

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMABILY BOHN

**CARACTERIZAÇÃO DA BUTIRILCOLINESTERASE E ANÁLISE DO EFEITO
DE METAIS PESADOS NA ATIVIDADE E FORMAS MOLECULARES DA
ENZIMA EM PEIXES DA ESPÉCIE *Hoplias intermedius***

CURITIBA

2016

AMABILY BOHN

**CARACTERIZAÇÃO DA BUTIRILCOLINESTERASE E ANÁLISE DO EFEITO
DE METAIS PESADOS NA ATIVIDADE E FORMAS MOLECULARES DA
ENZIMA EM PEIXES DA ESPÉCIE *Hoplias intermedius***

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção de grau como Biólogo para a disciplina de Estágio Supervisionado em Biologia II (BIO027), do curso de Ciências Biológicas. Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Lupe Furtado Alle.
Departamento de Genética, UFPR.

Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Viater
Tureck.
Departamento de Genética, UFPR.

CURITIBA

2016

Para aqueles que se foram tão cedo desta vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Andréa e Dalmir, que sempre me apoiaram, incentivaram e proferiram as palavras certas para que eu tomasse decisão por mim mesma. Ao meu irmão, Kauan, por estar sempre ao meu lado quando preciso. Ao meu namorado, Paulo, por ser meu melhor amigo e por ter estado por perto nos momentos mais difíceis, me ajudando a encontrar felicidade através de risadas. À minha colega de quarto, Meg, por trazer alegria aos meus dias. Ao restante de minha família, principalmente minha avó Dulce e minha tia Vilma, que sempre estiveram presentes na minha vida. Ao meu amigo Guilherme, que se tornou parte da família, obrigada por estar presente.

Aos amigos queridos que fiz durante a graduação e aqueles que estavam na minha vida antes, por sempre me apoiarem e me escutarem a qualquer custo.

Às meninas do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, Gabi, Carlinha, Lu, Saritha, Meire, Mayza e Nicoli, que se tornaram imensas companheiras, amigas e confidentes, tornando o dia a dia do trabalho sempre divertido e reconfortante.

Ao professor Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza por sempre atender com precisão às minhas dúvidas e por sempre ter me ajudado generosamente.

À minha orientadora, professora Dra. Lupe Furtado Alle por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho em sua parceria, confiar em mim e sempre atender às minhas dúvidas.

À minha coorientadora, professora Dra. Luciane Viater Tureck, por ser muito mais que uma orientadora, atendendo minhas preocupações pronta e carinhosamente, acreditando na minha capacidade e por ser uma maravilhosa amiga, sou eternamente grata.

“Eu, um universo de átomos, um átomo no universo.”

Richard Philips Feynman.

RESUMO

A butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2), sintetizada no fígado e distribuída por diversos tecidos. São conhecidas cinco formas moleculares, o monômero, monômero ligado à albumina, dímero, trímero e tetrâmero. A banda C₅ é um produto da junção entre o tetrâmero da BChE e uma proteína proveniente do loco *CHE2*. A butirilcolinesterase hidrolisa ésteres de colina e está envolvida na modulação de processos metabólicos, farmacológicos e toxicológicos. Já foram encontrados indícios de alteração da atividade enzimática da BChE relacionada à contaminação de ambientes em diversos animais, a maioria possui foco em mamíferos. Existem evidências de que a contaminação por metais pesados pode diminuir a atividade da BChE no organismo, porém não existem informações sobre a influência de nanopartículas nesta enzima. Esta monografia tem como objetivo caracterizar a atividade e as formas moleculares da BChE em peixes da espécie *Hoplias intermedius*, bem como investigar o efeito de metais pesados livres e ligados a nanopartículas na atividade da BChE. Nos resultados de caracterização, foram identificadas duas novas bandas nestes peixes ainda não vistas em amostras humanas, uma delas em rim, detectada pelo gel de poliacrilamida e outra em todos os tecidos, detectadas por gel de ágar ácido. Foi encontrada diferença significativa entre os tecidos de fígado ($\bar{x} = 1,33$) e cérebro ($\bar{x} = 0,79$) dos controles ($p = 0,02$), não foi encontrada diferença significativa entre os sexos feminino e masculino e entre peixes que estavam classificados acima e abaixo da mediana de peso dos controles. Nos resultados de contaminação, o alumínio, chumbo, íons de prata e nanopartículas de prata não influenciam na atividade enzimática, porém foram encontradas diferenças significativas entre fígado ($\bar{x} = 1,46$) e cérebro ($\bar{x} = 0,68$) e fígado ($\bar{x} = 1,46$) e rim ($\bar{x} = 0,92$) no tratamento de íons de prata ($p = 0,00$ e $p = 0,02$, respectivamente) e entre fígado ($\bar{x} = 1,57$) e cérebro ($\bar{x} = 0,69$) e cérebro ($\bar{x} = 0,69$) e rim ($\bar{x} = 0,93$) no tratamento com nanopartículas de prata ($p = 0,00$ e $p = 0,00$, respectivamente), quando os tecidos contaminados foram comparados entre si. A frequência das formas moleculares diferiram significativamente do controle nas contaminações por alumínio ($p = 0,01$) e por chumbo ($p = 0,03$) no tecido de fígado. O fenótipo CHE2 C5+ teve frequência maior no fígado (51,42%), seguido pelo rim (45,71%) e pelo cérebro (28,57%) e não houve diferenças significativas entre os controles e este fenótipo, com exceção do cérebro nas contaminações por íons de prata ($p = 0,00$) e nanopartículas de prata ($p = 0,00$).

Palavras-chave: Butirilcolinesterase. *Hoplias intermedius*. Atividade Enzimática. Formas Moleculares.

ABSTRACT

BChE is an enzyme encoded by the *BCHE* gene (3q26.1-q26.2), synthesized in the liver and distributed through several tissues. Five molecular forms are known, the monomer, albumin-bound monomer, dimer, trimer and tetramer. The C₅ band is a product of the junction between the tetramer of BChE and a protein from the *CHE2 locus*. Butyrylcholinesterase hydrolysis choline esters and is involved in the modulation of metabolic, pharmacological and toxicological processes. Evidence has already been found of the alteration enzymatic activity of BChE related to the contamination of environments in several animals, most of them is focused on mammals. There is evidence that heavy metal contamination may decrease BChE activity in the body, but there is no information on influence of nanoparticles on this enzyme. This monography aims to characterize the activity and molecular forms of butyrylcholinesterase in fish of the species *Hoplias intermedius*, as well as investigate the effect of free heavy metal and heavy metal bond to nanoparticles in BChE. On characterization results were identified two new bands in these fishes that still not seen in human samples, one of them in kidney tissue, detected by polyacrylamide gel and another in all tissues, detected by acid agar gel. Were found significant difference between liver ($\bar{x} = 1,33$) and brain ($\bar{x} = 0,79$) tissue of control ($p = 0,02$), there is no significant difference between feminine and masculine sexes and between fish that was classified above and below the control median of weight. On contamination results, aluminum, lead, silver ions e silver nanoparticles do not influence on enzymatic activity, however were found significant differences between liver ($\bar{x} = 1,46$) and brain ($\bar{x} = 0,68$) besides liver ($\bar{x} = 1,46$) and kidney ($\bar{x} = 0,92$) on the silver ions treatment ($p = 0,00$ e $p = 0,02$, respectively) and between liver ($\bar{x} = 1,57$) and brain ($\bar{x} = 0,69$) besides brain ($\bar{x} = 0,69$) and kidney ($\bar{x} = 0,93$) on silver nanoparticles treatment ($p = 0,00$ e $p = 0,00$, respectively), when contaminated tissues were compared with each other. The molecular forms frequency were significantly different of control on aluminum ($p = 0,01$) and lead ($p = 0,03$) contamination on liver tissue. The CHE2 C₅+ phenotype were higher frequency in the liver (51,42%), followed by kidney (45,71%) and brain (28,57%) and weren't significant differences between the control and this phenotype, except by the brain on the silver ions ($p = 0,00$) and silver nanoparticles ($p = 0,00$) contamination.

Keywords: Butyrylcholinesterase. *Hoplias intermedius*. Enzymatic activity. Molecular Forms.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	JUSTIFICATIVA	11
1.2	OBJETIVOS	11
1.2.1	Objetivo geral	11
1.2.2	Objetivos específicos.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	COLINESTERASES	13
2.2	VARIABILIDADE DO GENE <i>BCHE</i>	17
2.3	FORMAS MOLECULARES DA <i>BCHE</i>	19
2.4	O LOCO <i>CHE2</i>	19
2.5	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA <i>BCHE</i>	22
2.6	CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS E NANOPARTÍCULAS	22
2.7	A ESPÉCIE DE ESTUDO: <i>Hoplias intermedius</i>	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	AMOSTRAS	26
3.2	ANÁLISE ENZIMÁTICA DA <i>BChE</i>	27
3.3	FORMAS MOLECULARES DA <i>BChE</i>	28
3.4	FENOTIPAGEM DO LOCO <i>CHE2</i>	30
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	CARACTERIZAÇÃO	33
4.1.1	Novas formas moleculares	33
4.1.2	A atividade enzimática da <i>BChE</i> difere em função das diferentes concentrações de contaminantes?	35

4.1.3	A atividade enzimática da BChE difere entre os tecidos de cérebro, fígado e rim no controle negativo?	36
4.1.4	A atividade enzimática da BChE difere entre os sexos feminino e masculino no controle negativo?	37
4.1.5	A atividade enzimática da BChE difere acima ou abaixo da mediana do peso nos controles negativos?	38
4.2	CONTAMINAÇÕES	39
4.2.1	A atividade enzimática da BChE difere entre o controle negativo e as contaminações?	39
4.2.2	A atividade enzimática da BChE difere entre os tecidos de cérebro, fígado e rim nos tratamentos?	41
4.2.3	A frequência das formas moleculares difere entre o controle negativo e as contaminações?	43
4.2.3.1	Fígado	43
4.2.3.2	Cérebro	45
4.2.3.3	Rim	48
4.2.4	A frequência do fenótipo C5 difere entre o controle negativo e as contaminações?	50
4.2.4.1	Fígado	50
4.2.4.2	Cérebro	52
4.2.4.3	Rim	52
5	CONCLUSÕES	54
6	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos ambientes aquáticos são contaminados por compostos orgânicos e inorgânicos, majoritariamente por descaso humano. A dinâmica aquática permite que estas contaminações atinjam locais e espécies muito além da área inicial, causando efeitos que podem ser reversíveis ou não. As nanopartículas são componentes de uma nova tecnologia que está sendo utilizada, entre outros fins, para o tratamento de ambientes que sofreram poluição por metais pesados, já que é um material ótimo para adsorver estes compostos. Porém, antes de ser amplamente utilizadas, não foram realizados testes para averiguar se existem riscos para a saúde dos organismos vivos que entram em contato com estas partículas (QUINA, 2004).

Já foram encontradas evidências de que as nanopartículas podem causar indução de danos citotóxicos e genotóxicos em linhagens celulares (SOUZA, 2013), inflamações de tecidos intersticiais em ratos (SEATON, 1995) e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, causando danos ao DNA, apoptose e necrose (ARORA, 2008; KIM, 2009; FOLDBJERG, 2011; ASHARANI, 2009). No que se refere à butirilcolinesterase humana (BChE; EC 3.1.1.8), existem evidências de que a contaminação por metais pesados pode diminuir a atividade da enzima no organismo, deixando-a em níveis baixíssimos comparados aos níveis normais (BINEY, 1994; FRANCHI, 2004; QUINA, 2004; FARREL, 2011).

A BChE é uma enzima codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2), sintetizada no fígado e distribuída por diversos tecidos. São encontradas formas moleculares homoméricas, como o monômero, dímero, trímero e tetrâmero e formas heteroméricas, como o monômero ligado à albumina e a banda C₅, esta última proveniente da junção entre o tetrâmero da BChE e uma proteína proveniente do loco *CHE2*. Apesar do substrato natural e ação biológica da BChE não estarem totalmente elucidados, é conhecida sua função na hidrólise de ésteres de colina, o que sugere que ela atua na modulação de processos metabólicos, farmacológicos e toxicológicos diversos (FURTADO, 2005; IUMB).

A atividade enzimática da BChE já foi relacionada a diversos aspectos do metabolismo geral de alguns animais, porém, existem poucas informações de como esta enzima se comporta em animais não humanos, sendo mais numerosos os trabalhos relacionados a outros mamíferos, principalmente quando se trata de contaminação de ambientes (WHITTAKER, 1980; FURTADO, 2005; IUBMB).

1.1 JUSTIFICATIVA

Este estudo tem como proposta a caracterização da atividade enzimática da BChE, bem como de suas formas moleculares, na espécie de peixe *Hoplias intermedius*, considerando que estas informações permanecem desconhecidas. Além disso, pretende-se investigar os possíveis efeitos da contaminação por metais pesados (chumbo, alumínio e prata), ligados e não ligados a nanopartículas de prata na atividade e formas moleculares desta enzima nestes animais, a fim de verificar se tais parâmetros podem servir como marcadores de toxicidade do ambiente aquático.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar a atividade enzimática e as formas moleculares da butirilcolinesterase em peixes da espécie *Hoplias intermedius* e verificar se tais parâmetros podem vir a ser utilizados como marcadores de contaminação do ambiente aquático.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Comparar a atividade enzimática e as formas moleculares da BChE entre os peixes da espécie *Hoplias intermedius* e humanos.
- b) Traçar o perfil da atividade da BChE em função do sexo, peso e diferentes tecidos de *Hoplias intermedius*.
- c) Verificar se existem diferenças na atividade enzimática e formas moleculares da BChE entre os peixes expostos a contaminação (metais

pesados e metais pesados ligados à nanopartículas) e peixes não contaminados.

d) Verificar se as contaminações agudas e subcrônicas acarretam em diferenças na atividade da BChE.

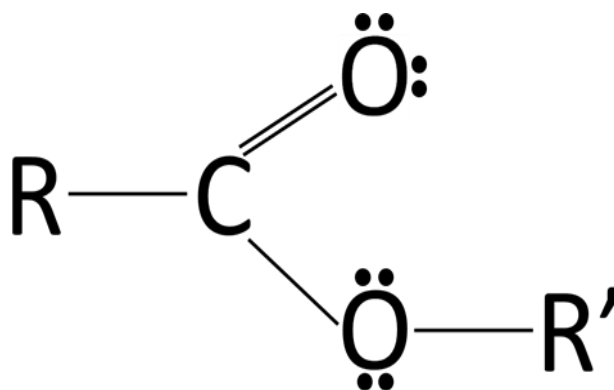
e) Verificar se a atividade da BChE dos diferentes tipos de tecido do peixe (cérebro, rim e fígado) responde de forma diferente à exposição a contaminação por metais pesados e metais pesados ligados à nanopartículas

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COLINESTERASES

O grupo funcional dos ésteres é caracterizado pela presença de um carbono que se associa a dois oxigênios (através de uma ligação dupla e de uma ligação simples) e a um radical não estabelecido, como demonstrado na FIGURA 1 (SOLOMONS, 2001). As esterases são enzimas que hidrolisam ésteres e podem ser diferenciadas de acordo com o substrato no qual reagem (TALIB, 2014), sendo classificadas como esterases aromáticas, aliesterases e colinesterases que apresentam predileção por ésteres aromáticos, ésteres alifáticos e ésteres de colina, respectivamente (FURTADO, 2005). Existem dois tipos de colinesterases encontradas em tecidos humanos e de animais não humanos, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE).

FIGURA 1- LIGAÇÕES QUE CARACTERIZAM UM GRUPO FUNCIONAL ÉSTER.



FONTE: Adaptado de SOLOMONS (2001).

Legenda: Os círculos representam elétrons estáveis, as linhas representam as ligações entre os elementos e o r/r' representam radicais diferentes.

A acetilcolinesterase humana (AChE; EC 3.1.1.7), também conhecida como colinesterase verdadeira, esterase de colina I, acetiltiocolinesterase e acetilcolina hidrolase, catalisa a reação de hidrólise da acetilcolina, que reage junto à água e produz colina e acetato. Ela pode reagir com diversos ésteres de acetatos e catalisar reações de transacetilações, processo de transferência de um grupamento acetil de um composto para outro (IUBMB). A hidrólise da

acetilcolina permite o controle sináptico e a atividade colinérgica neuro-humoral (XIE, 2010), a sua função central acontece nas junções neuromusculares e sinapses colinérgicas no cérebro (NCBI). A AChE é uma molécula pequena que causa resposta aguda no sistema nervoso central, assim como a noradrenalina, dopamina e serotonina, por exemplo. Ela é o transmissor da junção muscular, além de ser o transmissor nervo-a-nervo quando fora do cérebro e na medula espinhal dos vertebrados (LUCIARI, 2010). A TABELA 1 contém informações sobre alguns sistemas onde a acetilcolina funciona como neurotransmissor pós-ganglionar, ou seja, aqueles que estão em contato direto com o tecido-alvo. Esta enzima ocorre em diversos seres vivos e é resultante de vários genes em diferentes cromossomos, por exemplo, em humanos ele é produzido por um gene localizado no braço longo do cromossomo 7, em gado bovino é codificada por um gene do cromossomo 25 e em cães domésticos por um gene no cromossomo 6 (o gado bovino possui um conjunto cromossômico 29,XX/29,XY e cães 38,XX/38,XY) (NCBI).

TABELA 1 - ALGUNS ÓRGÃOS EM QUE A ACETILCOLINA AGE COMO NEUROTRANSMISSOR PÓS-GANGLIONAR E A RESPOSTA DIFERENCIADA DO SISTEMA SIMPÁTICO E PARASSIMPÁTICO EM DIVERSOS VERTEBRADOS.

Órgão	Estimulação Parassimpática	Estimulação Simpática
Iris	Miose	Midriase
Cristalino	Acomodação para perto	Acomodação para longe
Glândulas		
- salivares	Salivação copiosa	Salivação viscosa
- digestivas	Estimulação da secreção	Diminuição da secreção
- lacrimais	Diminuição do lacrimejamento	Lacrimejamento
- sudoríparas	Sem inervação	Sudorese*
Trato gastrointestinal		
- esfíncteres	Relaxamento	Contração
- parede	Maior motilidade	Menor motilidade
- vesícula biliar	Contração	Relaxamento
Pâncreas endócrino	Aumenta secreção de insulina	Diminui secreção de insulina
Fígado	Glicogênese	Glicólise
Tecido adiposo	Não tem inervação	Lipólise
Bexiga urinária		
- parede	Contração	Relaxamento
- esfíncter	Relaxamento	Contração
Coração	Bradycardia	Taquicardia
Bronquios	Broncoconstrição	Broncodilatação
Vasos sanguíneos	Não tem inervação	Vasoconstrição
Pênis	Ereção	Ejaculação

FONTE: LUCIARI (2010) p. 14.

A butirilcolinesterase humana (EC 3.1.1.8), também conhecida como pseudocolinesterase, colinesterase não específica, esterase de colina II é codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1–q26.2) e catalisa a reação de hidrólise de diversas acilcolinas produzindo colina e carboxilato. Pode agir em uma grande variedade de ésteres de colina e alguns outros compostos, porém é mais eficiente na hidrólise da butirilcolina (IUBMB; WHITTAKER, 1980). A função da butirilcolinesterase ainda não é muito clara, porém existem pesquisas que indicam a possibilidade da BChE regular a acetilcolina e funcionar como mecanismo de compensação na falta desta, como evidenciou Lockridge¹ (1988, citado por SABINO, 2014, p.125-128). Além disto, possui papel importante no metabolismo geral de lipídeos (KUTTY, 1980) assim como na desintoxicação do organismo (FUKAMI, 2012; YOKOI, 2012). Também participa da metabolização do relaxante muscular succilcolina e do anestésico local procaína, sendo utilizada em diagnósticos clínicos de envenenamento por organofosfatos. (LOCKRIDGE, 1979).

Apesar de não estarem completamente claras suas funções, a enzima derivada do gene *BCHE* participa de diversos processos do organismo, como demonstrado na TABELA 2. Estes dados são provenientes de vários estudos, alguns destes utilizaram material biológico humano, porém outros são derivados de estudos com outros animais, como de *Mus musculus* (Camundongo), *Rattus norvegicus* (Rato-marrom) e *Panthera tigris tigris* (Tigre-de-bengala).

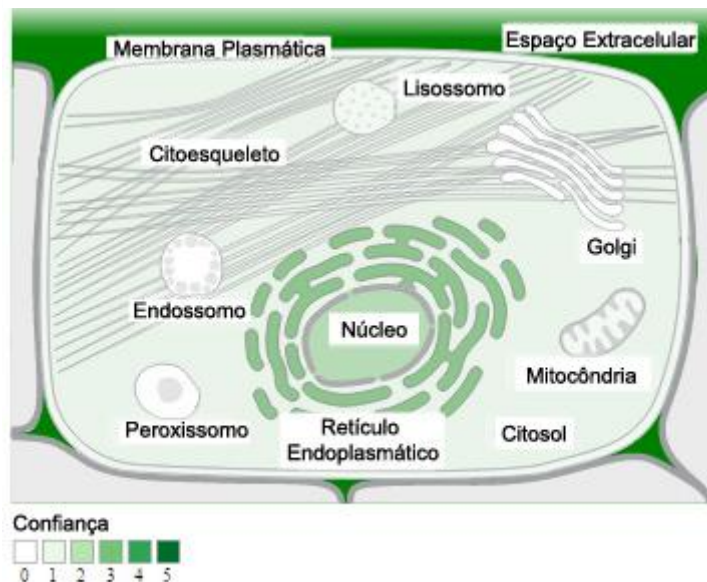
TABELA 2 - FUNÇÕES E PROCESSOS NAS QUAIS A PROTEÍNA PROVENIENTE DO GENE *BCHE* PARTICIPA EM HUMANOS.

Funções	Processos nos quais está envolvido
Atividade Catalítica	Aprendizado
	Diferenciação de Neuroblastos
Atividade de Acetilcolinesterase	Processamento Metabólico de Cocaína
	Processamento Metabólico de Colina
Atividade de Colinesterase	Processamento Metabólico de Proteínas Celulares
	Regulação Negativa de Proliferação Celular
Ligação Beta amiloide	Regulação Negativa de Transmissão Sináptica
	Resposta ao Ácido Fólico
Ligação de Colina	Resposta a Alcalóides
	Resposta a Drogas
Ligação de Proteína Idêntica	Resposta a Glucocorticóide

FONTE: NCBI.

GOODMAN (1973), BERGMAYER (1974) e SUNSHINE (1975) (citado por SIQUEIRA, 1978, p.1) evidenciam que a AChE humana é encontrada principalmente nos eritrócitos, neurônios, gânglios do sistema nervoso autônomo e placas motoras terminais. De acordo com o NCBI também foi encontrado no aparato de Golgi, como um componente ancorado à membrana, lâmina basal, junção celular, superfície celular, região extracelular, junção neuromuscular, núcleo, região perinuclear do citoplasma e membrana plasmática. Já a BChE humana é produzida no fígado e encontrada preferencialmente no plasma, neuroglias e paredes do tubo digestivo. Foram encontrados indícios de que a butirilcolinesterase também é sintetizada em adipócitos humanos e de ratos (ORESKOVIC, 1992; POPOVIC,1998). Também foi encontrado como uma micropartícula do sangue, componente do lúmen do retículo endoplasmático, região extracelular, membranas e lúmen do envelope nuclear (NCBI). Na FIGURA 2, estão indicadas informações acerca da presença da butirilcolinesterase.

FIGURA 2 - PRESENÇA DA BUTIRILCOLINESTERASE NA CÉLULA HUMANA E ESPAÇO EXTRACELULAR.



FONTE: Adaptado de Gene Cards.

Legenda: As cores mais claras indicam menores indícios da presença da enzima e as cores mais fortes indicam fortes indícios.

2.2 VARIABILIDADE DO GENE *BCHE*

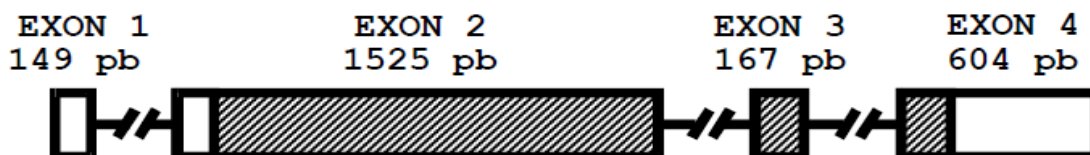
A identificação de um único gene codificante para a enzima butirilcolinesterase foi feita por Arpagaus et al., 1990 (citado por FURTADO, 2005, p. 12). Em humanos, o gene *BCHE* está localizado no braço longo do cromossomo 3 (FIGURA 3), possui 4 éxons e é constituído por 64.569 pares de base (NCBI, acessado em 02/02/2016), porém apenas 1722 pb dos éxons 2, 3 e 4 dão origem à enzima madura, como demonstrado na FIGURA 4 (BOBERG, 2008). Mais de 65 polimorfismos já foram identificados neste gene, sendo que muitos deles são raros e acarretam em atividade enzimática reduzida na proteína produzida a partir destas variantes alélicas, em comparação à enzima produzida a partir do gene sem as alterações (MIKAMI, 2005). Algumas destas mutações substituem apenas um aminoácido, o que pode aumentar a sensibilidade a ésteres de colina e a algumas outras drogas (Genetics Home Reference, acessado em 12/10/2016).

FIGURA 3 – REGIÃO 3q26.1 (LINHA VERMELHA) ONDE O GENE *BCHE* ESTÁ LOCALIZADO.



FONTE: THE UCSC GENOME BROWSER.

FIGURA 4 – DESENHO ESQUEMÁTICO DEMONSTRANDO O NÚMERO DE PARES DE BASES EM CADA ÉXON.



FONTE: FURTADO (2005).

Nota: A hachura destaca as regiões que codificam para a enzima madura.

De acordo com dados do NCBI (acessado em 02/02/2016), o gene *BCHE* humano possui similaridade de 99% com diversas regiões do gene *BCHE* de diferentes primatas estudados, entre eles o *Pan troglodytes* (Chimpanzé), *Pan paniscus* (Bonobo), *Gorilla gorilla gorilla* (subespécie do Gorila-do-ocidente) e *Pongo abelii* (Orangotando-de-sumatra). A similaridade diminui entre distintos grupos de mamíferos, não existindo nenhum registro de identidade com outros grupos animais, Como aves, répteis ou peixes. Diversos

estudos apontam que *BCHE* é ortólogo (proveniente de um mesmo ancestral comum) em 70 espécies, a maioria mamíferos, além de aves, répteis, peixes e invertebrados e parálogo (provenientes de duplicação) em 12 espécies (Ensembl, acessado em 12/10/2016). Dentre os ortólogos, estudos com *Mus musculus* (Camundongo) e *Rattus norvegicus* (Ratazana) mostraram algumas doenças e fenótipos onde a BChE foi encontrada. Na TABELA 3 estão listadas estas associações.

TABELA 3 – FENÓTIPOS E DOENÇAS ASSOCIADAS ÀS ORTÓLOGOS DA *BCHE* EM *Mus musculus* E *Rattus norvegicus*.

Organismo	Fenótipo/Doença
<i>Mus musculus</i>	Sensibilidade aumentada por xenobiótico que induz morte Sensibilidade fisiológica por xenobiótico aumentada
	Metabolismo de Carboidratos (Erro Inato)
	Demência Pré-senil e Senil
	Insolação
	Doença de Huntington
	Amnésia
	Tripanossomíase
	Paranóia/Esquizofrenia
	Reestenose Coronária
	Meningite Bacteriana
	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1 e 2
	Hiperlipidemias
	Placa Amilóide
	Diferenciação do Neuroblasto
<i>Rattus norvegicus</i>	Deficiência de Butirilcolinesterase Resistente à Fluoreto
	Epilepsia Autossômica Dominante Lateral do Lobo Temporal
	Leptospirose
	Distrofia Muscular Congênita
	Doença Coronária Arterial
	Síndrome Metabólica do X
	Hiperhomocisteinemia
	Regulação Negativa de Proliferação Celular
	Hipertensão
	Disordens Distônicas
	Resistência à Insulina
	Esclerose Múltipla com Progressão Múltipla
	Endotoxemia
	Doença de Alzheimer

FONTE: Adaptado de ENSEMBL.

2.3 FORMAS MOLECULARES DA *BChE*

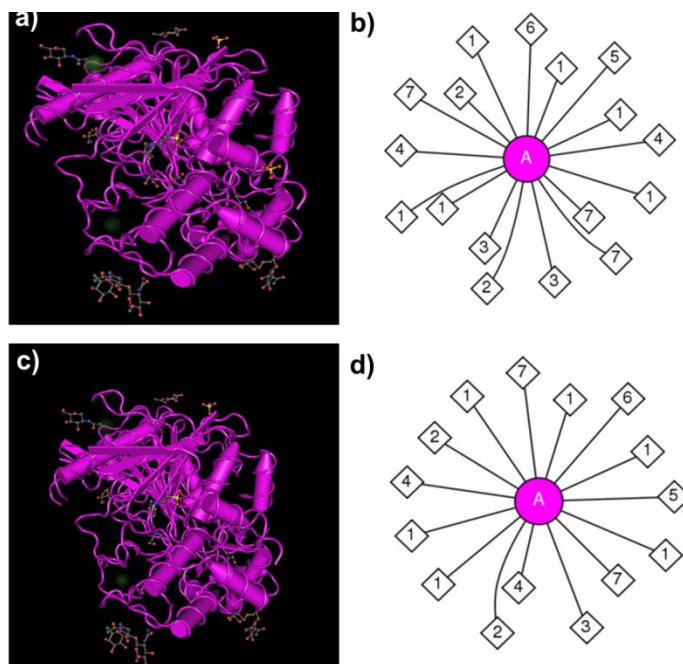
A BChE humana possui formas homoméricas (as subunidades que a compõe são idênticas) e heteroméricas (as subunidades são diferentes umas das outras), sendo que a nomenclaturas destas formas moleculares dependerem de duas classificações distintas (FURTADO, 2005; SILVA, 2012). Uma delas é referente às formas que são identificáveis na migração eletroforética, postulada primeiramente. Nesta classificação, o monômero é chamado de C_1 , o monômero ligado à albumina de C_2 , o dímero de C_3 e o tetrâmero de C_4 (HARRIS, 1962). Outra classificação sugerida levou em consideração a estrutura molecular da BChE, sendo o monômero chamado de G_1 , o monômero ligado à albumina de G_1 -ALB, o dímero de G_2 , o trímero de G_3 e o tetrâmero de G_4 (SILVA, 2012). A forma monomérica da butirilcolinesterase humana é composta de 574 resíduos de aminoácidos, flanqueada lateralmente por nove cadeias de oligossacarídeos, que por sua vez estão ligados a nove aminoácidos asparagina. O dímero é constituído de dois monômeros idênticos unidos através de uma ligação dissulfeto entre resíduos Cys571. O trímero é uma forma de mobilidade eletroforética intermediária entre o dímero e o tetrâmero, que foi descoberto a partir de exposições com diferentes proteases, como a tripsina ou a plasmina. O tetrâmero é a forma mais abundante no plasma humano e é formado por dímeros de dímeros, unidos através de ligações não covalentes (LOCKRIDGE, 1982; 1987). Na FIGURA 5 estão demonstradas ilustrações das interações e os gráficos moleculares da BChE quando não está ligada a nenhum substrato (a e b) e quando está ligada a uma molécula de colina (c e d).

2.4 O LOCO *CHE2*

No loco *CHE2* (2q33-35) há uma sequência responsável por codificar uma proteína que ainda permanece desconhecida e que, provavelmente, interage com a forma tetramérica da BChE, resultando no complexo C_5 . HARRIS et al. (1962, citado por FURTADO, 2005, p.15) encontraram esta banda por meio de eletroforese bidimensional em papel de amido e definiu a partir dela dois alelos provenientes deste loco, o $CHE2^*C_{5+}$ e o $CHE2^*C_{5-}$, correspondentes à presença e ausência do complexo C_5 , respectivamente. Na

FIGURA 6 há uma ilustração da região aproximada em que o loco *CHE2* está posicionado no braço longo do cromossomo 2.

FIGURA 5 – INTERAÇÕES DA BChE COM DIVERSAS MOLÉCULAS QUANDO LIGADA OU NÃO LIGADA A UM SUBSTRATO.



FONTE: Adaptado de NCBI.

Legenda: **a)** Representação espacial da enzima sem ligação com substrato. **b)** Interações da BChE sem estar ligada a um substrato. A) Representa a proteína; 1) N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA; 2) ALFA-L-FUCOSE; 3) Íon Sulfato; 4) Íon Cloreto; 5) Ácido Butanóico; 6) Ácido Morfolinoetanosulfônico; 7) Glicerol. **c)** Representação espacial da enzima ligada a um substrato. **d)** Interações da BChE ligada à uma molécula de colina. A) Representa a proteína; 1) N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA; 2) ALFA-L-FUCOSE; 3) Íon Sulfato; 4) Íon Cloreto; 5) Ácido Butanóico; 6) Ácido Morfolinoetanosulfônico e 7) Íon Colina e 8) Glicerol.

FIGURA 6 - REGIÃO APROXIMADA DA LOCALIZAÇÃO DO LOCO *CHE2* NO BRAÇO LONGO DO CROMOSSOMO 2 (LINHA VERMELHA).

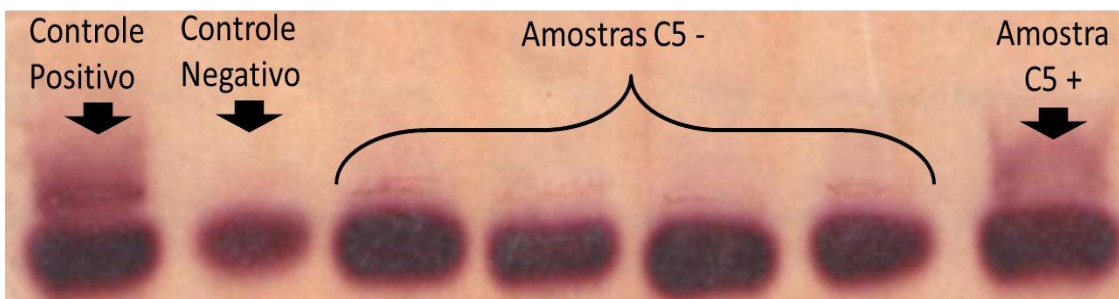


FONTE: THE UCSC GENOME BROWSER.

A interação entre as duas proteínas resulta em uma quinta banda, chamada de C_5 , visualizada no gel de ágar ácido, diferentemente das demais formas moleculares conhecidas. O fenótipo $CHE2 C_5+$ corresponde à presença

do complexo C_5 (identificado como uma banda adicional, que corre à favor da corrente aplicada) e o fenótipo $CHE2 C_5^-$ a ausência deste complexo (banda ausente), sendo tais fenótipos identificados em gel de ágar ácido, como demonstrado na FIGURA 7. Estudos em humanos da cidade de Curitiba demonstram que indivíduos $CHE2 C_5^+$ englobam 10,3% da população, enquanto o fenótipo $CHE2 C_5^-$ corresponde a 89,7%. Além disto, indivíduos portadores do complexo C_5 apresentam a atividade da BChE aumentada e são menos sensíveis à succinilcolina (SUGIMORI, 1986; CHATAURD-FREIRE-MAIA, 1991; BOBERG, 2010; DANTAS, 2011).

FIGURA 7 - RESULTADO DO GEL DE ÁGAR ÁCIDO EM AMOSTRAS HUMANAS



FONTE: O autor (2016).

Legenda: Estão indicados o controle positivo, negativo e o resultado das amostras analisadas.

Estudos visando buscar informações acerca da banda C_5 foram realizados e a partir dos resultados é possível inferir que forma molecular da BChE é responsável por esse complexo e descobrir alguma informação sobre a proteína proveniente do loco *CHE2*. Através de testes em gel de poliacrilamida, com amostras humanas e utilizando um padrão de peso molecular, foi atribuído o valor de 400 quilodaltons (kDa) para o composto C_5 , 60 kDa maior que o peso molecular do tetrâmero humano da BChE. Este fato levou a proposição de que há uma proteína que se une com C_4 , assim como acontece com o monômero ligado à albumina. A banda C_5 foi tratada com agentes redutores, pressão de 3,5 quilobares (kBar), tripsina e altas concentrações de sal (NaCl 1,5 – 4,0 M). Nos dois primeiros tratamentos não houve alteração da banda C_5 , já nos dois últimos houve dissociação da banda C_5 na banda C_4 , o que é uma evidência para indicar que a associação entre o tetrâmero e a outra proteína é

feita através de ligações não covalentes, predominando as interações iônicas, de acordo com MASSON (1991, citado por FURTADO, 2005, p. 16-17).

2.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE

A medida da atividade enzimática é a mensuração de quanto a BChE consegue hidrolisar um substrato, neste caso o substrato utilizado é a butiriltiocolina, pela sua maior afinidade com a enzima em animais não humanos (WHITTAKER, 1980). Diversos estudos apontam uma correlação positiva da atividade da butirilcolinesterase com algumas doenças e condições de risco, como hipertensão, diabetes, obesidade e câncer (LUNKES, 2006; World Health Organization, 2012).

A BChE apresenta atividades significativamente diferentes em espécies distintas. A atividade média total é similar em cães, humanos, mini-porcos e macacos, porém, estes organismos apresentam atividade média maior do que em roedores e coelhos, o que pode ser relacionado com a compensação da butirilcolinesterase por carboxiesterases nestes organismos. Um estudo com aves de rapina da Europa demonstrou que a BChE é a enzima que domina a atividade total das colinesterases nestes grupos, exceto na família Falconidae onde a AChE foi a dominante (ROY, 2005; RUDAKOVA, 2010; Bahar, 2012).

Em estudos envolvendo a atividade da butirilcolinesterase com a contaminação de organismos através de metais pesados, a correlação parece ser negativa. Isto pode ocorrer pela capacidade que alguns metais pesados possuem de inibir a enzima. Além disto, a contaminação pode induzir a perda das estruturas responsáveis pela função catalítica da enzima (COMPANY, 2006).

2.6 CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS E NANOPARTÍCULAS

Alguns metais pesados ocorrem naturalmente nos sistemas aquáticos em baixas concentrações, como o cobre, ferro, manganês, cobalto e iodo (chamados de metais essenciais), sendo importante em processos fisiológicos dos seres vivos. Os metais não essenciais, como o cádmio, mercúrio, chumbo e alumínio, são os principais causadores de intoxicações em ambientes aquáticos. Estes não são biodegradáveis e sua tendência é de acúmulo nos

tecidos de organismos vivos, causando diversas consequências (BINEY, 1994; FRANCHI, 2004; FARREL, 2011).

A contaminação por chumbo (Pb) é causada principalmente pelo descarte inadequado de pilhas e baterias e a grande quantidade deste metal no organismo causa fadiga, anemia e problemas neurológicos, além de sensação de paladar com gosto metálico (FRANCHI, 2004). O alumínio (Al) ocorre em maior quantidade na crosta terrestre, porém pode afetar ambientes aquáticos. Em águas acidificadas ou quando está em grande volume, é quando o alumínio se torna mais tóxico (PÓLEO, 1995; NAYAK, 2002).

As nanopartículas (Np - 10^{-9}) são partículas microscópicas, que possuem grande área de superfície e podem apresentar propriedades ópticas e magnéticas (quando irradiadas, podem alterar o campo magnético próximo da nanoestrutura), mecânicas (microdureza, resistência coesiva, rugosidade e perda de massa por abrasão) ou químicas (tendência de aglomeração por seu tamanho reduzido). Por este motivo, as nanopartículas estão sendo usadas em muitos processos tecnológicos para prevenção, detecção ou tratamento da poluição de ambientes. No caso de tratamento, a extensa área de superfície dessas partículas causa um grande poder de adsorção (retenção na superfície) de moléculas, podendo ser usado para diminuir a contaminação por metais pesados. Embora o uso desta tecnologia pareça promissor, não foi comprovado que as nanopartículas sejam seguras para os organismos vivos (QUINA, 2004). Existem evidências de que as nanopartículas podem causar danos, em tecidos de diversos organismos, que parecem estar relacionados ao tamanho (as menores conseguem invadir tecidos com mais facilidade) e às características físico-químicas das partículas (OBERDÖRSTER, 2005). Estudos demonstraram indução de danos citotóxicos e genotóxicos em linhagens celulares (SOUZA, 2013), inflamação em tecidos intersticiais em ratos, quando em tamanho de 20 nanômetros (SEATON, 1995) e em particular, estudos demonstram que as nanopartículas de prata (NpAg) podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, causando danos ao DNA, apoptose e necrose de células (ARORA, 2008; ASHARANI, 2009; KIM, 2009; FOLDBJERG, 2011).

2.7 A ESPÉCIE DE ESTUDO: *Hoplias intermedius*

Erythrinidae

Filo: *Chordata*

Subfilo: *Vertebrata*

Classe: *Actinopterygii*

Ordem: *Characiformes*

Família: *Characidae*

Gênero: *Hoplias*

Espécie: *Hoplias intermedius* (FIGURA 8)

Hoplias intermedius (Günther, 1864), mais conhecido como trairão, é uma espécie de peixe territorialista, dulcícola com preferência a ambientes lóticos, como rios e cachoeiras (OYAKAWA, 2009; GOULART, 2011), Sua distribuição é predominante da América do Sul, encontrado nas bacias dos rios São Francisco, Paraná e alguns tributários do Rio Doce no Brasil (FISHBASE). O nome *Hoplias* tem origem grega e significa armadura, uma referência ao seu couro espesso que envolve o crânio (FISHBASE). A taxonomia das espécies deste gênero é bastante ambígua, já que existem diversas descrições pouco profundas de vários espécimes (OYAKAWA, 1990). Podem atingir até 100 centímetros de comprimento e até 15 quilogramas de peso corporal, são carnívoros e possuem fontanela frontal (abertura entre os ossos frontais do crânio) de acordo com Britski (1972, citado por GOULART, 2011 p. 16). Peixes deste gênero são utilizados como modelo por possuir fácil adaptação e manutenção em condições laboratoriais, além disto, podem ser utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental, já que facilmente acumulam contaminantes (CESTARI, 2004; SILVA, 2011).

FIGURA 8 - IMAGEM DO PEIXE DA ESPÉCIE *HOPLIAS INTERMEDIUS*, ALVO DESTE ESTUDO.



FONTE: ATLAS DIGITAL DE PEIXES DE PERNAMBUCO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras que serão utilizadas derivam de uma parceria do Laboratório de Polimorfismos e Ligação com o Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, ambos do departamento de genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Neste último, foram realizadas pesquisas das quais o material biológico remanescente foi doado para o presente estudo. As amostras são obtidas a partir da retirada de tecidos de cérebro, fígado e rim anterior de indivíduos de *Hoplias intermedius* e homogeneização com soro bovino fetal.

As amostras que serão analisadas são referentes a dois grupos amostrais distintos. Em ambos os grupos, as diferentes concentrações e tipos de contaminante são utilizados para perceber o quanto do material é necessário para causar danos ao organismo. O primeiro é composto por 59 amostras de fígado provenientes de indivíduos juvenis de *Hoplias intermedius*, doados originalmente pela Estação de Psicultura e Hidrobiologia de Furnas-MG. Os peixes foram aclimatados durante 30 dias no ambiente laboratorial antes de receberem os tratamentos, cada peixe isolado em um tanque, por conta de seu hábito territorialista. As amostras controle e as contaminadas receberam um tratamento agudo, ou seja, 96 horas após receber a injeção intraperitoneal foram sacrificados. O controle é composto por 28 indivíduos que receberam uma injeção de água destilada, já que este é o solvente utilizado nas contaminações. Dezesesseis indivíduos foram contaminados com chumbo com concentração de 21 µg/g e quinze foram contaminados com alumínio com concentração de 50 µg/g. Após a exposição aguda, os peixes foram anestesiados até o óbito e o tecido do fígado foram imediatamente retirados, macerados e homogeneizados com soro bovino fetal. O segundo foi contaminado através de alimentação de 132 peixes, de cada um deles foi obtido uma amostra de cérebro, fígado e rim anterior, totalizando 396 amostras.

O tratamento agudo consistiu em alimentar os peixes com o contaminante apenas uma vez e após 96 horas o animal foi sacrificado, os tecidos do cérebro, fígado e rim anterior foram retirados e desagregados em

soro bovino fetal. Os controles negativos (n=20) receberam peixes normais de alimento e três grupos receberam o peixe contaminado com íons de prata (Ag⁺) em concentrações de 0,002 mg/kg (n=9), 0,02 mg/kg (n=9) e 0,2 mg/kg (n=8) e outros três grupos receberam nanopartículas de prata em concentrações de 0,002 mg/kg (n=15), 0,02 mg/kg (n=15) e 0,2 mg/kg (n=14). O tratamento subcrônico consistiu na alimentação dos peixes a cada 4 dias com o contaminante e este processo foi repetido 10 vezes. No controle negativo (n=15), o alimento foi dado neste período de tempo, porém sem contaminante. Para os peixes contaminados o alimento foi oferecido com Ag⁺ (n=15) e AgNP (n=13) em concentração de 0,02 mg/kg.

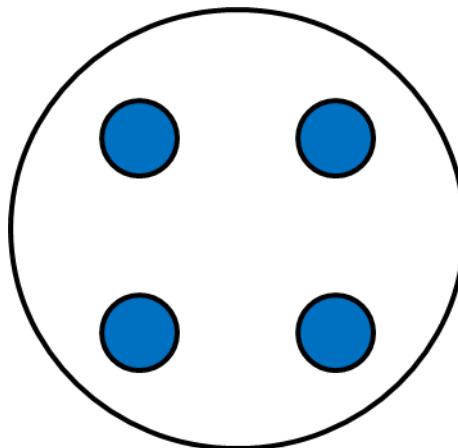
3.2 ANÁLISE ENZIMÁTICA DA BChE

Para a mensuração da atividade enzimática da BChE é necessária a diluição da amostra que será analisada. Desta maneira, são utilizados microtubos de 50 µL onde a amostra será misturada à água destilada na proporção de 1:1 (10 µL da amostra em 10 µL de água), já que estas amostras já estão diluídas em soro bovino fetal. São utilizados dois controles humanos de atividade enzimática já conhecida para avaliar a qualidade da placa, estas amostras são diluídas na proporção 1:100 (5 µL de plasma sanguíneo para 500 µL de água destilada). Na placa de leitura, adiciona-se 88 µL do tampão fosfato com 5,5-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico), também chamado de reagente de Ellman ou DTNB e posteriormente une-se neste tampão 10 µL da amostra diluída em duplicatas.

O substrato utilizado para a reação é a butiriltiocolina (, que reage com o DTNB do tampão e resulta em tiocolina e butirato, que por sua vez formam o 2-nitro-5-mercaptobenzoato, responsável pela cor amarelada da reação. O substrato deve ser adicionado em cada amostra nos poços logo antes de ser realizada a leitura, pois possui rápida reação. A leitura foi feita no aparelho TECAN®, com temperatura de 25°C, configuração de 4 ciclos com intervalo de um minuto, 410 nm de absorvância e múltiplas leituras por cada poço (demonstração na FIGURA 9). O resultado da leitura é demonstrado em uma tabela e está pronto para análise, que consiste na obtenção de diferenças no valor da absorvância entre os quatro ciclos (a temperatura deve ser mantida

constante em cada ciclo). A média destas diferenças nas duas leituras é calculada e multiplicada por uma constante de 96,3, resultando no valor da atividade enzimática da butirilcolinesterase em determinada amostra.

FIGURA 9 - ESQUEMA DAS REGIÕES ANALISADAS EM CADA POÇO.



FONTE: O autor, 2016.

Nota: Os círculos coloridos em azul indicam onde o equipamento mede a absorvância em um dos 96 poços da placa.

Durante o tempo do experimento, houve uma indisponibilidade em utilizar o TECAN®, então 109 amostras foram analisadas no aparelho Meridian Diagnostic®, EL_x X800 auto reader. Este espectrofotômetro possuía apenas 450 nm para a leitura. O restante da metodologia foi mantida.

3.3 FORMAS MOLECULARES DA BChE

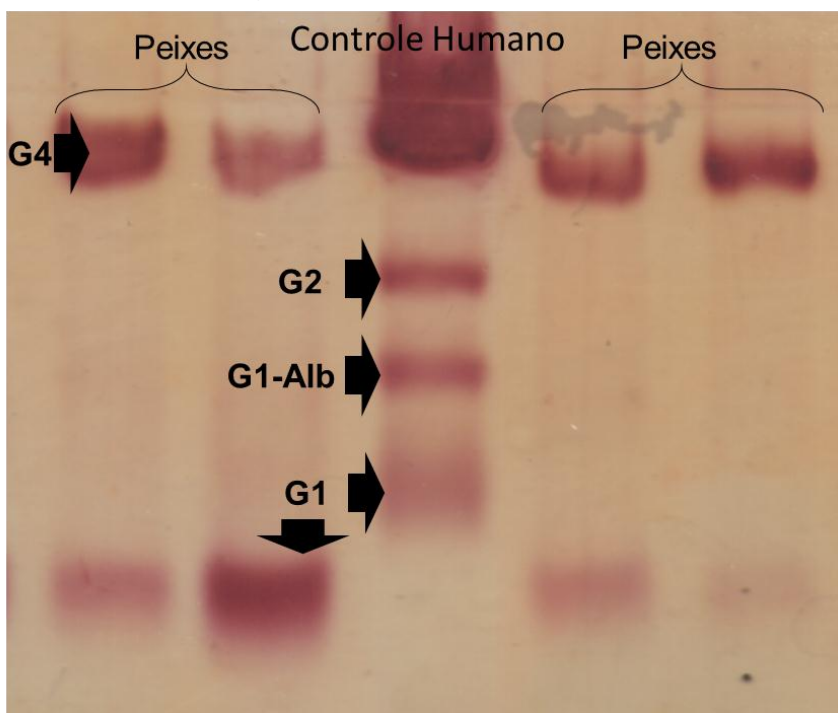
Para a determinação das formas moleculares da BChE utiliza-se um gel de poliacrilamida com dois gradientes de concentração, um 7% e outro 5%. Na cuba de eletroforese, monta-se o gel entre duas placas de vidro com espaçadores de 1mm de espessura, unidas umas às outras por grampos. O pente que molda os poços onde serão aplicadas as amostras deve ser utilizado para medir até onde o gel 7% irá ser depositado (um centímetro abaixo do fim do limite inferior do poço). O gel de concentração 7% (7 mL de acrilamida; 23 mL de TBE 1x; 25 µL de TMED e 250 µL de persulfato de amônio é introduzido no espaço entre os vidros, colocando após isso uma camada de butanol para alinhar o gel. Após 30 minutos de espera para a polimerização, retira-se o

butanol com água destilada. O gel de 5% (3,5 mL de acrilamida; 16,5 mL de TBE 1x; 25 µL de TMED e 250 µL de persulfato de amônio) é despejado e logo depois o pente é colocado delicadamente para a delimitação dos poços durante a polimerização. Após polimerização (30 minutos), retira-se o pente cuidadosamente e lavam-se os poços com água destilada. Os poços são preenchidos com TBE 1x para evitar ressecamento e a superfície do gel é vedada com parafilme.

Após repouso, as amostras que serão aplicadas devem ser diluídas no tampão azul de bromofenol (7 µL de amostra para 9,8 µL de tampão), sendo aplicados 15 µL desta diluição em cada poço. A placa é posicionada na cuba, que por sua vez, é preenchida com o tampão TBE 1x que permite a passagem da corrente elétrica. Devem-se retirar bolhas que porventura fiquem entre o gel e o tampão, pois isto pode dificultar ou até mesmo impedir a passagem de corrente elétrica. Para a corrida, a cuba deve ser inserida na geladeira, os eletrodos conectados e a fonte ser configurada para 100V, 20mA, durante oito horas.

Para a revelação, o gel é retirado delicadamente das placas de vidro, colocado em um recipiente de vidro para coloração com um pouco de água destilada, para evitar que o gel grude. Por cima do gel, é jogada uma solução composta de 150 mg de corante *fast red* ou *fast blue* (cromógeno), 2,1 mL de α -naftil acetato (substrato) e 60 mL de tampão fosfato pH 7,1 e posteriormente é inserida em estufa à 37°C por aproximadamente 30 minutos. Ao término da revelação, as bandas adquirem uma coloração púrpura/avermelhada (*fast red*) ou roxa (*fast blue*). O gel deve ser colocado entre duas folhas de transparência e digitalizado. Na FIGURA 10 é possível visualizar o resultado final de um gel de poliacrilamida corado com *fast red*.

FIGURA 10 - DEMONSTRAÇÃO DO RESULTADO FINAL DE UM GEL PARA OBTENÇÃO DAS FORMAS MOLECULARES DA BCHE.



FONTE: O autor, 2016.

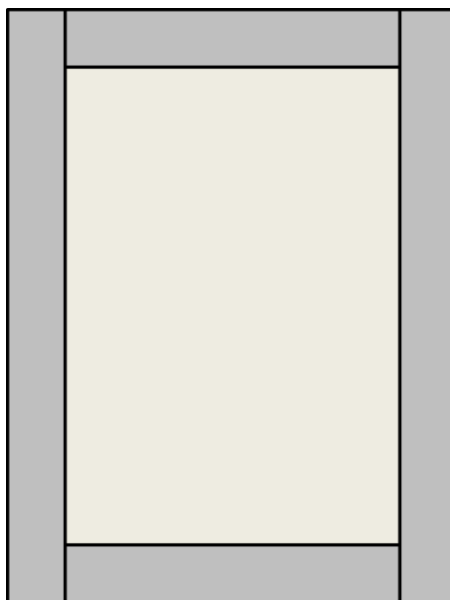
Legenda: A amostra ao centro é correspondente ao controle humano e as demais amostras são de peixes da espécie *Hoplias intermedius*. G4 corresponde ao tetrâmero, G2 ao dímero, G1 ao monômero e G1-Alb, monômero ligado à albumina.

3.4 FENOTIPAGEM DO LOCO *CHE2*

Para fenotipagem do loco *CHE2* e a identificação dos fenótipos $CHE2 C_{5+}$ e $CHE2 C_{5-}$ é utilizado o procedimento de eletroforese em gel de ágar ácido. Para a montagem do recipiente onde será depositado o gel são necessárias uma placa e barreiras de vidro, que são posicionadas nos cantos da placa com vaselina. As barreiras são fixadas com fita adesiva, para não escorregarem (FIGURA 11). A preparação do gel consiste na mistura de 5 mL de tampão citrato (10x) de pH 6,2 diluído para 1x em água destilada - o pH deve ser ajustado para aproximadamente 6,4 com solução de ácido cítrico 30%. Em seguida, há adição de 0,5 gramas de ágar e o aquecimento da solução formada - sem agitá-la ou misturá-la - em movimentos circulares até a sua completa dissolução. Após a preparação do gel, depositá-lo na placa montada no início e aguardar a polimerização. Deve-se armazená-lo em baixa temperatura, tampado com uma segunda placa de vidro, durante ao menos 12

horas, evitando assim o efeito da eletroendosse, que pode impedir a correta separação da banda C₅.

FIGURA 11 - ESQUEMA DE MONTAGEM DE CUBA PARA O GEL DE ÁGAR ÁCIDO.



FONTE: O Autor, 2016.

Nota: Os retângulos cinza escuros ilustram as barreiras de vidro que são dispostas acima da placa (cinza claro).

Com o gel pronto, são pipetados 2 μ L da amostra que é depositada na extremidade de uma placa retangular de cobre (aproximadamente 0,5 cm por 2,5 cm), que servirá para furar o gel e inserir a amostra simultaneamente, já que para este procedimento não há pentes para produzir os poços. Para a corrida é utilizado o tampão citrato pH 6,2 na cuba e um tecido molhado que unirá o gel ao tampão, permitindo a passagem da corrente elétrica. A fonte deve ser configurada para uma corrida a 125 V e 35 mA por quatro horas e o gel deve permanecer tampado durante a corrida com outra placa de vidro.

A revelação é feita com uma solução obtida a partir da união de 150 mg de corante *fast red* ou *fast blue* (cromógeno), 2,1 mL de α -naftil acetato (substrato) e 60 mL de tampão fosfato de pH 7,1. Esta solução é despejada sobre a placa, após a eletroforese, que é armazenada em estufa com temperatura de 37°C por aproximadamente 30 minutos. Para a obtenção do gel deve-se delicadamente remover as barreiras da placa de vidro e depositá-lo

sobre uma folha de fina composição. Por fim, é necessário levá-lo novamente à estufa 37°C com papel absorvente em ambas faces e com placas de vidro para mantê-lo reto. O gel é incorporado ao papel e é possível definir o fenótipo dos indivíduos analisados.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores de atividade enzimática foram testados quanto à normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors e Shapiro-Wilk. Os dados de atividade com distribuição paramétrica tiveram as médias comparadas entre os grupos (segundo o contaminante e tipo de contaminação crônica e subcrônica) por meio de teste t e com distribuição não paramétrica por meio do teste U de Mann-Whitney. A relação entre as variáveis sexo, faixas de peso corporal e diferentes tipos de tecido (cérebro, fígado e rim) foi analisado por meio de teste U de Mann-Whitney para distribuição não paramétrica e por teste t independente por grupos para distribuição paramétrica. As frequências das formas moleculares foram comparadas por meio do teste de χ^2 de independência com correção de Yates para amostras com $20 < n < 40$ e sem correção de Yates para amostras $n > 40$. Os valores de p considerados significativos são aqueles menores que 0,05 (nível de confiança de 95%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

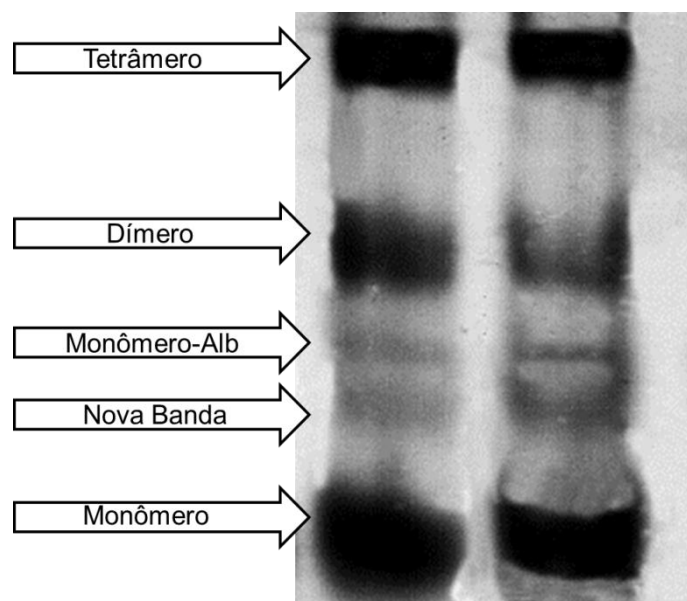
Com o intuito de deixar mais claro, os resultados foram separados em duas categorias distintas: a primeira referente aos resultados de caracterização e a segunda aos resultados de contaminação.

4.1 CARACTERIZAÇÃO

4.1.1 Novas formas moleculares

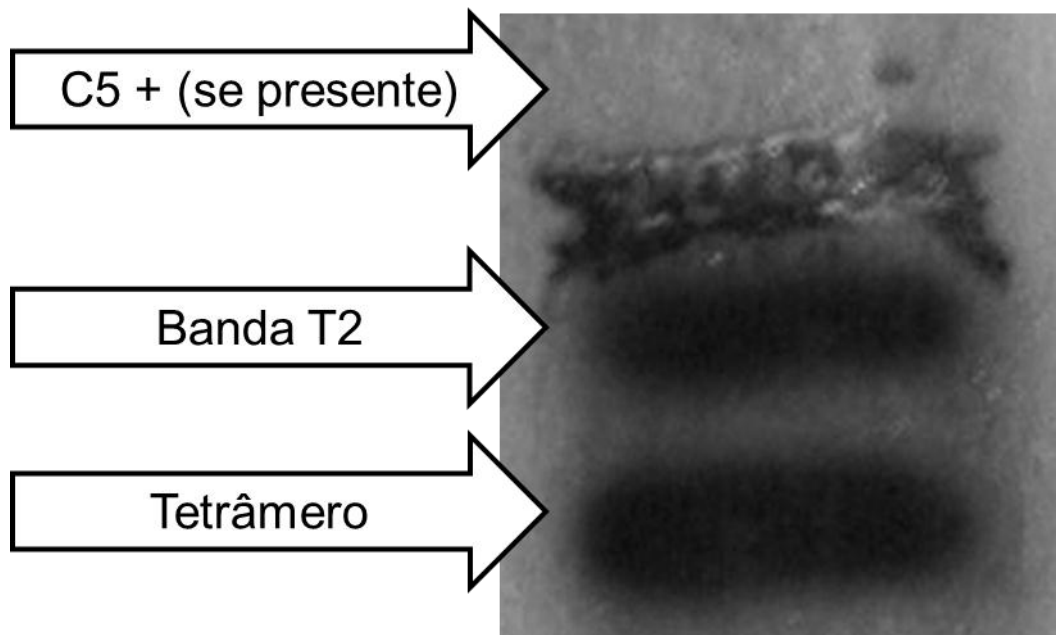
Durante o procedimento de eletroforese e revelação para a obtenção das formas moleculares do tecido de rim, foi encontrada uma nova banda que está localizada entre o monômero ligado à albumina e o monômero (FIGURA 12). Esta banda não aparece em nenhum indivíduo nos tecidos de fígado e cérebro. Já durante o procedimento de eletroforese e revelação para a obtenção produto do loco CHE2, foi encontrada uma nova banda (chamarei de banda T2) que está localizada entre o fenótipo CHE 2 C₅+ e e a banda C4 (FIGURA 13), ainda não encontrada em amostras humanas. Esta banda aparece em todos os tecidos. São necessários testes com um inibidor de butirilcolinesterase para afirmar se estas são realmente bandas provenientes da BChE ou de outra proteína.

FIGURA 12 – APRESENTAÇÃO DE NOVA BANDA EM ELETROFORESE NO TECIDO DE RIM.



FONTE: O autor, 2016.

FIGURA 13 – APRESENTAÇÃO DE NOVA BANDA EM ELETROFORESE NO GEL DE ÁGAR ÁCIDO.



FONTE: O autor, 2016.

A fim de trazer informações sobre a frequência do fenótipo C_5 e do fenótipo T2, foram calculadas as porcentagens de aparecimento da presença destas formas moleculares. A banda C_5 foi fenotipada em todos os indivíduos nos três tipos de tecido, porém em 23 de 35 indivíduos do controle negativo no segundo grupo amostral, o fenótipo C_5 aparecia em um tecido e não em outro. Na TABELA 4 está listada a frequência de cada fenótipo do loco *CHE2* e na TABELA 5 o fenótipo T2 nos três tecidos do controle negativo.

TABELA 4 – FREQUÊNCIAS DOS FENÓTIPOS C_5+ E C_5- NOS DIFERENTES TIPOS DE TECIDO DO CONTROLE NEGATIVO.

Fígado	Cérebro	Rim
51,42% C_5+	28,57% C_5+	45,71% C_5+
48,58% C_5-	71,42% C_5-	54,28% C_5-

FONTE: O autor, 2016.

TABELA 5 – FREQUÊNCIAS DOS FENÓTIPOS T2+ E T2- NOS DIFERENTES TIPOS DE TECIDO DO CONTROLE NEGATIVO.

Fígado	Cérebro	Rim
28,57% T2+	0% T2+	22,85% T2+
71,42% T2 -	100% T2 -	77,14% T2-

FONTE: O autor, 2016.

4.1.2 A atividade enzimática da BChE difere em função das diferentes concentrações de contaminantes?

No tratamento agudo do segundo grupo de estudo, os trairões foram submetidos a seis tipos de contaminação: contaminação com íons de prata em concentrações de 0,002 mg/kg (n=9), 0,02 mg/kg (n=9) e 0,2 mg/kg (n=8) e contaminação por nanopartículas de prata em concentrações de 0,002 mg/kg (n=15), 0,02 mg/kg (n=15) e 0,2 mg/kg (n=14). Como o número de indivíduos é muito pequeno nas diferentes contaminações para ser estatisticamente significativo nas análises, foi verificado se houveram diferenças significativas entre os grupos, a fim de poder agrupá-los. Os contaminantes foram testados dois a dois por meio do teste U de Mann-Whitney, com a variável dependente correspondente à atividade enzimática e a variável independente foi uma categoria 0 e 1 que diferenciou os grupos. Nas TABELAS 6, 7 e 8 estão os resultados desta análise para as contaminações de Ag⁺ e NpAg no cérebro, fígado e rim, respectivamente.

TABELA 6 – RESULTADOS DO TESTE U DE MANN-WHITNEY PARA AS COMPARAÇÕES DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINAÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA BChE NO CÉREBRO.

CÉREBRO	Ag ⁺	NpAg
0,002mg/kg e 0,02mg/kg	$\bar{x} = 0,62$ e $\bar{x} = 0,67$ (p = 0,66)	$\bar{x} = 0,59$ e $\bar{x} = 0,72$ (p = 0,09)
0,002mg/kg e 0,2 mg/kg	$\bar{x} = 0,62$ e $\bar{x} = 0,74$ (p = 0,19)	$\bar{x} = 0,59$ e $\bar{x} = 0,66$ (p = 0,45)
0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg	$\bar{x} = 0,67$ e $\bar{x} = 0,74$ (p = 0,48)	$\bar{x} = 0,72$ e $\bar{x} = 0,66$ (p = 0,42)

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

TABELA 7 – RESULTADOS DO TESTE U DE MANN-WHITNEY PARA AS COMPARAÇÕES DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINAÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA BChE NO FÍGADO.

FÍGADO	Ag+	NpAg
0,002mg/kg e 0,02mg/kg	$\bar{x} = 1,30$ e $\bar{x} = 1,83$ ($p = 0,66$)	$\bar{x} = 0,86$ e $\bar{x} = 1,92$ ($p = 0,87$)
0,002mg/kg e 0,2 mg/kg	$\bar{x} = 1,30$ e $\bar{x} = 1,08$ ($p = 0,41$)	$\bar{x} = 0,86$ e $\bar{x} = 1,59$ ($p = 0,27$)
0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg	$\bar{x} = 1,83$ e $\bar{x} = 1,08$ ($p = 0,23$)	$\bar{x} = 1,92$ e $\bar{x} = 1,59$ ($p = 0,59$)

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

TABELA 8 – RESULTADOS DO TESTE U DE MANN-WHITNEY PARA AS COMPARAÇÕES DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINAÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA BChE NO RIM.

RIM	Ag+	NpAg
0,002mg/kg e 0,02mg/kg	$\bar{x} = 1,03$ e $\bar{x} = 0,93$ ($p = 0,93$)	$\bar{x} = 0,86$ e $\bar{x} = 1,00$ ($p = 0,56$)
0,002mg/kg e 0,2 mg/kg	$\bar{x} = 1,03$ e $\bar{x} = 0,89$ ($p = 0,81$)	$\bar{x} = 0,86$ e $\bar{x} = 0,98$ ($p = 0,45$)
0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg	$\bar{x} = 0,93$ e $\bar{x} = 0,89$ ($p = 0,88$)	$\bar{x} = 1,00$ e $\bar{x} = 0,98$ ($p = 0,81$)

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

Como é possível observar nos resultados, não houve diferença significativa entre as concentrações de contaminação em nenhum tecido. Desta maneira é possível agrupá-los para ter um grupo mais consistente para as análises. No tratamento subcrônico não houve concentrações de contaminação diferentes, por este motivo este teste não se adequaria para estes dados.

4.1.3 A atividade enzimática da BChE difere entre os tecidos de cérebro, fígado e rim no controle negativo?

Como o controle negativo foi tratado apenas com solvente, este é o grupo mais informativo com relação ao funcionamento da butirilcolinesterase neste estudo. Para ter uma amostra mais ampla dos controles, foi verificado se havia diferença entre o controle agudo e subcrônico através de teste U de Mann-Whitney, o resultado está na TABELA 9. Como não houve diferenças significativas entre os controles, eles foram agrupados e este grupo teve as atividades enzimáticas comparadas com os diferentes tecidos, buscando identificar atividades tecido-específicas. Para tanto, foi necessário verificar a normalidade da amostra dos controles através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Em todos os tecidos, a amostra referente aos controles demonstrou distribuição não paramétrica. Deste modo, a possível diferença significativa foi

obtida através de teste U de Mann-Whitney dois a dois entre os grupos controle de diferentes tecidos. Os resultados estão descritos na TABELA 10.

TABELA 9 – RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE ENTRE OS CONTROLES NEGATIVOS DOS TRATAMENTOS AGUDO E SUBCRÔNICO.

	Cn Agudo e Cn Subcrônico
CÉREBRO	$\bar{x} = 0,83$ e $\bar{x} = 0,73$ ($p = 0,85$)
FÍGADO	$\bar{x} = 0,89$ e $\bar{x} = 1,91$ ($p = 0,29$)
RIM	$\bar{x} = 0,78$ e $\bar{x} = 0,85$ ($p = 0,28$)

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Cn – controle negativo; \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

TABELA 10 – RESULTADO DAS COMPARAÇÕES DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE ENTRE OS CONTROLES DOS DIFERENTES TECIDOS NO TRATAMENTO AGUDO E SUBCRÔNICO.

	Resultado
Cn F x Cn C	$\bar{x} = 1,33$ e $\bar{x} = 0,79$ ($p = 0,02^*$)
Cn F x Cn R	$\bar{x} = 1,33$ e $\bar{x} = 0,81$ ($p = 0,09$)
Cn C x Cn R	$\bar{x} = 0,79$ e $\bar{x} = 0,81$ ($p = 0,55$)

Fonte: O autor, 2016.

Legenda: Cn F – controle negativo do fígado; Cn C – controle negativo do cérebro, Cn R – controle negativo do rim, \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo, * - resultado significativo.

Houve diferença significativa entre os controles negativos dos tecidos fígado e cérebro. Este resultado pode ser um reflexo da grande quantidade de butirilcolinesterase no fígado, onde é produzido (BOBERG, 2010), se comparado com o cérebro, o que explica sua maior média de atividade enzimática. Além disto, como é possível perceber na tabela, o p é muito perto do significativo entre os controles de fígado e rim, indicando que poderia haver uma diferença com um número amostral maior.

4.1.4 A atividade enzimática da BChE difere entre os sexos feminino e masculino no controle negativo?

Este teste busca encontrar diferenças significativas da atividade enzimática entre fêmeas e machos, é possível que a enzima se encontre mais

ou menos ativa em um dos sexos? Cada indivíduo foi categorizado de acordo com o sexo, 0 para fêmeas e 1 para machos. Foi utilizado o teste U de Mann-Whitney para comparar os grupos. Os resultados estão demonstrados na TABELA 11.

TABELA 11 – RESULTADO DE DIFERENÇAS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE NOS CONTROLES NEGATIVOS COM RELAÇÃO AO SEXO.

	Resultado
Cn F Feminino x Cn F Masculino	$\bar{x} = 1,39$ e $\bar{x} = 1,22$ ($p = 0,64$)
Cn C Feminino x Cn C Masculino	$\bar{x} = 0,71$ e $\bar{x} = 0,94$ ($p = 0,85$)
Cn R Feminino x Cn R Masculino	$\bar{x} = 0,76$ e $\bar{x} = 0,90$ ($p = 0,98$)

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Cn F corresponde ao controle negativo do fígado, Cn C corresponde ao controle negativo do cérebro, e Cn R corresponde ao controle negativo do rim, \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

Como demonstrado, não há diferenças significativas na atividade entre os sexos em todos os tecidos, a enzima se comporta similarmente, não importando o sexo do indivíduo. Isto permite a união dos controles negativos de ambos os sexos.

4.1.5 A atividade enzimática da BChE difere acima ou abaixo da mediana do peso nos controles negativos?

O peso é um fator importante no comportamento da butirilcolinesterase, como é demonstrado em diversos estudos, já que a enzima participa ativamente do metabolismo de lipídios. A atividade da BChE foi correlacionada positivamente com o peso em humanos (no plasma), ou seja, quanto maior o peso corporal, maior a atividade enzimática (FURTADO, 2005). O objetivo deste teste é saber se existem diferenças dependentes de peso na atividade enzimática da BChE em peixes desta espécie. De acordo com a mediana de peso obtida nos controles (=16,27 g), cada indivíduo foi categorizado com um número, 0 para peso abaixo da mediana e 1 para peso acima da mediana. Em seguida esta categoria foi utilizada para diferenciar os controles testados por teste U de Mann-Whitney. Os resultados encontram-se na TABELA 12.

TABELA 12 – RESULTADO DE DIFERENÇAS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE ACIMA E ABAIXO DA MEDIANA DO PESO NO GRUPO CONTROLE NEGATIVO.

	Resultado
Cn F Acima x Cn F Abaixo	$\bar{x} = 1,31$ e $\bar{x} = 1,35$ ($p = 0,61$)
Cn C Acima x Cn C Abaixo	$\bar{x} = 0,90$ e $\bar{x} = 0,68$ ($p = 0,63$)
Cn R Acima x Cn R Abaixo	$\bar{x} = 0,77$ e $\bar{x} = 0,85$ ($p = 0,96$)

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Cn F corresponde ao controle negativo do fígado, Cn C corresponde ao controle negativo do cérebro, e Cn R corresponde ao controle negativo do rim, \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

É possível observar que não houve diferença significativa entre a atividade enzimática de indivíduos com peso acima ou abaixo da mediana em nenhum tecido. Os indivíduos com maior peso corporal não apresentaram maior atividade enzimática, porém este fato não necessariamente descarta o padrão que ocorre em humanos. O comportamento da massa corporal nos peixes da amostra muito provavelmente não é idêntico aos humanos, apesar de muitos peixes terem um peso muito maior que a mediana do controle, não necessariamente ele se encontra em condição de sobrepeso. Deste modo, para esta análise, seria interessante saber se os peixes estavam certamente com um excesso de massa gorda acima da média, ou é apenas uma variação de peso natural da espécie e mais relacionada ao tamanho corporal dos indivíduos do que à quantidade de gordura. Deste modo, podemos agrupar os controles, já que não existem diferenças significativas com relação ao peso corporal.

4.2 CONTAMINAÇÕES

4.2.1 A atividade enzimática da BChE difere entre o controle negativo e as contaminações?

Este teste tem como objetivo perceber se houveram diferenças significativas na atividade enzimática entre os controles e as diferentes contaminações dentro do mesmo tecido, permitindo observar se as contaminações causaram danos à funcionalidade da BChE. Para isto, foi necessário verificar se as atividades enzimáticas dos grupos eram paramétricas ou não, para poder utilizar o teste estatístico que mais traria

informações pertinentes. Para testar a normalidade das amostras, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors nos grupos de contaminação por nanopartículas e o teste de Shapiro-Wilk (o teste de Shapiro-Wilk é mais recomendado para amostragem com $n < 30$) para os grupos de íons de prata, alumínio e chumbo.

Das 59 amostras de fígado do primeiro grupo amostral, 28 eram referentes a uma amostra de controle negativo inoculado com água destilada, 15 delas foram contaminadas com alumínio em concentração de 50 mg/kg e 16 delas com chumbo em concentração de 21 mg/kg. As atividades enzimáticas do grupo controle e o contaminado por alumínio possuem distribuição não paramétrica e o grupo contaminado por chumbo tem distribuição paramétrica. Deste modo, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney para observar se houve diferença significativa entre os controles e os contaminantes e nos contaminantes entre si.

As atividades enzimáticas do controle negativo ($\bar{x} = 0,62$ KU/L) não foram significativamente diferentes daquelas contaminadas por alumínio ($\bar{x} = 0,60$ KU/L; $p = 0,9087$) e da contaminação por chumbo ($\bar{x} = 0,50$ KU/L; $p = 0,0524$), apesar de este último contaminante demonstrar um valor muito próximo ao significativo se comparado ao controle. Com uma amostra maior, possivelmente esta análise seria significativa, sugerindo que a contaminação por chumbo pode causar uma anormalidade na atividade da BChE. Comparando as atividades enzimáticas dos dois contaminantes entre si, não houve diferença significativa ($p = 0,0855$), porém também existe uma tendência à significância, sugerindo que a contaminação por chumbo leva a um maior decréscimo na atividade da BChE como quando comparada ao controle negativo.

No segundo grupo amostral, com relação ao tratamento agudo, a atividade enzimática no fígado e no rim não foi paramétrica tanto na contaminação por Ag⁺ quanto por NpAg e no cérebro nas duas contaminações a atividade foi paramétrica.

Como os controles negativos possuem distribuição não paramétrica foi utilizado o teste U de Mann-Whitney para todos os testes. Os resultados encontram-se na TABELA 13.

TABELA 13 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE DIFERENÇA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE ENTRE CONTROLES NEGATIVOS E CONTAMINAÇÕES NO TRATAMENTO AGUDO E SUBCRÔNICO.

	Agudo	Subcrônico
Cn F x Ag +	$\bar{x} = 1,33$ e $\bar{x} = 1,42$ ($p = 0,79$)	$\bar{x} = 1,33$ e $\bar{x} = 1,54$ ($p = 0,18$)
Cn F x NpAg	$\bar{x} = 1,33$ e $\bar{x} = 1,45$ ($p = 0,89$)	$\bar{x} = 1,33$ e $\bar{x} = 1,94$ ($p = 0,67$)
Cn C x Ag +	$\bar{x} = 0,81$ e $\bar{x} = 0,67$ ($p = 0,77$)	$\bar{x} = 0,81$ e $\bar{x} = 0,69$ ($p = 0,57$)
Cn C x NpAg	$\bar{x} = 0,81$ e $\bar{x} = 0,66$ ($p = 0,67$)	$\bar{x} = 0,81$ e $\bar{x} = 0,79$ ($p = 0,93$)
Cn R x Ag +	$\bar{x} = 0,79$ e $\bar{x} = 0,95$ ($p = 0,79$)	$\bar{x} = 0,79$ e $\bar{x} = 0,87$ ($p = 0,58$)
Cn R x NpAg	$\bar{x} = 0,79$ e $\bar{x} = 0,95$ ($p = 0,34$)	$\bar{x} = 0,79$ e $\bar{x} = 0,89$ ($p = 0,36$)

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Cn F corresponde ao controle negativo do fígado, Cn C corresponde ao controle negativo do cérebro, e Cn R corresponde ao controle negativo do rim, \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

Não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre a atividade enzimática nos controles e as contaminações com íons de prata ou nanopartículas de prata nos tratamentos agudo e subcrônico. Desta maneira, provavelmente as concentrações das contaminações não foram suficientemente altas para causar dano à enzima, o número amostral foi muito pequeno para apresentar uma diferença significativa ou não existe interferência destes contaminantes na atividade da BChE.

4.2.2 A atividade enzimática da BChE difere entre os tecidos de cérebro, fígado e rim nos tratamentos?

Esta análise tem como objetivo saber se há diferença na atividade da BChE em diferentes tecidos dentro de uma mesma contaminação. Apesar de não ter havido diferenças significativas entre os controles e as contaminações e entre os controles apenas o fígado e o cérebro diferiram, os resultados desta análise podem demonstrar se existem particularidades tecido-específicas. Para aumentar a confiabilidade do teste, foi verificado se haveria a possibilidade de agrupar as contaminações Ag⁺ e NpAg por tecidos. Foram testadas as normalidades dos grupos por Kolmogorov-Smirnov para amostras acima de 30 indivíduos e por Shapiro-Wilk para as amostras com menos de 30 indivíduos (TABELA 12). Foi utilizado o teste U de Mann-Whitney, já que as amostras possuíam distribuição não paramétrica. Os resultados estão demonstrados nas TABELAS 14, 15 e 16.

TABELA 14 – RESULTADO DA ANÁLISE DE DIFERENÇA DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA BChE ENTRE OS TRATAMENTOS AGUDO E SUBCRÔNICO PARA CADA TECIDO DE ACORDO COM O CONTAMINANTE.

	Ag+	NpAg
F agudo x F subcrônico	$\bar{x} = 1,42$ e $\bar{x} = 1,54$ ($p = 0,29$)	$\bar{x} = 1,45$ e $\bar{x} = 1,94$ ($p = 0,81$)
C agudo x C subcrônico	$\bar{x} = 0,67$ e $\bar{x} = 0,62$ ($p = 0,44$)	$\bar{x} = 0,66$ e $\bar{x} = 0,69$ ($p = 0,79$)
R agudo x R subcrônico	$\bar{x} = 0,95$ e $\bar{x} = 0,87$ ($p = 0,63$)	$\bar{x} = 0,95$ e $\bar{x} = 0,89$ ($p = 0,71$)

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: F – corresponde ao tecido fígado, C – corresponde ao tecido cérebro, R – corresponde ao tecido rim, \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

TABELA 15 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE DIFERENÇA DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA BChE ENTRE OS TECIDOS NA CONTAMINAÇÃO POR AG+.

	Ag+
F x C	$\bar{x} = 1,46$ e $\bar{x} = 0,68$ ($p = 0,0003^*$)
F x R	$\bar{x} = 1,46$ e $\bar{x} = 0,92$ ($p = 0,0294^*$)
C x R	$\bar{x} = 0,68$ e $\bar{x} = 0,92$ ($p = 0,5004$)

Fonte: O autor, 2016.

Legenda: F corresponde ao fígado, C corresponde ao cérebro, R corresponde ao rim, * corresponde ao resultado significativo, \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

TABELA 16 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE DIFERENÇA DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA BChE ENTRE OS TECIDOS NA CONTAMINAÇÃO POR NpAg.

	NpAg
F x C	$\bar{x} = 1,57$ e $\bar{x} = 0,69$ ($p = 0,0000^*$)
F x R	$\bar{x} = 1,57$ e $\bar{x} = 0,93$ ($p = 0,2239$)
C x R	$\bar{x} = 0,69$ e $\bar{x} = 0,93$ ($p = 0,0035^*$)

Fonte: O autor, 2016.

Legenda: F corresponde ao fígado, C corresponde ao cérebro, R corresponde ao rim, * corresponde ao resultado significativo, \bar{x} - média de atividade enzimática do grupo.

De acordo com os resultados é possível observar que houve diferença significativa entre o fígado e cérebro e fígado e rim no tratamento com Ag+, a média de valores de atividade enzimática no fígado foi maior que nos outros dois tecidos. No tratamento por NpAg, a média de atividade enzimática foi significativamente menor no cérebro se comparado com o fígado ou o rim. Este resultado vai de acordo com o conhecimento de que a butirilcolinesterase

é produzida no fígado (BOBERG, 2010) e desta forma, a enzima tem maior atividade neste órgão. Também houve diferença significativa entre o cérebro e o rim no tratamento por NpAg, porém isto pode ser por conta de uma flutuação natural dos valores da população, já que este resultado não se repete em outros testes.

4.2.3 A frequência das formas moleculares difere entre o controle negativo e as contaminações?

A grande pergunta a se responder acerca das formas moleculares da butirilcolinesterase é se elas possuem a mesma frequência tanto nos controles negativos como nas contaminações. As bandas foram categorizadas de acordo com o fenótipo dos indivíduos: 1 – apenas o tetrâmero; 2 – tetrâmero e monômero; 3 – tetrâmero, dímero e monômero; 4 – tetrâmero, monômero ligado a albumina e monômero; 5 – tetrâmero, dímero, monômero ligado a albumina e monômero; 6 – tetrâmero e monômero ligado a albumina; 7 – tetrâmero e dímero; 8 – tetrâmero, dímero e monômero ligado a albumina. Para testar essa hipótese, foram comparadas as frequências das formas moleculares através do teste χ^2 com correção de Yates. Na comparação dos controles do fígado de diferentes tratamentos, o χ^2 foi 4,52 para 4 graus de liberdade ($p = 0,340183$). No cérebro, o χ^2 foi 3,18 para 6 graus de liberdade ($p = 0,78594$) e no rim o χ^2 foi 1,04 para 3 graus de liberdade ($p = 0,791574$). Os χ^2 tabelados para 4, 6 e 3 graus de liberdade com significância de 0,05 é de 9,48, 12,59 e 7,81, respectivamente. Como as frequências não foram significativamente distintas foi possível unir os controles negativos do tratamento agudo e subcrônico. Este teste também foi feito com as diferentes concentrações de contaminantes. As análises foram separadas por tecido.

4.2.3.1 Fígado

No primeiro grupo amostral, foram comparadas as frequências entre o controle negativo e a contaminação por alumínio e por chumbo. O teste utilizado foi o χ^2 de independência com correção de Yates. A hipótese nula é que as formas moleculares tem a mesma frequência entre o controle e os contaminantes e a hipótese alternativa é que há diferença nas frequências das formas moleculares. Na TABELAS 17 e 18 estão demonstrados os testes do

controle comparado à contaminação alumínio (Al) e chumbo (Pb), respectivamente.

TABELA 17 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO DO FÍGADO E O CONTAMINANTE Al.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	0	0,6512	0,0351	1	0,3488	0,0655	1
2	19	18,233	0,0039	9	9,7674	0,0073	28
3	3	0,6512	5,2494	2	0,3488	3,7988	1
4	1	5,2093	2,6412	1	2,7907	0,5969	8
5	5	4,5581	0,0007	2	2,4419	0,0014	7
Total	28		7,9304	15		4,47	43

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

TABELA 18 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO DO FÍGADO E O CONTAMINANTE Pb.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	0	0,6364	0,0292	1	0,3636	0,0511	1
2	19	18,455	0,0001	10	10,545	0,0002	29
3	3	0,6364	5,4578	0	0,3636	0,0511	1
4	1	5,0909	2,5329	5	2,9091	0,87	8
5	5	3,1818	0,5461	0	1,8182	0,9557	5
Total	28		8,5661	16		1,9282	44

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por alumínio, o χ^2 calculado foi 12,40 ($p = 0.014612$) e na comparação de controle e contaminação por chumbo foi 10,49 ($p = 0.032935$). O χ^2 tabelado para 4 graus de liberdade é de 9,49. Com isto, a hipótese nula é negada e podemos afirmar que há diferença significativa na frequência das formas moleculares entre o controle negativo e a contaminação por alumínio e por chumbo.

No segundo grupo amostral, os controles negativos dos tratamentos agudo e subcrônico foram agrupados. As frequências das concentrações de contaminante e o tratamento agudo e subcrônico não foram diferentes, permitindo o agrupamento. No fígado então, foi possível analisar se há

diferença na frequência entre o controle e a contaminação por íons de prata (TABELA 19) e o controle e a contaminação por nanopartículas de prata (TABELA 20).

TABELA 19 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO DO FÍGADO E O CONTAMINANTE Ag+.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	2	0,9211	0,3639	0	1,0789	0,3107	2
2	4	3,6842	0,0092	4	4,3158	0,0079	8
3	5	2,7632	1,0917	1	3,2368	0,932	6
4	2	2,3026	0,0169	3	2,6974	0,0144	5
5	22	25,329	0,316	33	29,671	0,2697	55
Total	35		1,7977	41		1,5346	76

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

TABELA 20 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO DO FÍGADO E O CONTAMINANTE NpAg.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	2	1,1413	0,1127	1	1,8587	0,0692	3
2	4	3,4239	0,0017	5	5,5761	0,001	9
3	5	3,0435	0,697	3	4,9565	0,428	8
4	2	4,5652	0,9343	10	7,4348	0,5737	12
5	22	22,826	0,0047	38	37,174	0,0029	60
Total	35		1,7504	57		1,0748	92

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por Ag+, o χ^2 calculado foi 3,33 ($p = 0.504193$) e na comparação de controle e contaminação por chumbo foi 2,82 ($p = 0.588385$). O χ^2 tabelado para 4 graus de liberdade é de 9,49. Com isto, a hipótese nula é aceita e podemos afirmar que não há diferença significativa na frequência das formas moleculares entre o controle negativo e a contaminação por Ag+ ou NpAg no fígado.

4.2.3.2 Cérebro

Os controles negativos dos tratamentos agudo e subcrônico foram agrupados. Foram testados se houveram diferenças entre as concentrações de

contaminante, afim de poder unir os grupos. Entre as concentrações 0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg houve diferença. Então foram agrupadas os indivíduos de concentração 0,002 mg/kg e 0,02 mg/kg (TABELA 21) e a concentração 0,2 mg/kg (TABELA 22) foi analisada separadamente.

TABELA 21 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO DO CÉREBRO E O CONTAMINANTE Ag+ EM CONCENTRAÇÃO DE 0,002 E 0,02 mg/kg.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	3	2,6415	0,0076	1	1,3585	0,0147	4
2	1	1,9811	0,1168	2	1,0189	0,2272	3
3	2	1,9811	0,1168	1	1,0189	0,2272	3
4	5	4,6226	0,0033	2	2,3774	0,0063	7
5	18	15,849	0,172	6	8,1509	0,3344	24
6	2	1,3208	0,0243	0	0,6792	0,0473	2
7	4	5,9434	0,3505	5	3,0566	0,6816	9
8	0	0,6604	0,0389	1	0,3396	0,0757	1
Total	35		0,4165	18		1,6145	53

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

TABELA 22 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO DO CÉREBRO E O CONTAMINANTE Ag+ EM CONCENTRAÇÃO DE 0,2 mg/kg.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	3	2,4419	0,0014	0	0,5581	0,0061	3
2	1	0,814	0,1211	0	0,186	0,5298	1
3	2	1,6279	0,01	0	0,3721	0,044	2
4	5	4,8837	0,0301	1	1,1163	0,1319	6
5	18	19,535	0,0548	6	4,4651	0,2399	24
6	2	1,6279	0,01	0	0,3721	0,044	2
7	4	4,0698	0,0455	1	0,9302	0,199	5
Total	35		0,2175	8		1,5388	43

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por Ag+ nas concentrações de 0,002 e 0,02 mg/kg, o χ^2 calculado foi 2,03 ($p = 0.958161$). O χ^2 tabelado para 7 graus de liberdade é de 14,06. Na comparação de controle e concentração 0,2 mg/kg foi 1,95 ($p = 0.924239$) e o χ^2 tabelado para 6 graus

de liberdade é de 12,59. Com isto, a hipótese nula é aceita e podemos afirmar que não há diferença significativa na frequência das formas moleculares entre o controle negativo e a contaminações em diferentes concentrações no cérebro contaminado com íons de prata.

Na contaminação por nanopartículas de prata, a mesma configuração para análise foi utilizada, pois também houve diferenças significativas nas formas moleculares entre as concentrações. As frequências do controle negativo foram comparadas as concentrações 0,002 mg/kg e 0,02 mg/kg agrupadas (TABELA 23) e a concentração 0,2 mg/kg (TABELA 24) foi analisada separadamente.

TABELA 23 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO DO CÉREBRO E O CONTAMINANTE NpAg EM CONCENTRAÇÃO DE 0,002 E 0,02

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	3	2,6923	0,0137	2	2,3077	0,016	5
2	1	3,7692	1,3662	6	3,2308	1,5939	7
3	2	2,6923	0,0137	3	2,3077	0,016	5
4	5	4,8462	0,0247	4	4,1538	0,0288	9
5	18	17,231	0,0042	14	14,769	0,0049	32
6	2	1,0769	0,1662	0	0,9231	0,1939	2
7	4	2,6923	0,2423	1	2,3077	0,2827	5
Total	35		1,4226	30		1,5388	65

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

TABELA 24 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO DO CÉREBRO E O CONTAMINANTE NpAg EM CONCENTRAÇÃO DE 0,2 mg/kg.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	3	4,2857	0,144	3	1,7143	0,3601	6
2	1	3,5714	1,2014	4	1,4286	3,0036	5
3	2	2,1429	0,0595	1	0,8571	0,1488	3
4	5	5	0,05	2	2	0,125	7
5	18	15	0,4167	3	6	1,0417	21
6	2	2,1429	0,0595	1	0,8571	0,1488	3
7	4	2,8571	0,1446	0	1,1429	0,3616	4
Total	35		1,8717	14		1,5388	49

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por NpAg nas concentrações de 0,002 e 0,02 mg/kg, o χ^2 calculado foi 2,96 ($p = 0.81385$) e na comparação de controle e concentração 0,2 mg/kg foi 3,41 ($p = 0.755903$). O χ^2 tabelado para 6 graus de liberdade é de 12,59. Com isto, a hipótese nula é aceita e podemos afirmar que não há diferença significativa na frequência das formas moleculares entre o controle negativo e a contaminações em diferentes concentrações no cérebro contaminado com nanopartículas de prata.

No tratamento subcrônico, as contaminações por íons de prata e por nanopartículas de prata não tiveram as frequências das formas moleculares diferentes. Deste modo, agruparam-se estas amostras para compará-la com o controle negativo. O resultado está na TABELA 25.

TABELA 25 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO DO CÉREBRO E OS CONTAMINANTES Ag⁺ e NpAg DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	3	6,6667	1,5042	9	5,3333	1,8802	12
2	1	1,1111	0,1361	1	0,8889	0,1701	2
3	2	1,6667	0,0167	1	1,3333	0,0208	3
4	5	5	0,05	4	4	0,0625	9
5	18	15	0,4167	9	12	0,5208	27
6	2	1,1111	0,1361	0	0,8889	0,1701	2
7	4	4,4444	0,0007	4	3,5556	0,0009	8
Total	35		2,1236	28		1,5388	63

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por Ag⁺ e NpAg do tratamento subcrônico do cérebro, o χ^2 calculado foi 3,66 ($p = 0.722575$). O χ^2 tabelado para 6 graus de liberdade é de 12,59. Com isto, a hipótese nula é aceita e podemos afirmar que não há diferença significativa na frequência das formas moleculares entre o controle negativo e o tratamento subcrônico no cérebro.

4.2.3.3 Rim

Os controles negativos dos tratamentos agudo e subcrônico foram agrupados. As frequências das concentrações de contaminante no tratamento agudo e subcrônico não foram diferentes, permitindo o agrupamento. No rim foi analisado se há diferença na frequência entre o controle e a contaminação por íons de prata (TABELA 26) e o controle e a contaminação por nanopartículas de prata (TABELA 27).

TABELA 26 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E O CONTAMINANTES Ag⁺ DO RIM.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	2	2,3026	0,0169	3	2,6974	0,0144	5
2	1	1,3816	0,0102	2	1,6184	0,0087	3
3	3	4,6053	0,2653	7	5,3947	0,2264	10
4	0	0,9211	0,1925	2	1,0789	0,1643	2
5	29	25,789	0,2849	27	30,211	0,2432	56
Total	35		0,7697	41		0,6571	76

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

TABELA 27 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS DAS FORMAS MOLECULARES DA BChE ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E OS CONTAMINANTES NpAg DO RIM.

FM	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
1	2	1,9022	0,085	3	3,0978	0,0522	5
2	1	2,2826	0,2683	5	3,7174	0,1648	6
3	3	3,0435	0,0685	5	4,9565	0,042	8
4	0	0,3804	0,0376	1	0,6196	0,0231	1
5	29	27,391	0,0449	43	44,609	0,0276	72
Total	35		0,5043	57		0,3096	92

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: FM – Forma molecular, Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por Ag⁺, o χ^2 calculado foi 1,42 ($p = 0.840712$) e na comparação de controle e contaminação por NpAg foi 0,81 ($p = 0.937102$). O χ^2 tabelado para 4 graus de liberdade é de 9,49. Com isto, a hipótese nula é aceita e podemos afirmar que não há diferença significativa na frequência das formas moleculares entre o controle negativo e a contaminação por Ag⁺ ou NpAg no rim.

4.2.4 A frequência do fenótipo C₅ difere entre o controle negativo e as contaminações?

As frequências dos fenótipos do loco CHE2 nos controles negativos e as contaminações foram testadas por meio de teste χ^2 de independência, a fim de encontrar diferenças significativas que possam ser causadas pelas contaminações. A hipótese nula é que as frequências se mantêm as mesmas nos controles e nas contaminações e a hipótese alternativa é que há diferenças nas frequências dos controles e das contaminações.

4.2.4.1 Fígado

Com os dados do primeiro grupo amostral, foram comparadas as frequências do fenótipo C₅ no controle negativo comparado ao grupo contaminado com Al (TABELA 28) e controle negativo comparado ao grupo contaminado com Pb (TABELA 29). Para este estudo, foi utilizada a correção de Yates.

TABELA 28 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS C5+ ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E O CONTAMINANTES Al DO FÍGADO.

	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
C5+	10	7	0,8929	1	4	1,5625	11
C5-	18	21	0,2976	15	12	0,5208	33
Total	28		1,1905	16		2,0833	44

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

TABELA 29 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS C5+ ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E O CONTAMINANTES Pb DO FÍGADO.

	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
C5+	10	8,2727	0,1821	3	4,727273	0,3186	13
C5-	18	19,727	0,0764	13	11,27273	0,1336	31
Total	28		0,2584	16		0,4522	44

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por Al, o χ^2 calculado foi 3,27 ($p = 0.070558$) e na comparação de controle e contaminação

por Pb foi 0,7106 ($p = 0.399245$). O χ^2 tabelado para 1 grau de liberdade é de 3,84. Com isto, a hipótese nula é aceita e podemos afirmar que não há diferença significativa na frequência do fenótipo C₅ entre o controle negativo e a contaminação por Al ou Pb no fígado.

Para o segundo grupo amostral, os controles negativos do tratamento agudo e subcrônico foram agrupados, assim como as diferentes concentrações do contaminante. Na TABELAS 30 e 31 encontram-se os resultados dos testes do controle comparado ao contaminante Ag⁺ e o o controle comparado ao contaminante NpAg, respectivamente.

TABELA 30 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS C5+ ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E O CONTAMINANTES Ag⁺ DO FÍGADO.

	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
C5+	18	15,197	0,5168	15	17,80263	0,4412	33
C5-	17	19,803	0,3967	26	23,19737	0,3386	43
Total	35		0,9135	41		0,7798	76

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

TABELA 31 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS C5+ ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E O CONTAMINANTES NpAg DO FÍGADO.

	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
C5+	18	19,022	0,0549	32	30,97826	0,0337	50
C5-	17	15,978	0,0653	25	26,02174	0,0401	42
Total	35		0,1202	57		0,0738	92

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por Ag⁺, o χ^2 calculado foi 1,6233 ($p = 0.202632$) e na comparação de controle e contaminação por NpAg foi 0,19 ($p = 0.662917$). O χ^2 tabelado para 1 grau de liberdade é de 3,84. Com isto, a hipótese nula é aceita e podemos afirmar que não há diferença significativa na frequência do fenótipo C₅ entre o controle negativo e a contaminação por Ag⁺ ou NpAg no fígado.

4.2.4.2 Cérebro

Os controles negativos do tratamento agudo e subcrônico foram agrupados, assim como as diferentes concentrações do contaminante. Na TABELAS 32 e 33 estão dispostos os resultados dos testes do controle comparado ao contaminante Ag+ e o controle comparado ao contaminante NpAg, respectivamente.

TABELA 32 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS C5+ ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E O CONTAMINANTES Ag+ DO CÉREBRO.

	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
C5+	10	16,579	2,6107	26	19,42105	2,2286	36
C5-	25	18,421	2,3496	15	21,57895	2,0058	40
Total	35		4,9603	41		4,2344	76

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

TABELA 33 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS C5+ ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E O CONTAMINANTES NpAg DO CÉREBRO.

	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
C5+	10	20,163	5,1226	43	32,83696	3,1455	53
C5-	25	14,837	6,9615	14	24,16304	4,2746	39
Total	35		12,084	57		7,4201	92

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por Ag+, o χ^2 calculado foi 9,19 ($p = 0.002433$) e na comparação de controle e contaminação por NpAg foi 19,50 ($p = 0.00001$). O χ^2 tabelado para 1 grau de liberdade é de 3,84. Com isto, a hipótese nula é rejeitada e a hipótese alternativa é aceita. Há diferença significativa na frequência do fenótipo C₅ + entre o controle negativo e a contaminação por Ag+ e NpAg no cérebro.

4.2.4.3 Rim

Os controles negativos do tratamento agudo e subcrônico foram agrupados, assim como as diferentes concentrações do contaminante. Na TABELAS 34 e 35 encontram-se os resultados dos testes do controle

comparado ao contaminante Ag+ e o o controle comparado ao contaminante NpAg, respectivamente.

TABELA 34 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS C5+ ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E O CONTAMINANTES Ag+ DO RIM.

	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
C5+	16	14,737	0,1083	16	17,26316	0,0924	32
C5-	19	20,263	0,0787	25	23,73684	0,0672	44
Total	35		0,187	41		0,1596	76

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

TABELA 35 – TABELA χ^2 DE INDEPENDÊNCIA COMPARANDO AS FREQUÊNCIAS C5+ ENTRE O CONTROLE NEGATIVO E O CONTAMINANTES NpAg DO RIM.

	Obs Cn	Esp.	χ^2	Obs Cont.	Esp.	χ^2	Total
C5+	16	17,12	0,0732	29	27,88043	0,045	45
C5-	19	17,88	0,0701	28	29,11957	0,043	47
Total	35		0,1433	57		0,088	92

FONTE: O autor, 2016.

Legenda: Obs Cn – observado no controle negativo, Obs Cont. – observado contaminante, Esp. – esperado.

Na comparação de frequência do controle e contaminação por Ag+, o χ^2 calculado foi 0,34 ($p = 0.559829$) e na comparação de controle e contaminação por NpAg foi 0,23 ($p = 0.631524$). O χ^2 tabelado para 1 grau de liberdade é de 3,84. Com isto, a hipótese nula é aceita e podemos afirmar que não há diferença significativa na frequência do fenótipo C₅ entre o controle negativo e a contaminação por Ag+ ou NpAg no rim.

5. CONCLUSÕES

As conclusões gerais deste estudo incluem a apresentação de duas novas formas moleculares em géis para a identificação de bandas da butirilcolinesterase em peixes da espécie *Hoplias intermedius*. Ainda são necessários estudos para a confirmação que estas bandas são produzidas por proteínas relacionadas à BChE.

No primeiro grupo amostral, as contaminações por alumínio e por chumbo não influenciaram a atividade enzimática da butirilcolinesterase. Foram encontradas diferenças significativas nas formas moleculares da BChE tanto na contaminação por alumínio quanto por chumbo, se comparado ao controle negativo. Não é possível garantir que esta diferença seja causada pela contaminação. Com relação ao fenótipo C₅ não houve diferença significativa entre o controle e as contaminações.

No segundo grupo amostral, nos resultados de caracterização, não houve diferença significativa entre as atividades enzimáticas no sexo feminino e masculino. Também não entre indivíduos que estejam acima ou abaixo da mediana de peso, porém os peixes que estavam acima da mediana não necessariamente estavam em sobrepeso, talvez por este motivo a atividade da butirilcolinesterase não foi afetada. Foi encontrada diferença significativa na atividade enzimática entre o fígado e o cérebro nos controles negativos, um reflexo da maior quantidade da enzima no fígado, onde ela é produzida. O fenótipo C₅ e a banda T2 apresentaram maior frequência no fígado que em outros tecidos. Nos resultados de contaminação, os controles negativos não diferiram significativamente dos contaminantes no tratamento agudo e subcrônico, indicando que a contaminação pode não ter afetado o funcionamento da enzima. Houve diferença significativa na atividade enzimática do fígado se comparado ao cérebro ou ao rim, novamente refletindo em uma maior concentração da BChE no órgão produtor. Não houve diferenças significativas entre os controles negativos e as contaminações no fenótipo C₅, com exceção do cérebro, onde há diferença entre o controle e ambos os tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ARORA S.; JAIN J.; RAJWADE J.M. e PAKNIKAR K.M. **Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies.** Toxicol Lett., v. 179(2), p. 93-100, 2008.
- ASHARANI, P.V.; MUN, G.L.K.; HANDE, M.P. e VALIYAVEETIL, S. **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells.** ACS Nano, v. 3(2), p. 279-90, 2009.
- BAHAR, F. G.; OHURA, K.; OGIHARA, E. e IMAI, T.. **Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 101, n. 10, p. 3979-3988, 2012.
- BERGMEYER, V. T. **Methods of enzymatic analysis.** 2nd ed. New York, Academic Press, 1974. v. 1, p. 831-54.
- BINEY, C.; AMUZU, A.T.; CALAMARI, D.; KABA, N.; MBOME, I.L.; NAEVE, H.; OCHUMBA, P.B.O.; OSIBANJO, O.; RADEGONDE, V. e SAAD, M.A.H. **Review of heavy metals in the african aquatic environment.** Ecotoxicol. Environ. Saf., 28: 134-159, 1994.
- BOBERG, D.R.; FURTADO-ALLE, L.; SOUZA, R.L.R. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity.** Genet. Mol. Biol. Vol.33 no.3 São Paulo 2010; Epub jul. 2010.
- CESTARI, M.M.; LEMOS, P.M.M.; RIBEIRO, C.A. de O.; COSTA, J.R.M.A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M.V.M.; MANTOVANI, M.S. e FENOCCHIO, A.S. **Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations.** Genetics and Molecular Biology, v. 27(2), p. 270-274, 2004.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M.A.C. e VIEIRA, M.M. **The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight.** Hum. Hered., v. 41, p. 330-339, 1991.
- COMPANY R.; SERAFIM A.; COSSON R.; CAMUS L.; SHILLITO B.; FIALA-MÉDIONI A. e BEBIANNO M.J. **The effect of cadmium on phosphatase and cholinesterase and the susceptibility in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*.** Marine Biology 148: 817-825, 2006.
- DANTAS, V.G.L.; FURTADO-ALLE, L.; SOUZA, R.L.R e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Obesity and variants of the GHRL (ghrelin) and BCHE (butyrylcholinesterase) genes.** Genet. Mol. Biol. 2011 Abr-Jun; 34(2): 205-207, 2011.
- ENSEMBL. **Gene: BCHE.** Disponível em: <
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000114200;r=3:165772904-165837472>. Acesso em 12 out. 2016.

- FARREL, A.P.; JOSEPH, C.J.; RICHARDS, J.G. e STEVENS, E.D. **Encyclopedia of fish physiology from genome to environment**. Elsevier, 3, 2061-83, 2011.
- FOLDBJERG R.; DANG D.A. e AUTRUP H. **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549**. Arch. Toxicol., v. 85(7), p. 743-50, 2011.
- FRANCHI, J.G. **A utilização de turfa como adsorvente de metais pesados. O exemplo da contaminação da Bacia do Rio Ribeira de Iguape por chumbo e metais associados**. Tese (Doutorado em Geoquímica e Geotectônica). Instituto de Geociência, São Paulo, 2004.
- FUKAMI, T. e YOKOI, T. **The emerging role of human esterases**. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, v. 27, n. 5, p. 466-477, 2012.
- FURTADO, L. **Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade**. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- GENECARDS, Human Gene Database. **BCHE Gene**. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCHE>> . Acesso em 12 out. 2016.
- GENETICS HOME REFERENCE, Your Guide to Understanding Genetic Conditions. **BCHE gene**. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCHE#conditions>>. Acesso em 12 out. 2016.
- GOODMAN, L. S. e GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 4a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973.
- GOULART, M. B. **Influência de fatores abióticos e caracterização do comportamento reprodutivo do trairão (*Hoplias intermedius*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. e ROBSON, E.B. **Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum**. Nature, v.196, p. 1296-98m 1962.
- IUBMB Enzyme Nomenclature. Iniciativa: School of Biological and Chemical Sciences. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em 26 dez. 2015.
- KIM S.; CHOI J.E.; CHOI J.; CHUNG K.H.; PARK K.; YI J. e RYU D.Y. **Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells**. Toxicol. In Vitro, v. 23(6), p. 1076-84, 2009.
- KUTTY, K. M. **Review: Biological function of cholinesterase**. Clin. Biochem., v. 13, n. 6, p. 239-243, 1980.

KUTTY, K. M.; HUANG, S. N. e KEAN, K. T. **Pseudocholinesterase in obesity: Hypercaloric diet induced changes in experimental obese mice.** *Experientia*, v. 37, p. 1441-1442, 1981.

LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S. e LA DU, B.N. **Location os disulfid bonds within the sequence of human serum cholinesterase.** *J. Biol. Chem.*,v. 262 (27), p. 12945-52, 1978.

LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W. e LA DU, B.N. **Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase.***J. Biol. Chem.*, v.254, p.8324-30, 1979.

LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. **Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase.** *J. Biol. Chem.*,v. 257, p. 12012-18, 1982.

LUCHIARI, A.C. **Fisiologia Humana e Animal Comparada.** Ciências Biológicas – Cadernos CB Virtual 5. Universidade Federal da Paraíba, p. 9-14, 2010.

LUNKES, G.I.; STEFANEL, F.; LUNKES, D.S; MORSH, V.M.; SCHETINGER, M.R. e GONÇALVES, J.F. **Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies.***Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 72, n. 1, p. 28-32, 2006.

NAYAK, P. **Aluminum: Impacts and disease.** *Environ. Res.*v. 89, 101-15, 2002.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **Gene.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>>. Acesso em 26 dez. 2015.

OBERDÖRSTER G.; MAYNARD A.; DONALDSON K.; CASTRANOVA V.; FITZPATRICK J.; AUSMAN K.; CARTER J.; KARN B.; KREYLING W.; LAI D.; OLIN S.; MONTEIRO-RIVIERE N.; WARHEIT D. e YANG H. **Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy.***Part. Fibre.Toxicol.*, v. 6, p. 2-8. 2005.

ORESKOVIC, K. e KUNEC-VAJIC, E. **Pseudocholinesterase in alloxan-diabetic rats.***Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, v.78, p.117-120, 1992.

OYAKAWA, O. T. **Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo *lacerae*) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei, Erythrinidae).** Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

OYAKAWA, O. T. e MATTOX, G. M. T. **Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species.***Neotropical Ichthyology*, Porto Alegre, v. 7. n. 2, p. 117-140, 2009.

POLÉO, A.B.S.; OXVENAD, S.A., OSTBYE, K.; ANDERSEN, R.A., OUGHTON, D.H. e VSLLESTAD, L.A. **Survival of crucian carp, *Carassius carassius*, exposed to a high low molecular weight inorganic aluminium challenge.** Aquat. Toxicol. v. 45, 78-90, 1995.

POPOVIC, L.; ORESKOVIC, K.; ZUPANCIC, B.; PETRUNIC, M. e KUNEC-VAJIK, E. **The relation between plasma lipid levels and pseudocholinesterase activity in hypothyroidism.** Metab. Res., v. 3, p. 137-140, 1998.

QUINA, F.H. **Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos.** Quim. Nova, vol. 27, no. 6, 1028-29, 2004.

ROY, C.; GROLLEAU, G. CHAMOULARD, S. e RIVIÈRE, J.L. **Plasma B-esterase activities in European raptors.** Journal of Wildlife Diseases, v. 41, n. 1, p. 184-208, 2005.

RUDAKOVA, E. V; BOLTNEVA, N. P. e MAKHAEVA, G. F. **Comparative analysis of esterase activities of human, mouse, and rat blood.** Bulletin of Experimental Biology and Medicine, v. 152, n. 1, p. 73-75, 2011.

SABINO, I.D.M. **Novos inibidores de AChE com propriedades antioxidantes como potenciais anti-neurodegenerativos: design, síntese, avaliação físico-química e biológica.** 79f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

SEATON, A.; MACNEE, W.; DONALDSON, K.; GODDEN, D. **Particulate air pollution and acute health effects.** The Lancet, v.345, p. 177, 1995.

SILVA, C.da; OBA, E.T.; RAMSDORF, W.A.; MAGALHÃES, V.F.; CESTARI, M.M. RIBEIRO, C.A.O e ASSIS, H.C.S.de. **First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure.** Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, v.57, n.1, p.141-147, 2011.

SIQUEIRA, M.E.P.B de; FERNÍCOLA, N.A.G.G. e BORGES, E.L. **Determinação de Níveis Normais de Colinesterase Plasmática e Eritrocitária.** Rev. Saúde Públ., São Paulo, v. 12, p. 340-4, 1978.

SOLOMONS, T.W.G. e FRYHLE, C.B. **Química Orgânica 1.** Sétima Edição. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001.

SOUZA, T.A.J. de, **Efeito do tamanho das nanopartículas de prata na indução de danos citotóxicos e genotóxicos nas linhagens celulares CHO-K1 e CHO-XRS5.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2013.

SUGIMORI, T. **Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isoenzyme.** Canad. Anaesth. Soc. J., v.33, p 321-27, 1986.

SUNSHINE, I. **Manual of analytical toxicology**. Cleveland, CRC Press, 1975. p. 107-8.

TVARIJONAVICIUTE, A; CERON, J. J. e CALDIN, M. **Serum butyrylcholinesterase activity in dogs with diabetes mellitus**. The Veterinary Journal, v. 192, n. 3, p. 494-497, 2012.

TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J. J. e TECLES, F. **Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in obese Beagle dogs before and after weight loss**. Veterinary Clinical Pathology, v. 42, n. 2, p. 207-211, 2013.

WHITTAKER, M. **Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist**. Anaesthesia, v.35, p. 174-197, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION REPORT - **Childhood Obesity, a set of tools for member states to determine and identify priority areas for action**. Geneva, 2012.

XIE, H.Q.; LIANG, D.; LEUNG, K.W.; CHEN, V.P.; ZHU, K.Y.; CHAN, W.K.B.; CHOI, R.C.Y.; MASSOULIE, J. e TSIM, K.W.K. **Targeting acetylcholinesterase to membrane rafts: a function mediated by the proline-rich membrane anchor (PRiMA) in neurons**. J. Biol. Chem. 285: 11537-11546, 2010.