionado anteriormente, a hipótese para essa inibição é que o metal se ligaria a grupos funcionais da proteína, alterando sua estrutura.

Na exposição dos peixes ao Pb também é possível observar uma alta sensibilidade da AChE na concentração de 20 mM. Em contraste Richetti et al. (2010) demonstrou que em concentrações menores (75 nM a 250 μ M), não foram observados efeitos nessa enzima em cérebro de zebrafish. Mais uma vez a diferença na resposta observada no presente estudo pode estar relacionada à concentração utilizada ou o tecido analisado.

O cobre foi o metal que apresentou menor efeito inibitório na atividade da AChE, porém foi o único que foi capaz de inibir consideravelmente a CbE na concentração de 10 mM. Por outro lado, Howcroft et al. (2011), utilizando *Enchytraeus albidus* observou que, quando expostos a 25 μ M de Cu, a atividade da AChE foi totalmente inibida. Najimi et al. (1997) também observou diminuição na atividade da AChE em mexilhões. Nossos dados indicam uma maior resistência da AChE do zebrafish frente ao Cu em comparação a outras espécies já estudadas.

No intuito de compreender melhor a ação dos metais na AChE foram realizados testes de inibição com diferentes concentrações dos metais que causaram a inibição da enzima, variando-se a concentração do substrato, de forma a obtermos dados cinéticos que plotados no gráfico do duplo-recíproco podem indicar o tipo de inibição causada pelos metais (Figuras 9 e 10)

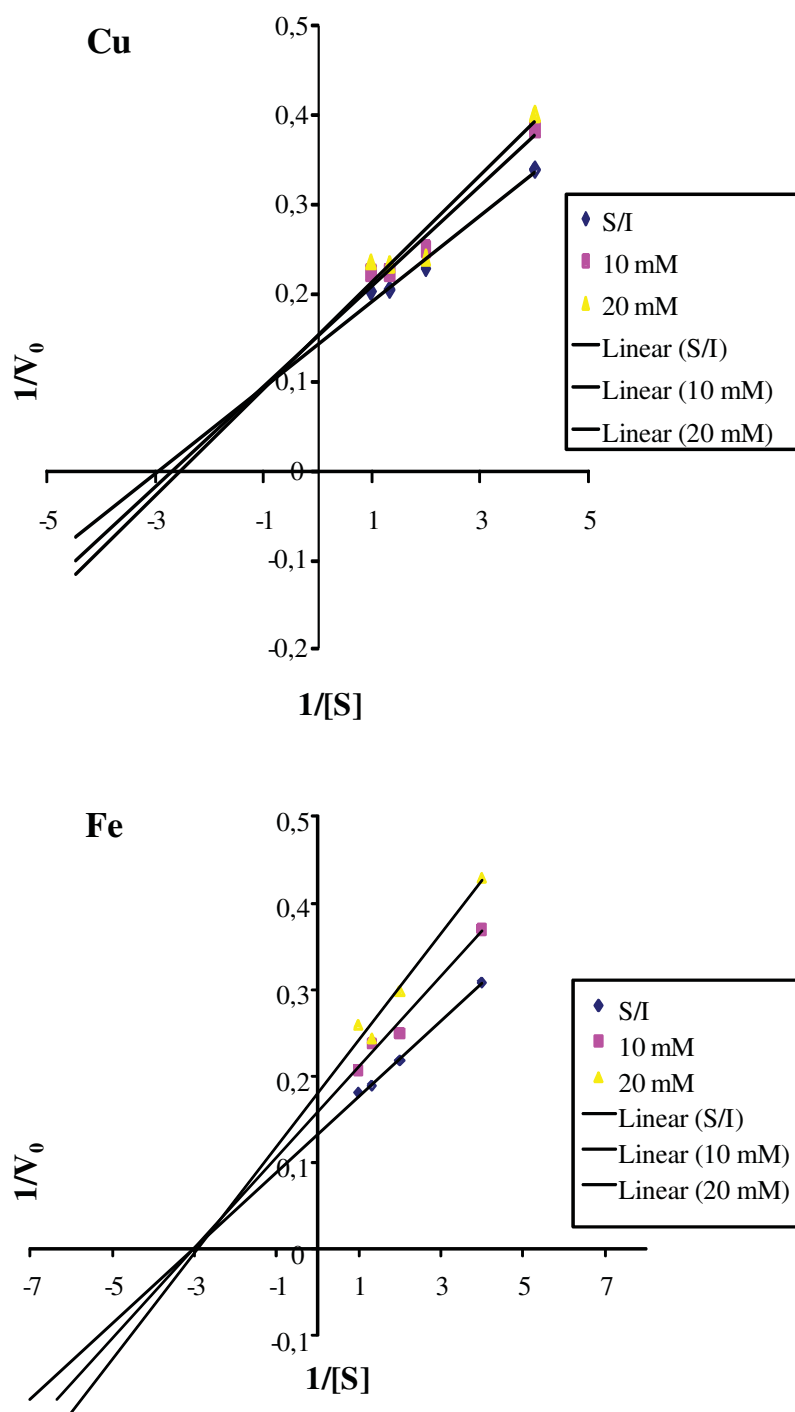


Figura 9 - Gráfico do duplo-recíproco para inibição da AChE pelo Cu e Fe.

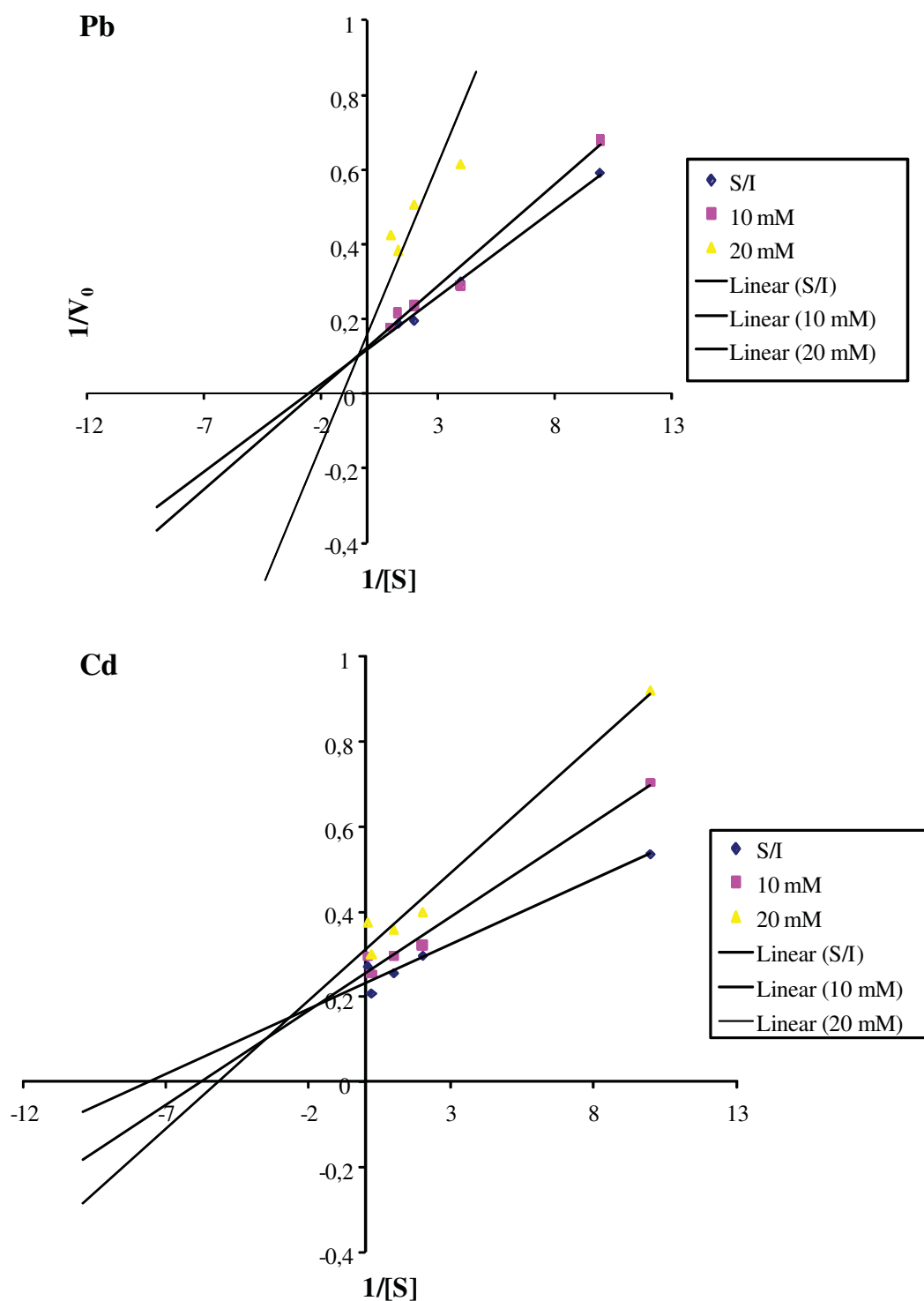


Figura 10 - Gráfico do duplo-recíproco para inibição da AChE pelo Pb e Cd.

De acordo com dados cinéticos plotados em gráficos de duplo-recíproco para cada um dos metais analisados, observa-se que todos os inibidores apresentam tipo de inibição mista. Um inibidor (I) misto liga-se a um sítio distinto ao sítio ativo da enzima, porém podem ligar-se tanto a enzima livre (E), formando o complexo EI, quanto ao complexo enzima-substrato (ES), formando um complexo inativo ESI (LEHNINGER, 2005). Inibidores do tipo misto são

inibidores reversíveis, o que também explicaria o fato de a AChE, após períodos mais prolongados de exposição a alguns metais apresentar uma recuperação de sua atividade (BAINY et al., 2006; RICHETTI et al., 2011).

Além disso, os dados de incubação *in vitro* de vísceras de zebrafish pelos metais (figura 8) e praguicidas (figura 12), foram utilizados para o cálculo da IC₅₀, que é a concentração do composto necessária para causar 50% de inibição da enzima (Tabela 4).

TABELA 4 - Valores de IC₅₀ da AChE frente a exposições *in vitro* aos metais e praguicidas.

Composto	IC₅₀ (mM)
Carbaril	0,045
Clorpirifos	1,423
Cádmio	10,317
Cobre	55,783
Ferro	22,151
Chumbo	12,627

Quando comparamos os diferentes gráficos de inibição da AChE e da CbE pelos metais nas mesmas concentrações e os valores de IC₅₀ apresentados na tabela 4, verificamos que todos os metais apresentaram um perfil muito similar de efeito, sem haver discrepâncias no grau de inibição das enzimas, com uma ligeira exceção talvez para o cobre, o que nos leva a pensar que o mecanismo geral de inibição das esterases parece ser muito similar, para os diferentes metais. Dessa forma, tem-se a impressão de que o mecanismo de inibição possa ser mais em função de um efeito desnaturador do metal na enzima do que propriamente a ligação dos metais em sítios alvo específicos da enzima, causando a perda de sua atividade. Fosse assim, possivelmente teríamos um perfil de inibição diferente para cada metal, em função das diferentes propriedades físico-químicas de cada metal, gerando diferentes graus de interação com as enzimas.

Além disso, observando o perfil de inibição das esterases pelos praguicidas OP e CM (Figura 11), assim como seus valores de IC₅₀, nota-se que ambos são capazes de inibir as duas esterases em concentrações muito menores do que os metais, visto que ambas as enzimas são 100% inibidas com 10 mM de qualquer um dos compostos. Este resultado fortalece a idéia de que o efeito inibitório direto dos metais parece ser mais devido à desnaturação da enzima.

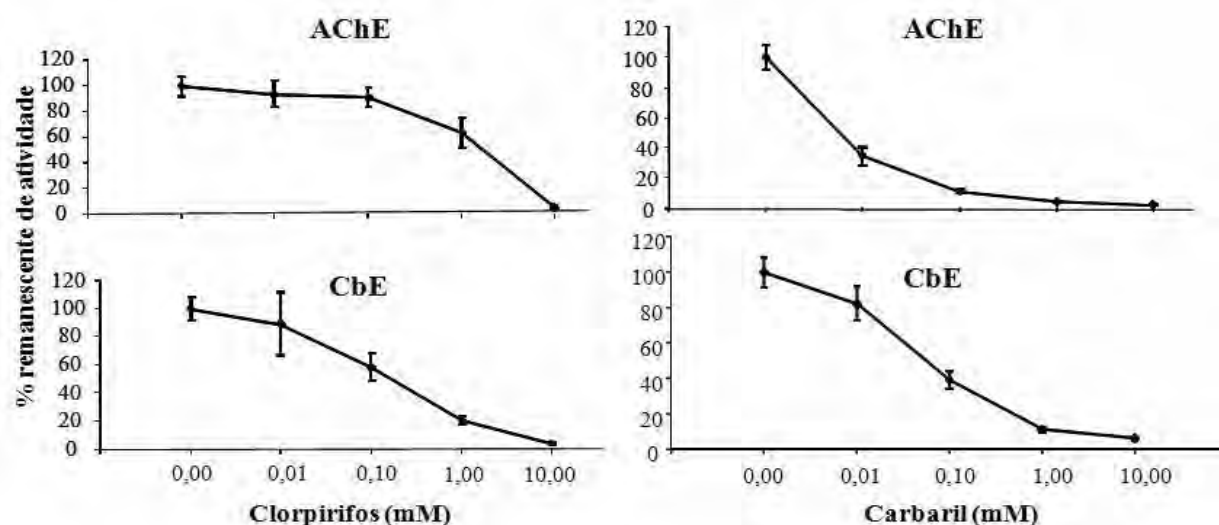


Figura 11 - Efeito *in vitro* do clorpirifos (OP) e do carbaril (CM) na atividade da AChE e CbE em vísceras de *D. rerio*.

Apesar disso, alguns autores sugerem que possa haver sim um efeito inibidor dos metais na atividade de esterases em função da presença possível de resíduos de cisteína próximos ao sítio ativo da enzima (KEAY, CROOK, 1965; FRASCO et al., 2007; VAN ASSCHE, CLIJSTERS, 1990). Sabe-se que metais podem se ligar a grupamento tióis de proteínas (DICKENS, 1933), assim a ligação de metal a cisteínas próximas ao sítio ativo de uma esterase poderia dificultar o encaixe do substrato na enzima, resultando assim numa menor atividade enzimática. Em face dessa hipótese, extratos protéicos das vísceras do zebrafish foram também incubados por 30 e 60 minutos com diferentes concentrações de ácido iodoacético, um reagente amplamente utilizado em bioquímica para bloquear resíduos tiólicos de proteínas. A iodoacetamida é um agente alquilante que inibe irreversivelmente a atividade catalítica de algumas enzimas por modificar cadeias laterais de cisteína e de outros aminoácidos (STRYER, 1992). Se é verdade que os metais interagem com resíduos de cisteínas próximos ao sítio ativo das enzimas em estudo, o ácido iodoacético deveria um efeito similar.

É possível observar na figura 12 que não há efeitos do ácido iodoacético na atividade da AChE e CbE, o que não indicaria a presença de cisteínas próximas ao sítio ativo das enzimas de forma a causar uma possível inibição da mesma pela interação com os metais.

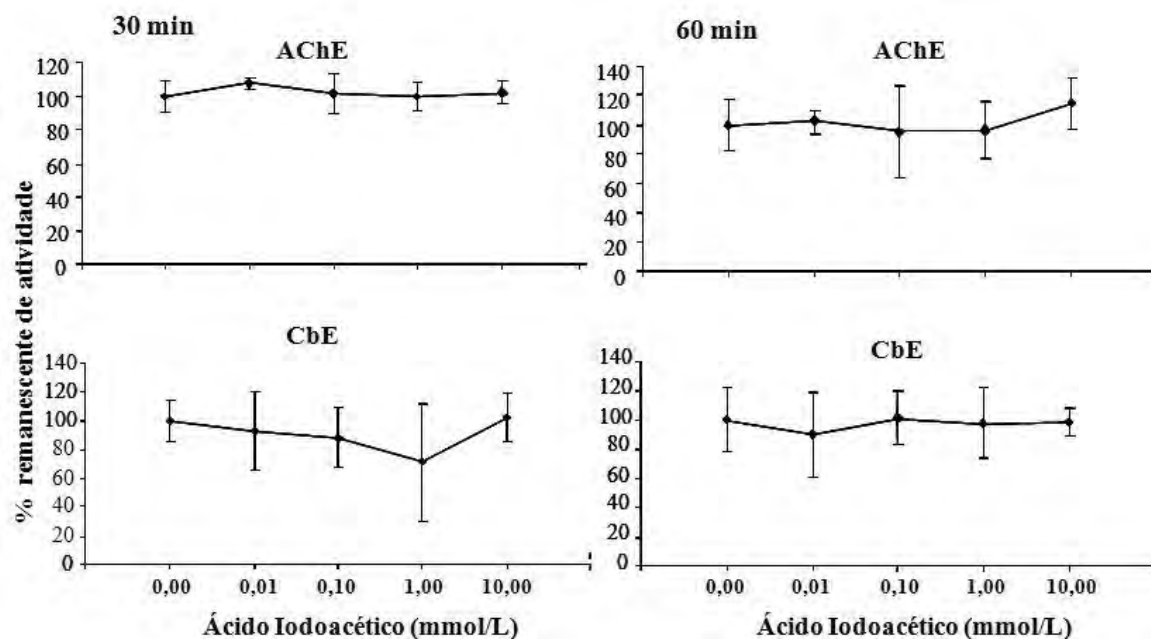


Figura 12 - Efeito *in vitro* de diferentes concentrações de Ácido Iodoacético na atividade da AChE e CbE em *D. rerio* em incubação de 30 e 60 minutos.

Dessa forma reforça-se a hipótese de que o mecanismo de inibição das esterases pelos metais possa ser mais em função de um efeito desnaturador do metal na enzima do que sua ligação em sítios alvo específicos da enzima, causando a perda de sua atividade.

4.1.3 Estudo das esterases por eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturante

Outro ponto deve ser considerado em estudos de inibição *in vitro* de esterases por metais, principalmente quando se utiliza o método de Ellman para determinação da atividade dessas enzimas. Na reação de Ellman, a acetiltiocolina (ATCh) é usada como substrato para a AChE, que a hidrolisa em acetato e tiocolina (TCh). A TCh então reage com o DTNB para formar uma mistura de um dissulfeto e o cromóforo amarelo, ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), e é essa formação de cor que é monitorada por espectrofotômetro em 412 nm. Metais têm alta afinidade por grupamentos tiol e podem interferir na reação descrita, já que podem reagir com grupos tiol da TCh e/ou do TNB. Essas interferências podem ser significativas, uma vez que contribuem para a diminuição da coloração amarela, o que pode ser erroneamente interpretado por uma inibição enzimática (FRASCO et al., 2005).

Para confirmar que as inibições das esterases foram ocasionadas pelos metais e não devido à interação do metal com os reagentes do ensaio, a atividade das esterases das vísceras de zebrafish incubadas com os metais foram também avaliadas através de zimogramas, ou

seja, através da visualização de bandas esterásicas das amostras em géis de poliacrilamida não desnaturante, e posterior coloração com substratos das enzimas;

O estudo da inibição *in vitro* das esterases em géis de poliacrilamida apresentou resultado semelhante ao observado no estudo de cinética enzimática por espectrofotometria (Figura 18). O desaparecimento de bandas, que evidenciaria a inibição de esterases foi mais fortemente observado nos zimogramas dos metais Pb e Cd, corroborando os dados de inibição analisados por espectrofotometria.

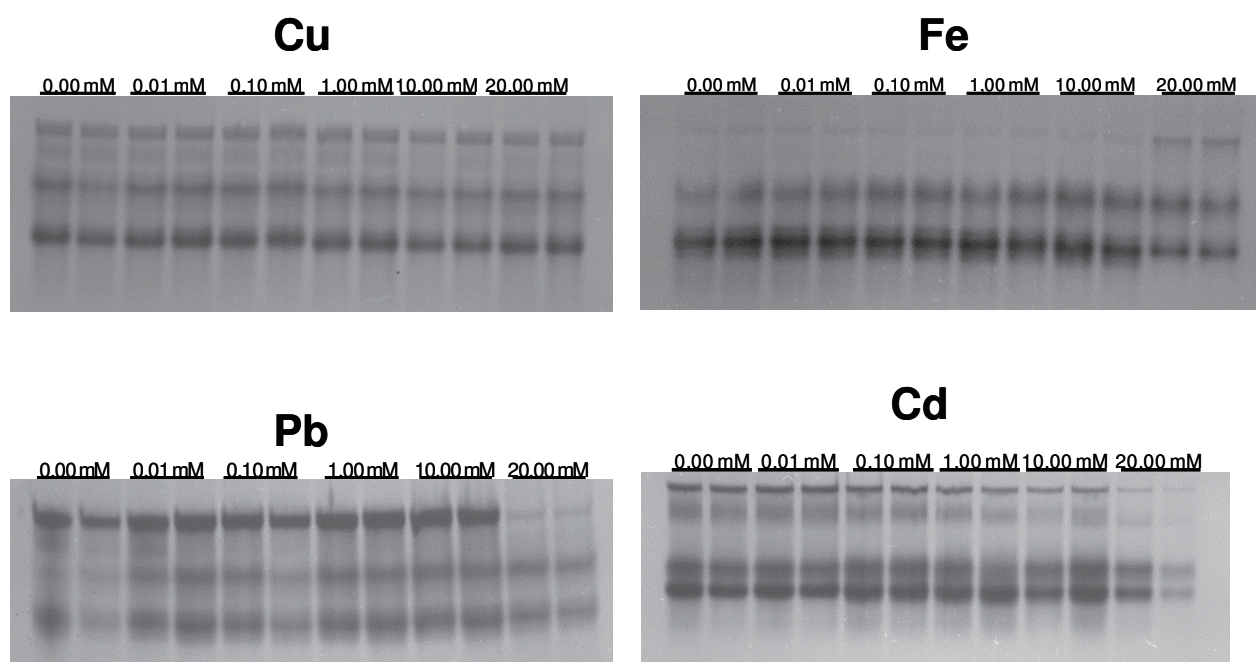


Figura 13 - Zimogramas mostrando bandas esterásicas de extratos protéicos *D. rerio* incubados com diferentes concentrações de Cu, Fe, Pb e Cd.

Ao observar o desaparecimento de bandas dos extratos tratados com metais é possível observar que a inibição foi realmente causada pelo metal, visto que, no gel não ocorre a interferência de compostos que podem reagir com os metais. Porém, novamente, somente em concentrações muito elevadas dos metais é possível observar a inibição das esterases pelos mesmos.

4.1.4 Estudos de inibição por metais e reativação enzimática por diluição

O presente experimento foi feito com o intuito de verificar se o grau de interação do metal com a enzima influencia na taxa de inibição da mesma. É possível que a inibição da enzima pelos elementos testados seja devida a uma ligação reversível do metal à enzima, dada a grande concentração de metal necessária para inibir a enzima. Assim, em concentrações mais baixas, o metal poderia em tese ser menos forçado a interagir com a enzima e se dissociaria da mesma. Caso isso ocorra, ao se diluir uma amostra previamente inibida em 30 vezes o volume do tampão, seria de se esperar que o metal se dissociasse da enzima e verificaríamos uma reativação da mesma, similar ao que acontece com muitos praguicidas carbamatos (VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007).

Como se pode observar (Figura 19), não houve efeito de reativação da enzima após a diluição, indicando que uma vez ocorrida a inibição, ela é estável. Estes dados podem ser contraditórios com a definição para um inibidor misto reversível. Porém, apesar de não termos observados reversão da inibição pelos metais no teste, pode ser que isso seja devido a uma interação mais forte entre o metal e a enzima, o que resultaria em um tempo maior necessário para que ocorra a reversão (VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007).

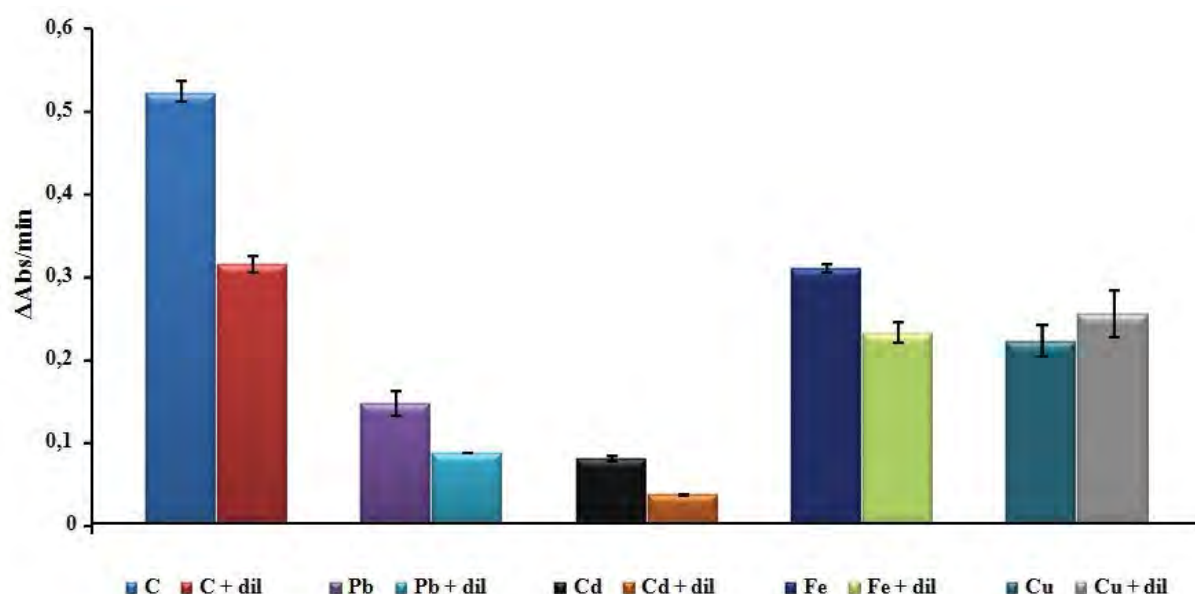


Figura 14 - Efeito da diluição da AChE previamente incubada com os metais, em 30 vezes o volume de tampão de amostra.

Além disso, novamente ressaltamos nossa hipótese principal, de que é possível que a inibição tenha se dado por desnaturação da proteína, devido a interações iônicas entre o metal e cargas de cadeias laterais de aminoácidos da enzima. Uma vez desnaturada a enzima, a

mesma não consegue se renaturar no teste e fica permanentemente inativa, mesmo que a diluição diminua drasticamente a interação do metal com a proteína.

4.2 Exposições *in vivo*

Com o objetivo agora de verificar o efeito *in vivo* dos metais na atividade da AChE e da CbE, foram realizadas exposições controladas por dois e sete dias dos peixes aos metais. A figura 15 mostra os valores de atividade específica da AChE e CbE nos diferentes tempos de exposição ao chumbo. A atividade da AChE foi inibida pelo chumbo na maior concentração (0,5 mg/L) em ambos os tempos de exposição. No entanto, a atividade da CbE não apresentou diferença em nenhum dos tratamentos e dos tempos testados.

A exposição controlada ao ferro não apresentou efeito na atividade da AChE e da CbE em nenhuma das concentrações ou tempo de exposição testados (Figura 15). Observa-se que a atividade da AChE apresentou uma tendência de aumento, mas que não foi estatisticamente significativa, na concentração de 0,5 mg/L em sete dias de exposição.

Na exposição ao cádmio, em dois dias de exposição a atividade da AChE apresenta um ligeiro aumento, porém não foi estatisticamente significativo. Após sete dias de exposição, a atividade da AChE apresentou significativo decréscimo para as duas concentrações testadas, em relação ao grupo controle (Figura 16).

O último experimento realizado foi o de exposição ao cobre. É possível observar que em dois dias de exposição a concentração de 0,06 mg/L promoveu um efeito estimulador na atividade da AChE, enquanto a CbE foi inibida na mesma concentração testada. Após sete dias exposição, somente a CbE mostrou-se inibida em ambas as concentrações testadas (Figura 16).

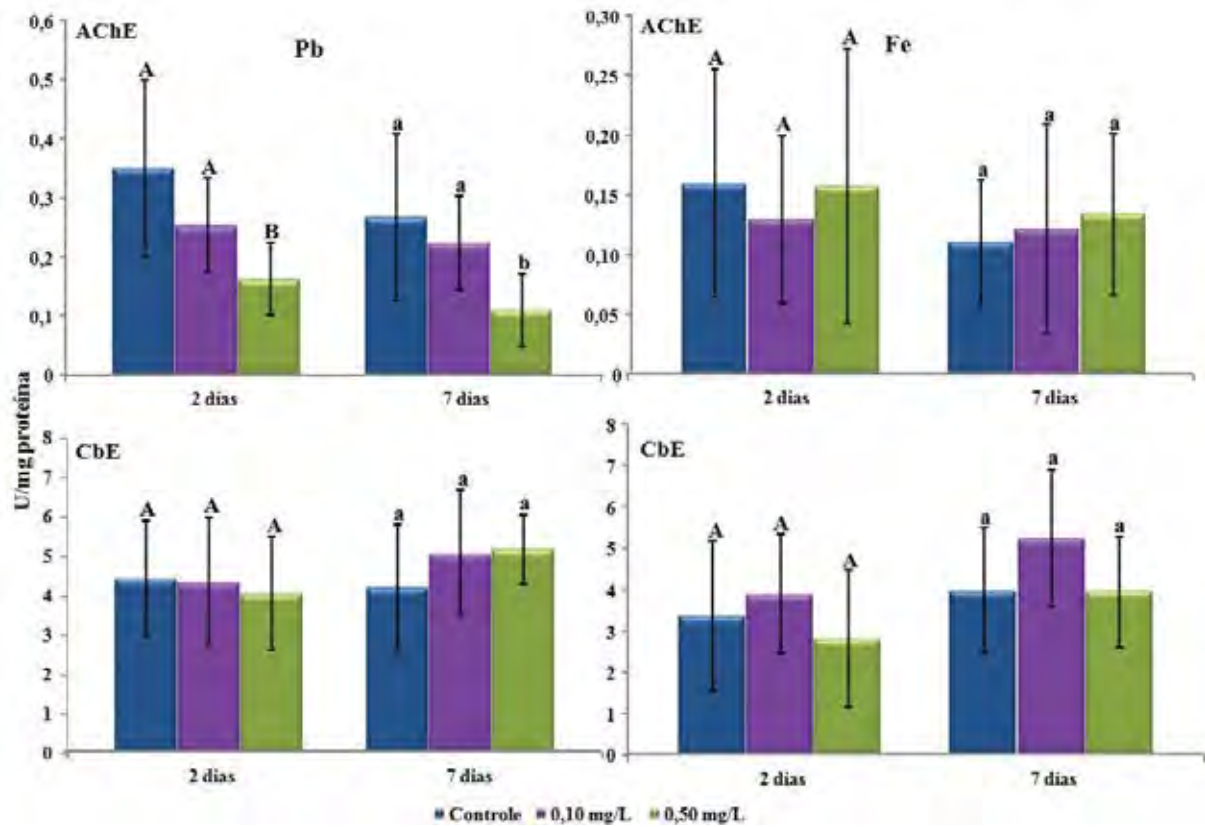


Figura 15 - Atividade da AChE e da CbE em vísceras de zebrafish (*D. rerio*) expostos a 0,1 e 0,5 mg/L de chumbo e ferro por 2 e 7 dias. “B” e “b” indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle “A” e “a”.

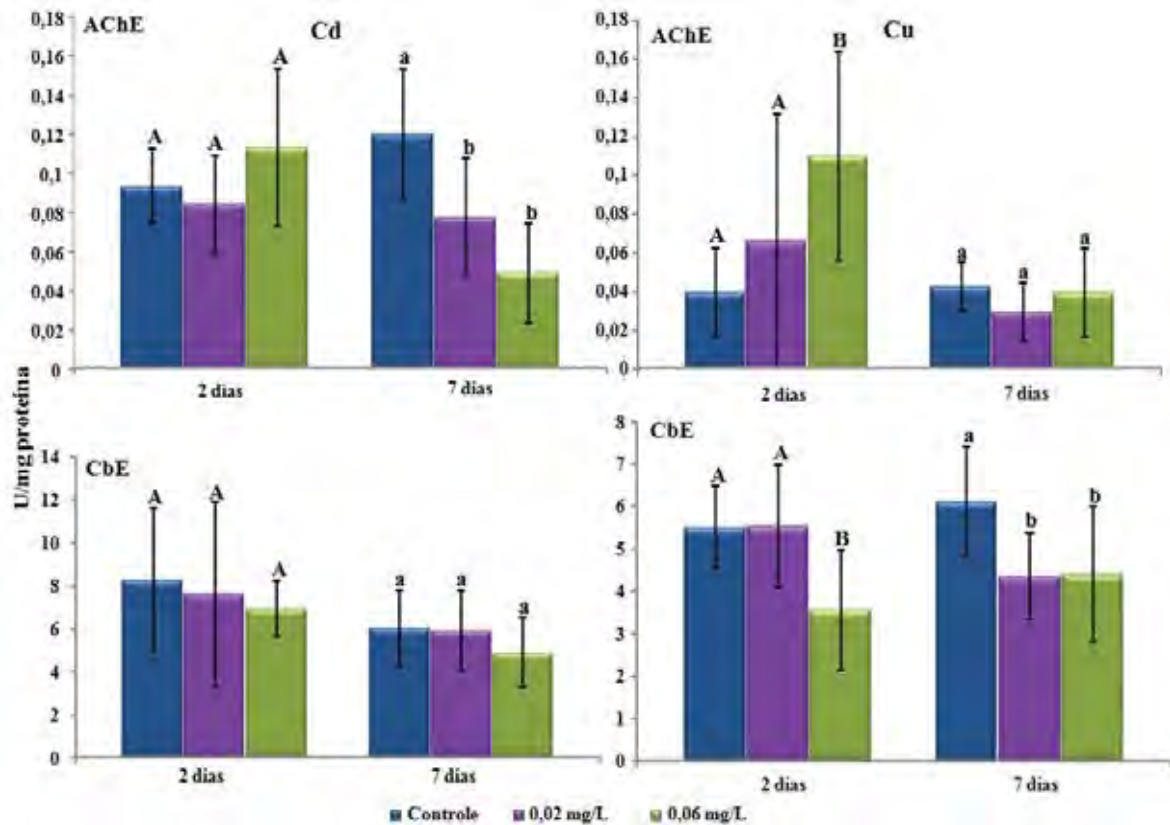


Figura 16 - Atividade da AChE e da CbE em vísceras de zebrafish (*D. rerio*) expostos a 0,02 e 0,06 mg/L de cádmio e cobre por 2 e 7 dias. “B” e “b” indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle “A” e “a”.

As respostas do efeito do Pb na AChE obtidas no presente trabalho estão de acordo com Richetti et al. (2011), que observou em 24 horas de exposição a acetato de chumbo (20 µg/L) que atividade da AChE em cérebro de zebrafish também foi inibida, porém sendo progressivamente restaurada após 96 horas de exposição e totalmente restaurada após 30 dias de exposição.

Em um estudo anterior, utilizando cérebro de *D. rerio* expostos a 1, 15 e 150 mg/L de Fe por 24 horas, Sant'anna et al. (2010), não observou diferença na atividade da AChE. Em fígado da mesma espécie, nas concentrações de 15 e 150 mg/L o mesmo autor observou um aumento na atividade da AChE. Mais uma vez observamos diferentes respostas, em um mesmo organismo-teste, a uma mesma exposição. No presente trabalho testamos somente vísceras de zebrafish, e em concentrações menores que as utilizados no trabalho citado, talvez, por esse motivo os resultados obtidos foram diferentes. Em concordância com o presente trabalho, onde não houve efeito do Fe sobre a AChE, Bainy et al. (2006) também não observou nenhum efeito do Fe em glândula digestiva de *Perna perna* expostos por 12, 24, 72 e 120 horas na concentração de 500 mg/L de ferro.

A tendência de aumento na atividade da AChE em exposição ao Cd já foi anteriormente relatada por Bainy et. al. (2006), em mexilhões expostos a concentração de 200 mg/L de Cd por 72 horas. Comportamento semelhante ao observado no presente trabalho, onde em sete dias de exposição ao Cd houve um decréscimo na atividade da AChE, também foi observado por Pretto et al. (2009), em peixes da espécie *Rhamdia quelen* expostos a concentrações de 0,236 e 0,414 mg/L de Cd por 14 dias. No entanto, Richetti et al. (2011), em estudo utilizando zebrafish expostos a 0,1 mg/L de acetato de cádmio, não observou mudanças na atividade da AChE após 24 horas, 96 horas e em 30 dias de exposição.

A tendência de aumento na atividade da AChE em exposições curtas, e conseqüente inibição em tempos mais longos de exposição pode indicar que é verdadeira a hipótese de Bainy et al. (2006), de que os metais se ligariam aos receptores da acetilcolina, impedindo a ligação da mesma ao receptor. Dessa forma, a acetilcolina se acumularia causando um aumento da AChE afim de degradar o excesso do neurotransmissor. Com o tempo, após efeito prolongado dos metais nos receptores, menos acetilcolina é produzida, causando diminuição progressiva da AChE. Entretanto, essa hipótese ainda permanece por ser testada e comprovada.

O mesmo comportamento foi obtido no presente trabalho após dois dias de exposição ao Cu, onde a atividade da AChE foi maior, porém em sete dias de exposição não foi observado nenhum efeito. Em contraste Romani et al. (2003), observou um aumento da AChE

em cérebro (concentração de 0,5 mg/L) e músculo (concentração de 0,1 e 0,5 mg/L) de *Sparus auratus* em 20 dias de exposição e atribuiu esse aumento ao fato de que o metal poderia promover um aumento na formação do complexo enzima-substrato, aumentando a atividade da AChE.

Os animais expostos ao Cu foram os únicos que apresentaram uma alteração na atividade da CbE. Estudos utilizando essa enzima não são muito abundantes na literatura, e na presença de metais, praticamente inexistentes. Mais estudos são necessários para explicar essa toxicidade específica do Cu para a CbE.

4.3 Discussão integrada dos resultados *in vitro* e *in vivo*.

De acordo com os dados obtidos, nas exposições *in vitro* e *in vivo* a diferentes metais, é possível afirmar que a inibição *in vivo* de esterases por metais possivelmente se dá devido a alterações fisiológicas nos animais, que culminam no decréscimo da atividade enzimática, e não via um mecanismo direto de ação do metal na enzima. Isto porque a inibição direta da enzima pelos metais necessita de concentrações muito elevadas do metal em contato com a enzima, concentrações essas que dificilmente seriam encontradas em ambientes aquáticos, muito menos nas fendas sinápticas do sistema nervoso dos animais, após sua absorção pelos peixes. Mesmo que sejam ambientes altamente contaminados, há que se considerar uma alta taxa de absorção e distribuição dos metais pelos tecidos, para que cheguem ao tecido nervoso e nas sinapses, considerando a AChE, que foi a enzima mais afetada. Chegar nesse local e em concentrações de 10 ou 20 mmol/L é bastante improvável.

No entanto, em estudos ambientais que utilizam esterases como biomarcadores de contaminação específicos, principalmente por compostos OP e CM, deve-se considerar o efeito que metais podem ter sobre essas enzimas. Observamos efeitos distintos dependendo do metal e da concentração utilizada, porém praticamente todos os metais causaram algum efeito sobre as esterases analisadas.

A AChE mostrou-se mais sensível a esse efeito dos metais, enquanto a CbE somente foi afetada pela exposição ao Cu. Com base nesse resultado, podemos sugerir que possivelmente a CbE seja uma enzima mais fiel à exposição aos praguicidas, visto que, nos testes realizados *in vitro* a esses praguicidas, ela teve sua atividade consideravelmente inibida pelo carbaril e clorpirifos.

Inicialmente, nesse trabalho, foram levantadas algumas hipóteses para tentar inferir possíveis mecanismos que alteram as esterases na presença de metais. Apesar de não ser possível ainda afirmar como ocorrem essas modificações, é possível propor que, *in vitro*, possivelmente os metais promovem uma desnaturação da proteína, mudando sua conformação e então, causando os efeitos observados no presente trabalho. Porém provavelmente esse mecanismo não reflete o efeito *in vivo*, devido a necessidade de grandes concentrações do metal para causar esse efeito. *In vivo*, as alterações ocasionadas pelos metais seriam, portanto, mais devido a efeitos na fisiologia dos animais que culminariam numa diminuição da atividade enzimática. Também é possível afirmar que os metais não alteram as esterases através da ligação em resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo da enzima, uma vez que o tratamento com ácido iodoacético não apresentou efeito.

5 CONCLUSÕES

- Condições ótimas para o ensaio da AChE e CbE, para a espécie *D. rerio*, foram estabelecidas. Para a AChE, a concentração de 10 mmol/L de acetiltiocolina e 10 µL de amostra. Para a CbE, a concentração de 4,5 mmol/L de feniltioacetato e 1 µL de amostra, foram as melhores condições para determinar, espectrofotometricamente, a atividades das enzimas.
- Em testes de inibição *in vitro*, a atividade das esterases foi inibida pelos metais cobre, ferro, chumbo e cádmio somente em concentrações muito elevadas (10 a 20 mmol/L). Dessa forma podemos concluir que os metais não afetam diretamente a atividade das esterases em concentrações ambientalmente relevantes, visto que somente em altas concentrações foram capazes de inibir essas enzimas.
- Não há efeitos do Ácido Iodoacético na atividade da AChE e CbE, o que não indicaria a presença de cisteínas próximas ao sítio ativo das enzimas de forma a causar uma possível inibição da mesma pelos metais.
- Não foi observado efeito de reativação da enzima após a diluição, indicando que uma vez ocorrida a inibição, ela é estável.
- Os metais Pb, Cu e Cd afetam significativamente a atividade da AChE *in vivo*.
- A atividade da AChE e da CbE não foi afetada pela exposição ao Fe em nenhuma das concentrações ou tempo de exposição testados.
- Em nenhum dos tempos e concentrações testadas nas exposições *in vivo* ao Pb e Cd, a atividade da CbE foi afetada. Somente na exposição ao Cu a atividade da CbE foi inibida nos dois tempos de exposição testados.
- A AChE foi afetada pela maioria dos metais testados, enquanto a CbE somente foi inibida pelo Cu. Nas exposições *in vitro* aos praguicidas a CbE apresentou uma alta sensibilidade.

Esse resultado indicaria a CbE como uma enzima mais fiel à exposição do zebrafish a praguicidas, do que a AChE.

- Esses resultados indicam que os metais alteram significativamente esterases em zebrafish, e devem ser considerados em estudos de monitoramento ambiental que utilizam a inibição de esterases como biomarcadores de exposição a OP e CM.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol. 6, p. 158-170, 2003.
- AZEVEDO, F. A., CHASIN, A. A. M. (org). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.**, São Carlos: Rima, 2003.
- BAINY, A.C.D. et al. *In vivo* effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. **Biotemas**, v. 19, p. 35-39, 2006.
- BALDWIN, D.H.; TATARA, C.P.; SCHOLZ, N.L. Copper-induced olfactory toxicity in salmon and steelhead: Extrapolation across species and rearing environments. **Aquatic Toxicology**, vol. 101, p. 295-297, 2011.
- BARATA, C.; SOLAYAN, A.; PORTE, C. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 125-139, 2004.
- BARBOSA, J.S. et al. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73 (3), p. 320–325 , 2010.
- BARRIONUEVO, W.R.; FERNANDES, M.N.; ROCHA, O. Aerobic and anaerobic metabolism for the zebrafish, *Danio rerio*, reared under normoxic and hypoxic conditions and exposed to acute hypoxia during development. **Brazilian Journal of Biology**, vol.70, p. 425-434, 2010.
- BONACCI, S. et al. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colberki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 445- 455, 2004.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- DUARTE, R.P.S., PASQUAL, A. Avaliação do Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. **Energia na Agricultura**, vol. 15, n. 1, p. 46–58, 2000.
- DICKENS, F. Interaction of halogenacetates and SH compounds. The reaction of halogenacetic acids with glutathione and cysteine. The mechanism of iodoacetate poisoning of glyoxalase. **Biochemical Journal**, vol. 27, p. 1141-1151, 1933.

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

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**, vol. 10, p. 360-375, 2005.

FRASCO, M.F. et al. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. **FEBS Journal**, vol. 274, p. 1849-1861, 2007.

GALLOWAY, T.S. et al. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, vol. 61, p. 169-180, 2002.

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 conchoni* Ham. (rosy barb). **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 100, p. 501-505, 1991.

GONÇALVES, J.F. et al. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, p. 53–60, 2010.

HILL, A.J. et al. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, p. 6-19, 2005.

HOLTH, T.F. et al. Differential gene expression and biomarkers in zebrafish (*Danio rerio*), following exposure to produced water components. **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 277–291, 2008.

HOWCROFT, C.F. et al. Biochemical characterization of cholinesterases in *Enchytraeus albidus* and assessment of *in vivo* and *in vitro* effects of different soil properties, copper and phenmedipham. **Ecotoxicology**, vol. 20, p. 119-130, 2011.

KEAY, L; CROOK, E.M. Effect of metals ions in hog liver esterase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 111, p. 626-634, 1965.

LEITE, P.Z. et al. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 17, p. 1411–1421, 2010.

LIU, S.Q. et al.. Characterisation of esterases of *Streptococcus thermophilus* ST1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B1079 as alcohol acyltransferases. **International Dairy Journal**, v.14, P.865–870, 2004.

MIAO, Y.; HE, N.; ZHU, J.J. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. **Chemical Reviews**, vol. 110, p. 5216–5234, 2010.

MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A.; BAINY, A.C. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. **Marine Environmental Research**, vol. 54, p. 781–785, 2002.

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**, vol. 58, p. 901-908, 1997.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Freeman, quarta edição, 2005.

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

PRETTO, A., et al. Acetylcholinesterase Activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 58, p. 1008–1014, 2010.

RICHETTI, S. K. et al. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **NeuroToxicology**, vol. 32, p. 116–122, 2011.

ROMANI, R. et al. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 145, p. 321-329, 2003.

SALVADOR, G.A.; URANGA, R.M.; GIUSTO, N.M. Iron and Mechanisms of Neurotoxicity. **International Journal of Alzheimer's Disease**, Article ID 720658, doi:10.4061/2011/720658, 2011.

SANT'ANNA, M.C.B. et al. Iron exposure modifies acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) tissues: distinct susceptibility of tissues to iron overload. **Fish Physiology and Biochemistry**, DOI: 10.1007/s10695-010-9459-7.

STRYER, L. **Bioquímica**. Editora Guanabara Koogan, terceira edição, 1992.

TILTON, F.A.; BAMMLER, T.K.; GALLAGHER, E.P. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 153 p. 9–16, 2011.

USEPA. Update of ambient water quality criteria for cadmium. EPA-822-R-01-001.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Washington, DC, USA, 2001.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment**, vol. 13, p.195-206, 1990.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALMEIDA, E.A.; LÓPEZ-BAREA, J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, *Crustacea*): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 145, p. 404-412, 2007.

WHEELLOCK, C.E. et al. Applications of Carboxylesterase Activity in Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 2008.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.) **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall. Englewood Cliffs, 1984.