

LILIAN NICARETA

**BIOMARCADORES PARA A DETECÇÃO DE EFEITOS SUBLETAIS
CAUSADOS PELA DELTAMETRINA EM *Ancistrus multispinnis***

**Dissertação apresentada como requisito
à obtenção do grau de Mestre, pelo
Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia, do Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Paraná.**

**Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Helena C. da
Silva de Assis**

CURITIBA

2004

Nicareta, Lilian
Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela
deltametrina em *Ancistrus multispinnis* / Lilian Nicareta. –
Curitiba, 2004.
xii, 74 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena C. da Silva de Assis

1.Biomarcadores 2.Deltametrina. 3.Peixes. I.Título.

AGRADECIMENTOS

Agradecer neste momento, é a atitude mais justa! Os agradecimentos seriam inúmeros, mas acima de tudo agradeço a Deus e a minha família amada.

Agradeço pela paciência, compreensão e pela orientação em todos os momentos dedicados a mim por minha orientadora, ensinando-me a desvendar a ciência como missão.

Não poderia esquecer de retribuir, com este simples agradecimento, a amizade que todos do departamento expressaram por mim.

Também não poderia esquecer cada eppendorf lavado pela Nair e pela Linda. Obrigada! Muito menos dos minutos que nossa farmacêutica Sílvia sempre reservava para uma dúvida ou uma conversa amiga.

Agradeço a professora Marisa, da Universidade Federal de São Carlos, por me acolher e disponibilizar material técnico para a realização da ATPase.

Agradeço aos professores Vera e Jaime Cunha Bastos da UERJ, pela atenção e carinho durante visita à Universidade.

Agradeço ao Congresso de Ecotoxicologia, em Vitória, porque foi onde tudo começou.

“A coisa mais bela que podemos desvendar é o mistério. Ele é a fonte de toda a arte e ciência verdadeira. Para quem esta emoção é estranha e para quem não pode parar para se questionar ou se maravilhar, está como uma pessoa morta: seus olhos estão fechados.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	02
1.1 PIRETRÓIDES	04
1.1.1 Deltametrina	06
1.2 BIOMARCADORES	09
1.2.1 Citocromo P450 (CYP450)	11
1.2.1.1 Organização e função	12
1.2.1.2 Mecanismo de reação	14
1.2.1.3 A super família P450	15
1.2.1.4 Indução do citocromo P450 por xenobióticos em peixes	16
1.2.1.5 Avaliação da atividade catalítica	17
1.2.2 Na ⁺ K ⁺ -ATPase	19
1.2.3 Colinesterase (ChE)	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	28
3.2 ACLIMATAÇÃO	28
3.3 SUBSTÂNCIA EXPERIMENTAL	28
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL	28
3.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	30
3.5.1 Fígado	30
3.5.2 Brânquias, Coração, Esôfago e Cérebro	31
3.5.3 Músculo Esquelético	33
3.6 ANÁLISES ENZIMÁTICAS	33
3.6.1 Medida do Citocromo P450 Total	33

3.6.1.1	Cálculo do citocromo P450 total	34
3.6.2	Medida da Atividade da EROD.....	35
3.6.2.1	Preparo da solução de resorufina.....	35
3.6.2.2	Preparo da solução de 7-etoxiresorufina (7 ER).....	36
3.6.2.3	Ensaio da atividade da EROD	36
3.6.2.4	Cálculo da atividade da EROD.....	37
3.6.3	Medida da Atividade da Na ⁺ K ⁺ -ATPase	38
3.6.3.1	Cálculo da atividade	39
3.6.4	Medida da Atividade da ChE	39
3.6.4.1	Cálculo da atividade da ChE	40
3.7	ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA.....	41
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4	RESULTADOS	43
4.1	CITOCROMO P450 TOTAL.....	43
4.2	ATIVIDADE DA EROD.....	43
4.3	ATIVIDADE DA Na ⁺ K ⁺ -ATPase.....	45
4.4	ATIVIDADE DA COLINESTERASE	47
5	DISCUSSÃO	51
5.1	EFEITOS DA DELTAMETRINA NO CITOCROMO P450	51
5.2	EFEITOS DA DELTAMETRINA NA ATIVIDADE DA Na ⁺ K ⁺ -ATPase.....	56
5.3	EFEITOS DA DELTAMETRINA NA ATIVIDADE DA ChE.....	57
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS PIRETRÓIDES.....	05
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DA DELTAMETRINA	06
FIGURA 3 - MOLÉCULA QUÍMICA DO CYP450	13
FIGURA 4 - HIPÓTESE DO MECANISMO DA INDUÇÃO DO CITOCROMO P450 1A (CYP1A), COMUMENTE REFERIDO COMO A TEORIA DO RECEPTOR-AH	17
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS DA ALKOXIRESORUFINA	18
FIGURA 6 - REAÇÃO QUÍMICA DA EROD	19
FIGURA 7 - TRANSFERÊNCIA DOS SOLUTOS ATRAVÉS DO EPITÉLIO.....	20
FIGURA 8 - GRUPOS DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO	29
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ARCO E DOS FILAMENTOS BRANQUIAIS.....	32
FIGURA 10 - QUANTIDADE DO CITOCROMO P450 TOTAL	43
FIGURA 11 - ATIVIDADE DA EROD NA FRAÇÃO S ₉ E NA FRAÇÃO MICROSSOMAL	44
FIGURA 12 - CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE DA EROD NA FRAÇÃO S ₉ E MICROSOMAL.....	44
FIGURA 13 - ATIVIDADE DA Na ⁺ K ⁺ ATPase NO ESÔFAGO DE <i>Ancistrus multispinnis</i>	45
FIGURA 14 - ATIVIDADE DA Na ⁺ K ⁺ ATPase NO CORAÇÃO DE <i>Ancistrus multispinnis</i>	46
FIGURA 15 - ATIVIDADE DA Na ⁺ K ⁺ ATPase NAS BRÂNQUIAS DE <i>Ancistrus multispinnis</i>	46
FIGURA 16 - ATIVIDADE DA Na ⁺ K ⁺ ATPase NO CÉREBRO DE <i>Ancistrus multispinnis</i>	47

FIGURA 17 - ATIVIDADE DA COLINESTERASE	47
FIGURA 18 - CORRELAÇÃO ENTRE O PESO CORPORAL (g) E A ATIVIDADE DA ChE DE MÚSCULO ESQUELÉTICO EM <i>Ancistrus multispinnis</i>	48
FIGURA 19 - CORRELAÇÃO ENTRE O COMPRIMENTO CORPORAL (cm) E A ATIVIDADE DA ChE DE MÚSCULO ESQUELÉTICO	48
FIGURA 20- ATIVIDADE COLINESTERÁSICA EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DA ESPÉCIE <i>Ancistrus multispinnis</i> DE ACORDO COM O SEXO	49

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	– Por cento
ϵ	– Coeficiente de extinção molar
3MC	– 3 metilcolantreno
7 ER	– 7-Etoxiresorufina
Ach	– Acetilcolina
AchE	– Acetilcolinesterase
AcSCh	– Acetiltiocolina
Ah	– <i>Aryl hydrocarbon</i>
ARNT	– <i>Aryl hydrocarbon nuclear transferase</i>
ATC	– Ácido tricloroacético
ATP	– Adenosina trifosfato
BchE	– Butirilcolinesterase
BuSCh	– Butirilcolina
ChE	– Colinesterase
CO	– Monóxido de carbono
CYP1A	– Citocromo P450 1A
DTNB	– 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato
EPA	– <i>Environmental Protection Agency</i>
EROD	– Etoxiresorufina-O-desetilase
GABA	– Ácido gama amino butírico
Hsps	– Proteínas de choque térmico
ICES	– <i>International Council for Exploration of the Sea</i>
MFO	– Oxigenases de função mista
NADH	– Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADPH	– Nicotinamida Adenina Fosfato Dinucleotídeo Reduzida
OD	– Densidade óptica
OMS	– Organização Mundial de Saúde
OP	– Organofosforado

PAHs	– Hidrocarbonetos policíclicos
PCBs	– Bifenilas policloradas
pH	– Potencial hidrogeniônico
Pi	– Fosfato inorgânico
PKA	– Proteína quinase A
PM	– Peso molecular
ppm	– Partes por milhão
q.s.p.	– Quantidade suficiente para
r^2	– Coeficiente de correlação
SNC	– Sistema Nervoso Central
TCDD	– 3,4,7,8-tetraclorodibenzodioxina
US-EPA	– Agência de Proteção Ambiental – Estados Unidos
v/v	– Volume por volume
x g	– Unidade de centrifugação
XRE	– Elemento regulatório para xenobiótico

RESUMO

A padronização de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais em *Ancistrus multispinnis* (“cascudos”) expostos ou não a deltametrina, em condições laboratoriais, facilita o biomonitoramento de espécies nativas capturadas de seu hábitat natural, principalmente quando da interferência antrópica no ecossistema. A deltametrina, um inseticida piretróide tipo II, é muito utilizada em culturas agrícolas, na medicina veterinária contra ectoparasitas e na saúde pública contra vetores por garantir baixa toxicidade ao homem e outros mamíferos. Porém, para espécies não-alvos como os organismos aquáticos, principalmente os peixes, a deltametrina é extremamente tóxica, prejudicando, portanto, o desenvolvimento e o estado vital destas espécies. O objetivo deste estudo é determinar os efeitos de doses subletais da deltametrina, em biomarcadores bioquímicos como os níveis de citocromo P450 total (CYP450), a atividade da enzima EROD (etoxiresorufina – *O* – desetilase), a atividade da ATPase, na forma $\text{Na}^+ \text{K}^+$ - ATPase e a atividade da colinesterase (ChE). Os peixes receberam doses subletais de 3 e 4 mg.kg^{-1} de deltametrina via intracelomática, dissolvida em óleo de milho. Após 96 horas de exposição, os animais foram sacrificados e os órgãos (fígado, brânquias, coração, cérebro e músculo) coletados para as análises dos biomarcadores. A atividade da ChE não foi inibida pela deltametrina nas condições laboratoriais estudadas. Entretanto, a deltametrina inibiu a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase das brânquias, coração e esôfago e induziu a quantidade total do CYP450, bem como a atividade da EROD. Portanto, a deltametrina alterou o equilíbrio das funções bioquímicas da espécie estudada, demonstrando que os biomarcadores são capazes de detectar efeitos subletais. O impacto da deltametrina causado nestes biomarcadores aumenta a importância ecotoxicológica deste inseticida, principalmente pela elevada toxicidade aos peixes.

ABSTRACT

The standardization of biomarkers for the detection of sublethal effects in *Ancistrus multispinnis* ("cascudos") exposed or not to deltamethrin, in laboratorial conditions, facilitates the biomonitoring of the native species captured from their natural habitat, mainly when anthropic interferences in the ecosystem happens. Deltamethrin, a pyrethroid insecticide type II, is commonly used in agricultural cultures, in veterinary medicine against ectoparasite and in public health against vectors due to it is low toxicity to man and other mammals. However, to not-target species such as aquatic organisms, mainly fishes, deltamethrin is extremely toxic, therefore, harmful to the development and the vital state of these species. The main goal of this study was to determine the effect of sublethal doses of deltamethrin, using biochemical biomarkers such as the activity of cholinesterase (ChE), the total levels of cytochrome P450 (CYP450), the activity of the enzyme EROD (7-ethoxyresorufin *O*-deethylase) and the activity of the ATPase, in the form Na^+K^+ -ATPase. The fishes received sublethal doses of 3 and 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of deltamethrin via intracelomatic. After 96 hours of exposure, the animals were sacrificed and the organs (liver, gills, heart, brain and muscle) collected for further enzymatic analyses. The activity of the ChE was not inhibited by deltamethrin in the studied laboratorial conditions. Nevertheless, deltamethrin inhibited the activity of the Na^+K^+ -ATPase of the gills, heart and esophagus and induced the total amount of the CYP450, as well as the activity of EROD. Therefore, deltamethrin alters the balance of the biochemical functions of the studied species, demonstrating that the biomarkers are capable to detect sublethal effects. The impact of deltamethrin caused in these biomarkers increases the ecotoxicologic importance of this insecticide, mainly for the high toxicity to the fishes.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução humana, o homem desenvolveu suas aptidões para transformar e criar instrumentos e produtos para a sobrevivência, produzindo e construindo nas mais diversas áreas do conhecimento humano, para melhorar a qualidade de vida.

Houve o desenvolvimento das indústrias, do comércio, da ciência e com o crescimento da população, uma demanda muito maior de produtos agrícolas foi então necessária. Para aumentar e qualificar a produção, o homem evoluiu suas técnicas de plantio, aprimorando seus equipamentos, desenvolvendo agrotóxicos e recentemente modificando geneticamente os produtos biológicos. Embora seja indispensável o desenvolvimento, danos foram e continuam sendo causados ao meio ambiente, em decorrência da falta de conhecimento, planejamento e até mesma despreocupação com as conseqüências futuras.

Dentre algumas conseqüências, podemos exemplificar o uso indevido de alguns pesticidas organoclorados (a maioria com uso proibido), altamente tóxicos e de alta persistência no ambiente os quais contaminaram fontes de água próximas aos locais de aplicação, além de terem causado toxicidade ou morte às espécies residentes (RAND; WELLS; McCARTY, 1995). Após anos de utilização e constatação tardia dos efeitos deletérios, houve a necessidade de desenvolver pesticidas com menor toxicidade e persistência no ambiente, conservando as características eficazes para o combate de pragas, não somente agrícolas, mas também domésticas, veterinárias e de saúde pública.

Setenta por cento da superfície terrestre e mais de noventa por cento da biosfera é composta por água. O equilíbrio deste ecossistema está diariamente correndo risco de ser abalado por contaminantes químicos.

É crescente a preocupação em avaliar os riscos que as substâncias químicas podem causar ao homem e ao ecossistema, principalmente porque novos compostos

químicos sintéticos são constantemente utilizados na indústria e agricultura, e milhões de toneladas destes produtos químicos são liberados de maneira intencional ou não no meio ambiente. Se não são diretamente lançados para o ambiente aquático, processos hidrológicos e atmosféricos eventualmente distribuem estes componentes químicos, depositando-os nos sistemas aquáticos.

Estes compostos tóxicos naturais ou antropogênicos são chamados de xenobióticos, e a ciência busca entender sua interação com a vida aquática. Dentro deste contexto, surgiu a ecotoxicologia, ciência que identifica e avalia os efeitos causados pela presença de xenobióticos no ecossistema. A partir dos resultados de pesquisa nesta área passou-se a indicar se a concentração de um determinado poluente seria capaz de exercer ou não efeitos deletérios sobre uma comunidade específica (HUGGETT et al., 1992).

Já a toxicologia aquática é responsável pelo estudo quantitativo e qualitativo de processos bioquímicos e fisiológicos em organismos aquáticos expostos a xenobióticos. Esta área da ciência inclui, também, o estudo de transporte, distribuição e a formação de substâncias químicas no meio aquático (GOKSØYR; FÖRLIN, 1992).

Vários esforços são investidos para desvendar os mecanismos de ação dos compostos químicos (drogas, poluentes, carcinógenos, etc.) em modelos animais como ratos e camundongos. O objetivo principal da pesquisa comparativa é detectar, controlar e se possível, intervir na exposição química e nos efeitos sobre os humanos. Em toxicologia aquática, procura-se preservar a saúde e sobrevivência das espécies aquáticas para a necessidade humana. Para auxiliar na detecção da contaminação e preservar o meio ambiente, desenvolveram-se os biomarcadores os quais detectam efeitos subletais dos xenobióticos, antes que os efeitos a nível fisiológico e populacional sejam evidentes. A conservação do equilíbrio das funções celulares do ecossistema aquático, não só fornece o alimento e a fonte material, mas também pode ser um indicador da saúde e qualidade de vida do planeta.

1.1 PIRETRÓIDES

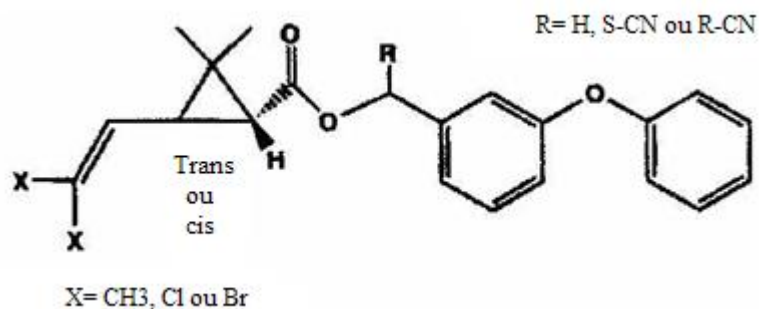
Décadas de pesquisas e desenvolvimento pelas indústrias agroquímicas resultaram em uma grande diversidade de pesticidas. Em escala cronológica, os organoclorados foram os primeiros a serem extensivamente utilizados e em seguida, os organofosforados. Porém, estas duas classes de inseticidas são altamente tóxicas para o homem e persistentes no ambiente. Os piretróides foram desenvolvidos com o objetivo de serem inseticidas eficazes e com toxicidade humana diminuída.

O termo “piretróide” é comumente usado para designar pesticidas sintéticos, os quais são derivados estruturalmente de piretrinas naturais, seis constituintes inseticidas do extrato do piretro, obtido das flores de *Chrysanthemum cinerariifolium*.

O piretro é um inseticida instável na luz e no ar, o que limita a sua efetividade na proteção de lavouras e no controle de insetos. O desenvolvimento de piretróides sintéticos é resultado de tentativas de modificar a estrutura das piretrinas naturais, no sentido de diminuir a fotossensibilidade, retendo a potente e rápida atividade de inseticida e a toxicidade aguda relativamente baixa do piretro para mamíferos (SODERLUND et al., 2001).

O desenvolvimento de piretróides sintéticos envolve processos interativos de modificação estrutural e avaliação biológica para que estes sejam comercializados. A maioria dos piretróides sintéticos foi obtida pela substituição de elementos estruturais das piretrinas, os quais conservam parte da molécula original, a forma molecular e propriedades físicas da estrutura modelo (figura 1). A inclusão do substituinte alfa-ciano (surgindo a classificação de piretróide tipo II, neste caso, e tipo I, sem o grupo alfa-ciano) na metade álcool 3-fenoxibenzil, como na deltametrina (figura 1), produziu compostos com maior potência que a permetrina, mas com fotossensibilidade semelhante (BALINT et al., 1995).

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DOS PIRETRÓIDES, MOSTRANDO OS SUBSTITUINTES E OS LOCAIS MAIS UTILIZADOS PARA MODIFICAR A MOLÉCULA



FONTE: SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of Pyrethroid Neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, 2001.

Os piretróides em geral são considerados moderadamente tóxicos para mamíferos (EPA categoria II). Os principais efeitos observados na exposição via oral dos mamíferos aos piretróides, aguda ou subcrônica, são efeitos neuroexcitatórios (CLARK, 1995), diferentes entre os piretróides tipo I e tipo II. Piretróides tipo I, geralmente produzem uma síndrome de intoxicação chamada “T”, por produzir tremor e os piretróides tipo II produzem uma síndrome chamada “CS”, por produzir coreoatetose e salivação. Via dérmica, os piretróides podem causar irritação incluindo rubor e edema na pele (SODERLUND et al., 2001).

Por serem considerados menos tóxicos para humanos que os inseticidas organoclorados e organofosforados, os piretróides têm múltiplas funções de uso na agricultura, na medicina veterinária, no controle de pestes domésticas e na saúde pública, principalmente para controle de vetores (BARLOW; SULLIVAN; LINES, 2001). Entretanto, quando estes inseticidas são utilizados, por exemplo, na agricultura, organismos não-alvos como as espécies aquáticas podem ser expostas. Em peixes, os piretróides são altamente tóxicos, podendo causar efeitos tóxicos com uma dose cerca de mil vezes menor comparando-se com mamíferos (WHO, 1990).

Dentre os piretróides, a deltametrina foi o composto químico originado da inclusão do grupamento substituinte α -ciano no grupo 3-fenoxibenzil, atribuindo-lhe

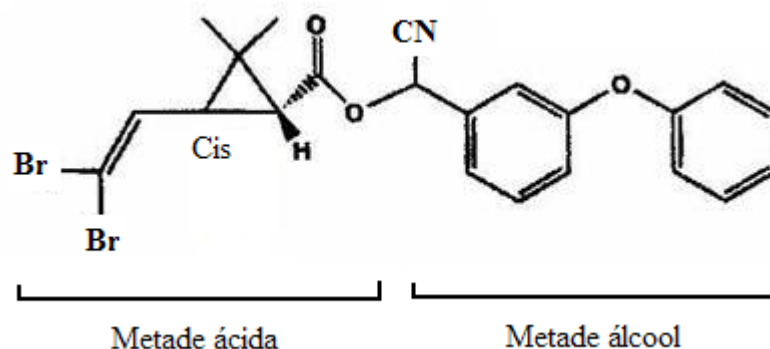
maior potência inseticida que o composto anterior sintetizado (permetrina) (SODERLUND et al., 2001).

1.1.1 Deltametrina

Quimicamente, é o isômero [1R, *cis*; α S] de oito estereoisômeros ésteres do análogo dibromo do ácido crisantêmico, ou seja, (S)- α -ciano-3fenoxibenzil-(1R)-*cis*-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato. Sua fórmula molecular é $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ e a sua estrutura química pode ser visualizada na figura 2. É preparada por esterificação do ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil) ciclopropanocarboxílico (Br_2CA) com álcool α -ciano-3-fenoxibenzil, ou por recristalização seletiva dos ésteres racêmicos obtidos da esterificação de (1R, 3R ou *cis*)-ácido com o racêmico ou álcool -[α R, α S, ou α RS ou \pm] (SODERLUND et al., 2001).

É um piretróide do tipo II, ou seja, possui em sua estrutura química o grupamento alfa-ciano (figura 2). Ela é estável na luz, umidade, ar, mas instável em meio alcalino (WHO, 1990).

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DA DELTAMETRINA



FONTE: SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of Pyrethroid Neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, 2001.

Algumas características físicas e químicas da deltametrina estão descritas na tabela 1, abaixo.

TABELA 1 - ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA DELTAMETRINA

Estado físico	pó cristalino
Cor	sem cor
Odor	sem odor
Densidade (20 °C)	0,5 g/cm ³
Massa molecular relativa	505,24
Ponto de fusão	98-101 °C
Ponto de ebulição	acima de 300 °C
Solubilidade em água (20 °C)	< 0,002 mg/L
Solubilidade em solventes orgânicos	solúvel
Acetona	500 g/L

FONTE: WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 97 – Deltamethrin. Geneva: International Programme on Chemical Safety – IPCS, 1990.

Formulada como uma emulsão concentrada, suspensão concentrada ou como pó, sozinho ou em combinação com outros pesticidas. Sinônimos e nomes comerciais incluem Decametrina, Decis, K-Otrine, Cislin.

Em mamíferos, estudos com deltametrina radioligada demonstraram que é rapidamente absorvido no trato gastrintestinal (pelo menos 96% de uma dose oral foi excretada 6 dias depois), dependendo do veículo é bem absorvida via dérmica e é rapidamente absorvida pelo trato respiratório (CLARK, 1995). O tempo de meia-vida plasmática para a deltametrina é cerca de 38,5 horas porém, a concentração em vários elementos do SNC e periférico foi mais alta que a concentração do plasma, declinando com o tempo de meia-vida similar àquele do plasma (ANADON et al., 1996).

Devido sua lipofilicidade, os piretróides têm alto grau de absorção nas brânquias, um fator que contribui na sensibilidade dos peixes à exposição aos piretróides aquosos (POLAT et al., 2002).

Em ratos e camundongos a principal reação envolvida no metabolismo da deltametrina é a clivagem éster, devido à ação do CYP450 e principalmente devido à ação das carboxiesterases. Os metabólitos são menos tóxicos que o composto inalterado. Em peixes, entretanto, o metabolismo do piretróide é quase que exclusivamente oxidativo, ficando deficiente na metabolização pelas esterases (DEMOUTE, 1989).

O mecanismo de ação inclui efeitos inibitórios nos receptores nicotínicos da ACh, receptores do ácido γ -aminobutírico, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPases e canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, porém a causa primária de toxicidade é seus efeitos excitatórios nos canais de Na^{+} voltagem-dependente de insetos e vertebrados, resultando numa persistente ativação dos canais de Na^{+} e despolarização da membrana.

Comumente usada no plantio de algodão, de grãos como o café, milho, trigo e soja e na produção de cereais, frutas e vegetais e para conservação de produtos estocados. Também é usado na saúde animal contra ectoparasitas e na saúde pública no controle de vetores.

Efeitos neurofisiológicos, neuroquímicos e cardiovasculares são associados com a intoxicação em mamíferos. Aumento de alguns aminoácidos neurotransmissores e seus metabólitos durante a intoxicação foram detectados como, aumento do glutamato, serotonina e dopamina (HUDSON et al., 1986). Doses letais de deltametrina produziram aumento da pressão arterial em ratos adultos. Aumento dos níveis de noradrenalina e adrenalina no plasma, assim como de glucose e lactato foram detectados (BRADBURY et al., 1983).

É extremamente tóxica para peixes, a LC_{50} 96h está entre 0,4 e 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto LD_{50} para ratos está entre 31-139 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e 19-34 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para camundongos. É capaz de causar danos neuronais, nos hepatócitos, em enzimas bioquímicas sanguíneas (BALINT et al., 1995). Estudo com a deltametrina e com o organofosforado metidation em *Cyprinus carpio* (carpas), BALINT et al. (1995)

verificaram que apenas $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de uma solução de deltametrina, usada na exposição dos animais via hídrica por 72 horas, foi suficiente para causar toxicidade, expressada pela inibição da atividade da acetilcolinesterase do soro em cerca de 20%, quando comparada com os animais controles. Já para o organofosforado, a dose testada foi de 2 mg.L^{-1} , por cinco dias, a qual também demonstrou toxicidade. Uma única dose de deltametrina ($0,75 \mu\text{g.L}^{-1}$) em peixes da espécie *Channa punctatus* Bloch expostos por 48 horas, causou indução de vários sistemas antioxidantes no fígado, rim e brânquias. A peroxidação lipídica foi induzida em todos os órgãos, principalmente nas brânquias, e a glutatona e ácido ascórbico foram significativamente aumentados (SAYEED et al., 2003).

REDDY e PHILIP (1994) utilizaram uma concentração subletal de cipermetrina (também um piretróide do tipo II) para expor *in vivo*, machos de *Cyprinus carpio* e verificaram a inibição da atividade da AChE e ATPase.

Estudos de MOORE e WARING (2000) avaliaram o efeito do piretróide cipermetrina na reprodução de salmão. Observaram que a exposição dos machos por cinco dias à concentração de $0,004 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cipermetrina via hídrica, reduziu a habilidade do sistema olfatório dos machos a detectar o ferormônio tipo $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberado pela fêmea na água, o qual resultaria no aumento plasmático dos hormônios sexuais no macho. Além disso, diminuiu significativamente o número de ovos fertilizados.

1.2 BIOMARCADORES

Durante décadas os efeitos de xenobióticos sobre o ambiente aquático foram avaliados pelo monitoramento de mudanças ambientais em cada nível de organização do ecossistema como, populações, comunidades e o ecossistema propriamente ditam, somente em termos de taxa de sobrevivência. Entretanto, estes estudos eram limitados, pois vários efeitos bioquímicos tóxicos podiam ocorrer simultaneamente, sem considerar a complexidade e as funções do ecossistema (HUGGETT et al., 1992).

A toxicologia ambiental passou a ser mais complexa, passando a utilizar marcadores para cada nível de organização. Estes marcadores, bioquímicos, fisiológicos e histológicos, devem apresentar habilidade de medir diferentes respostas à presença de estressores distintos (HUGGETT et al., 1992).

O monitoramento da presença de xenobióticos em ambientes aquáticos pode, a partir de estudos com espécies residentes, beneficiar a qualidade do ambiente, juntamente com a saúde humana. A localização e a determinação da concentração dos poluentes podem assegurar a vida destas espécies, e também, um ambiente saudável garantindo ao homem sua utilização, quer para alimentação, quer para o abastecimento de água, quer para o lazer.

A necessidade da detecção subletal dos efeitos dos tóxicos sobre os organismos levou ao desenvolvimento dos biomarcadores. Os biomarcadores refletem o *status* saudável de organismos nos níveis mais baixos de organização (molecular ou celular) e apresentam rápida resposta ao estresse e alta importância toxicológica. Eles podem ser usados como indicadores precoces de alterações ambientais, antes da ocorrência de danos irreversíveis no ecossistema (HUGGETT et al., 1992). Eles são quantificáveis bioquimicamente, fisiologicamente ou por metodologias histológicas. Os biomarcadores podem estabelecer de acordo com a dose ou tempo-dependentes o grau de disfunção que o contaminante pode produzir.

Algumas agências ambientais, como a EPA (*Environmental Protection Agency*) e o ICES (*International Council for Exploration of the Sea*) recomendam a incorporação da análise de biomarcadores aos novos programas de monitoramento, como metodologias complementares, expressando o grau de toxicidade causado por contaminantes aos organismos ambientais.

O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento oferece algumas vantagens, pois são, normalmente, os primeiros a serem alterados, apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, quando comparados às análises químicas. Através da análise destes parâmetros pode-se: 1) detectar precocemente a existência de contaminação por substâncias tóxicas, biologicamente significativas; 2) identificar que espécies ou populações encontram-se

em risco de contaminação; 3) a magnitude da contaminação, o que é fundamental e 4) o grau de severidade dos efeitos causados pelos xenobióticos (STEGEMAN; HAHN, 1994).

Os biomarcadores bioquímicos podem ser influenciados por fatores abióticos como variações sazonais, temperatura e pH (DIGIULIO et al., 1995). Portanto, a avaliação e controle destes fatores são fundamentais para a eficácia do uso de respostas bioquímicas no monitoramento do impacto promovido por xenobióticos, sobre o meio ambiente.

Um dos biomarcadores bioquímicos mais estudados é a indução do citocromo P450-dependente de monooxigenases (CYP450). A elevada atividade pode indicar a exposição dos organismos frente a compostos indutores, conseqüentemente avaliar o grau e o possível risco de contaminação ambiental (STEGEMAN; HAHN, 1994).

Outros biomarcadores bioquímicos compreendem a Na^+K^+ -ATPase e a colinesterase.

A Na^+K^+ -ATPase é uma enzima que tem como função principal no peixe regular o balanço iônico, e tem sido muito utilizada para detectar alterações osmoregulatórias provocadas por contaminantes ambientais (LI et al., 1998).

A medida da atividade da colinesterase é um biomarcador muito utilizado em biomonitoramento aquático (WEISS, 1958; ABOU-DONIA; MENZEL, 1967; BABU et al., 1989; MAGNOTTI; ZAINO; McCONNEL, 1994; THOMPSON; LANGTON; HART, 1995; SILVA DE ASSIS, 1998). A medida enzimática da colinesterase possibilita a detecção de efeitos toxicológicos subletais, mesmo sem a presença de sintomatologia clínica.

1.2.1 Citocromo P450 (CYP450)

A transformação metabólica (biotransformação) dos compostos químicos nos organismos é essencial para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar a interação entre o elemento químico e a célula.

A biotransformação inclui numerosos sistemas enzimáticos diferentes, as quais atuam em diversos tipos de substratos. Muitas destas enzimas têm em comum a função de converter estruturas tóxicas para menos tóxicas, e converter químicos lipofílicos em estruturas hidrofílicas e conseqüentemente, rapidamente excretadas.

Freqüentemente produtos metabólicos são eles mesmos mais reativos e tóxicos do que o composto não metabolizado. Muitos xenobióticos tóxicos são ativados pelo metabolismo. Freqüentemente os compostos passam por uma série de reações, com varias enzimas participando em etapas seqüenciais para ativação, desintoxicação, e por último a excreção do xenobiótico. WILLIAMS, propôs o conceito de reações de fase I (oxidação e funcionalização) e reações de fase II (conjugação e desintoxicação) para distinguir as fases neste processo seqüencial (WILLIAMS, R. T, apud STEGMAN; HAHN, 1994).

O metabolismo oxidativo envolvendo oxigênio molecular é o processo enzimático inicial na biotransformação da maioria dos compostos orgânicos lipofílicos (reações de fase I). Os principais grupos de enzimas envolvidas nesta etapa da biotransformação de xenobióticos, são as monooxigenases flavoproteínas (FMO) e as monooxigenases heme proteínas (citocromo P450). Ambos os grupos são expressos em vertebrados aquáticos e invertebrados. Entretanto, o CYP450 domina a literatura nas monooxigenases, em mamíferos e em espécies aquáticas (STEGEMAN; HAHN, 1994).

Em peixes, e em outros vertebrados, o citocromo P450 é principalmente encontrado no retículo endoplasmático (RE) e nas mitocôndrias de fígado, rim, cérebro, e intestino delgado, assim como em outros órgãos (BUCHELI; FENT, 1995).

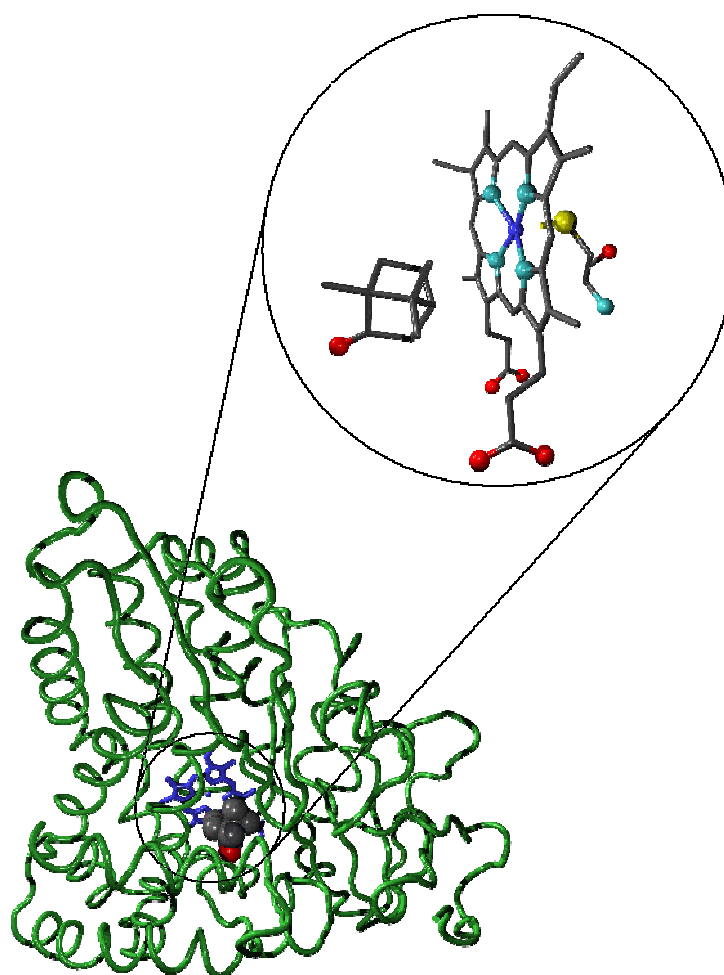
Não somente é um sistema de enzimas crucial para a transformação de xenobióticos, como também tem uma grande função no metabolismo de várias substâncias endógenas, como na produção de hormônios esteróides e no metabolismo de ácidos graxos e seus derivados.

1.2.1.1 Organização e função

O CYP450 é uma heme proteína contendo ferro que, na sua forma reduzida,

complexa com monóxido de carbono, produzindo um composto que absorve luz em 450nm (OMURA; SATO, 1964). O ferro da protoporfirina está ligado à cadeia polipeptídica das isoenzimas do citocromo P450 por forças hidrofóbicas e ligações eletrostáticas covalentes. Quatro valências do átomo de ferro ligante estão ligadas ao anel da porfirina, planarmente, a quinta está ligada ao grupo tiolato (S⁻) da cisteína da cadeia polipeptídica, por uma ligação coordenada e, a sexta, está orientada em direção ao sítio de ligação do oxigênio, durante a fase I da biotransformação. A estrutura básica do CYP450 está sendo mostrada na figura 3.

FIGURA 3 - MOLÉCULA QUÍMICA DO CYP450.



FONTE: Disponível em:<www.pharmacology2000.com> Acesso em 01 nov.2003.

NOTA: A figura mostra o sistema enzimático CYP450 e suas cadeias polipeptídicas em verde escuro, e em evidência, o grupo prostético heme e um substrato qualquer: o átomo de ferro está representado em azul escuro; os átomos de nitrogênio estão representados em azul claro, o grupo tiolato em amarelo, oxigênio em vermelho e os átomos de carbono nas barras cinzas.

As moléculas de citocromo P450 estão ligadas aos fosfolipídios da membrana por um ou dois segmentos dos peptídeos, sendo que seu sítio ativo localiza-se próximo do citoplasma (GOKSΦYR; FÖRLIN, 1992). Uma parte do citocromo P450 contendo ferro está exposta para o lado citosólico da membrana. O grupo prostético heme, com o sítio para a ligação do substrato, estão orientados para a face interna da membrana. A existência de dois canais de acesso para os substratos confere ao citocromo P450 a habilidade de metabolizar uma variedade de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (BUCHELI; FENT, 1995).

Embora existam diferenças entre o sistema de monooxigenase de mamíferos e peixes (geralmente baixa atividade da enzima, diferentes isoenzimas e a falta da indução por fenobarbital para peixes), o sistema tem características globais muito similares. Basicamente ele consiste de duas enzimas principais, a NADPH-citocromo P450 redutase e citocromo P450. Conectadas com estas estão o citocromo b_5 e sua redutase, NADH-citocromo b_5 redutase (BUCHELI; FENT, 1995).

1.2.1.2 Mecanismo de reação

No estado em que o grupo prostético ferro heme está sob a forma de baixo spin Fe^{3+} , a molécula está no seu estado livre ou inicial. A primeira etapa é a ligação do substrato, a qual usualmente resulta na conversão para ferro no estado de alto spin, formando um potencial de redução, favorecendo a redução do ferro. Seguido da ligação ao substrato, o ferro é reduzido pela transferência de elétrons da flavoproteína NADPH-citocromo P450 redutase, em alguns casos com o envolvimento de proteínas ferro-enxofre (redoxinas). Subseqüentemente O_2 é ligado, um ponto crítico o qual a catálise pode proceder ou ser interrompida, resultando na liberação de oxigênio ativo (superóxido). A próxima etapa envolve a adição do segundo elétron, em alguns casos via citocromo b_5 , e a formação de peróxido, seguido pela clivagem da ligação O-O, da formação do radical substrato, e da hidroxilação do radical e liberação do produto. Esta etapa ainda não é bem conhecida. Entretanto, adição de hidroperóxidos orgânicos como hidroperóxido de cumeno para o P450 *in vitro* pode ser necessário para o

acoplamento da hidroxila ao substrato (GUENGERICH; MACDONALD, 1990; HOLLENBERG, 1992).

1.2.1.3 A super família P450

Até 1987 havia mais de 14 diferentes nomes em uso para o que hoje chamamos de citocromo P450, e mais de 20 nomes para proteínas homólogas de diferentes espécies. O seqüenciamento dos genes e proteínas do P450 atenuou a confusão entre nomenclaturas, e adotou-se uma classificação baseada na medida da seqüência de aminoácidos do P450 (NEBERT et al., 1987; NELSON et al., 1993). A classificação inclui a designação de CYP, seguido pelos símbolos que denotam o gene da família (número arábico), subfamília (letra em maiúscula), e o gene específico (número arábico). O número de genes em qualquer uma das espécies não é ainda conhecido. Estima-se que mais de 100 distintos genes de P450 são expressos nos mamíferos (POLAND; KNUTSON, 1982; WHITLOCK, 1990). As subfamílias do citocromo P450 são classificadas considerando: o peso molecular monomérico, a composição de aminoácidos, a seqüência terminal de aminoácidos, a especificidade ao substrato, a distinção por anticorpos específicos e o tipo de reação em que estão envolvidas. As proteínas do CYP1A1 em ratos e camundongos são 93% idênticas, mas as proteínas CYP1A1 nos ratos e trutas são 59% idênticas (HEILMANN et al., 1988).

Há uma crescente utilização da indução de CYP1A como um biomarcador para indicar a exposição dos organismos a vários compostos indutores (STEGEMAN et al., 1992).

A subfamília CYP1A1 não é encontrada no fígado de humanos, mas pode ser encontrada em tecidos extra-hepáticos, como por exemplo, em pulmão de fumantes. Contudo, em animais aquáticos, esta subfamília é expressa cataliticamente pela atividade da 7-etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) que tem como substrato a 7-etoxiresorufina, participando de uma reação *O*-desalquilação (BUCHELI; FENT, 1995).

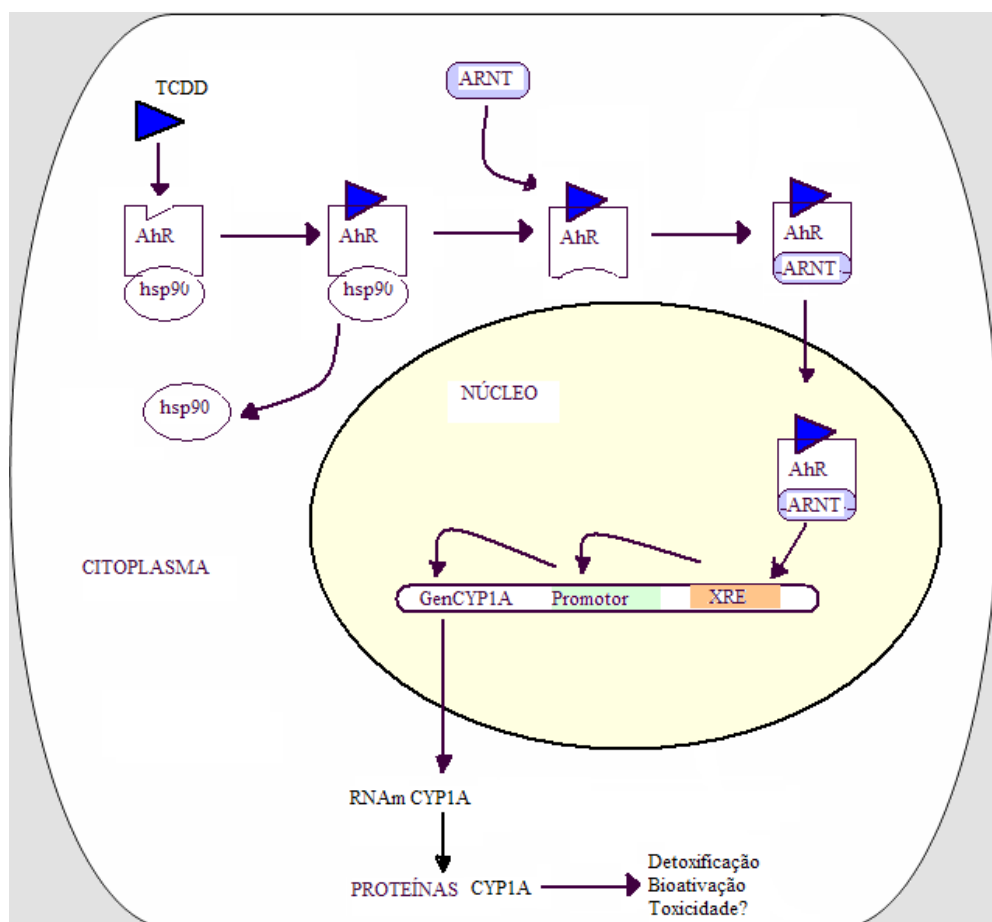
1.2.1.4 Indução do citocromo P450 por xenobióticos em peixes

A indução de isoenzimas específicas de citocromo P450 é uma resposta sensível à exposição dos animais a certos tipos de químicos antropogênicos (PAHs - hidrocarbonetos policíclicos, PCBs - bifenilas policlorinadas e dibenzodioxinas). Esta exposição leva a uma estimulação da transcrição do gene para CYP1A, mediada por estimulação do receptor, resultando no aumento do nível de RNAm específica nova síntese de isoenzimas de citocromo P450 (CYP1A) e no aumento da respectiva atividade catalítica (atividade EROD). O receptor envolvido na regulação da expressão do gene CYP1A é conhecido como receptor Ah (receptor hidrocarboneto aromático). A indução é iniciada pela ligação do xenobiótico específico ao complexo proteico que compreende o receptor Ah e proteína 90 (hsp 90), a qual mais tarde será dissociada do complexo receptor-indutor. Após a liberação da hsp 90, o complexo receptor-indutor liga-se a uma outra enzima, a hidrocarboneto aril nuclear transferase (ARNT), e pode então ser transferido do citoplasma da célula para o núcleo. No núcleo, a ARNT liga-se a região específica do DNA, o elemento de resposta à xenobiótico (XRE). Fatores transcricionais são usados para acessar a região promotora do gene CYP1A, e o RNA mensageiro pode ser sintetizado (STEGEMAN; HAHN, 1994). A figura 4 mostra as etapas da indução do CYP1A pelo composto TCDD.

Há fortes evidências de que o aumento do conteúdo enzimático e a atividade induzida do CYP1A em peixes por hidrocarbonetos aromáticos policlorados e outros hidrocarbonetos aromáticos seja dose-dependente. Este aumento do conteúdo enzimático e/ou da atividade tem sido relatado por contaminação em numerosos estudos realizados (GUENGERICH; MACDONALD, 1990; GOKSØYR; FÖRLIN, 1992; STEGEMAN; HAHN, 1994; BUCHELI; FENT, 1995; DIGIULIO et al., 1995).

Vários fatores influenciam a atividade do citocromo P450 de peixes e a sua conseqüente determinação. Primeiramente, diferentes tratamentos da amostra (por exemplo, o nível de estresse, preparação do tecido, conservação da amostra) e a execução do ensaio. A temperatura é provavelmente o fator abiótico dominante que exerce influência sobre o citocromo P450.

FIGURA 4 - HIPÓTESE DO MECANISMO DA INDUÇÃO DO CITOCROMO P450 1A (CYP1A), COMUMENTE REFERIDO COMO A TEORIA DO RECEPTOR-Ah.



FONTE: A autora

NOTA: AhR, receptor hidrocarboneto aromático; HSP90, proteína 90 de choque térmico “HEAT SHOCK”; TCDD, 3,4,7,8-tetraclorodibenzodioxina; XRE, elemento de resposta a xenobiótico; ARNT, hidrocarboneto aril nuclear transferase; RNAm, ácido ribonucléico mensageiro.

Alguns estudos têm encontrado elevada atividade enzimática em peixes que vivem em águas com altas temperaturas. É de crucial importância a seleção das espécies de peixes para o estudo (BUCHELI; FENT, 1995).

1.2.1.5 Avaliação da atividade catalítica

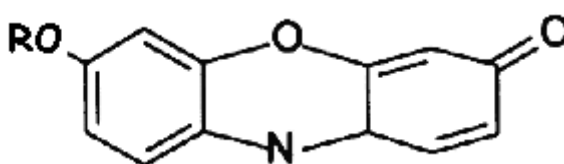
Neste trabalho a atividade catalítica do CYP450 será avaliada pela atividade da EROD (etoxiresorufina-*O*-desetilase).

Há várias maneiras complementares para se estudar a atividade catalítica do CYP450. Estas incluem a análise da atividade de proteínas purificadas, a correlação da taxa do metabolismo microsomal de diferentes substratos, a correlação da taxa do metabolismo de um determinado substrato com o conteúdo do P450 particular, a utilização de inibidores químicos específicos e ainda a utilização de anticorpos específicos e inibitórios.

A atividade catalítica determinada com substratos específicos tem sido extensivamente utilizada como marcador da exposição a contaminantes ambientais e para indicar regulação diferencial de formas distintas de CYP450. Entretanto, inferir a identidade do CYP450 somente com base na atividade catalítica é arriscado. Proteínas homólogas em uma espécie podem catalisar diferentes reações.

Alcoxi derivados da resorufina (figura 5), descritos por BURKE e MAYER (1983 e 1985), têm sido preferencialmente utilizados como substratos para analisar a atividade catalítica do CYP450. Resorufina é uma estrutura com multi anéis, com forma similar a vários substratos indutores de CYP1A. Resorufinas substituídas são desalquiladas pelo CYP450, e a identidade do substituinte aparentemente pode determinar o acesso a sítios ativos de diferentes formas de CYP450.

FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS DA ALKOXIRESORUFINA.



FONTE: STEGEMAN, J.J.; HAHN, M.E. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. OSTRANDER, G. K.; MALINS, D. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1994.

NOTA: R= metil, etil, benzil, propil ou pentil; O= oxigênio e N= nitrogênio.

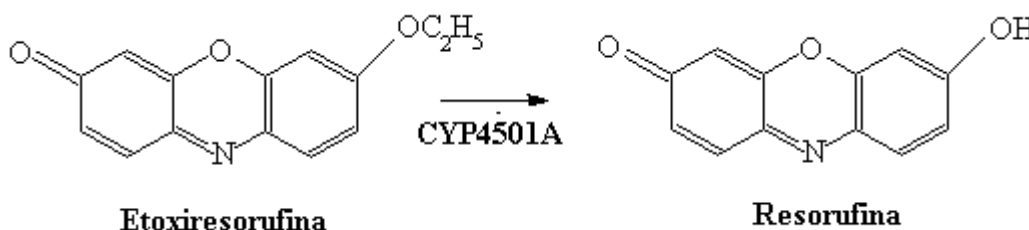
A EROD catalisa uma reação de O-desalquilação, dependente de NADPH, na qual o substrato é a 7-etoxiresorufina (7 ER) (STEGEMAN; HAHN, 1994).

O aumento da atividade da EROD em vertebrados é um indicador da indução do CYP1A auxiliando, portanto, no monitoramento ambiental.

Uma das vantagens primárias da indução da atividade da EROD como biomarcador é a simplicidade de ser mensurada. O produto formado na reação, a resorufina, pode ser medido por espectrofotômetro ou espectrofluorímetro.

A reação química da EROD está sendo mostrada na figura 6.

FIGURA 6 - REAÇÃO QUÍMICA CATALISADA PELO CYP450, EXPRESSADA PELA ENZIMA EROD (ETOXIRESORUFINA – O – DESETILASE).



FONTE: BURKE, M.D. e MAYER, R.T. Differential effects os phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction on the hepatic microssomal metabolism and cytochrome P450-binding of phenoxazone and a homologous series of its n-alkyl ethers (alkoxyresorufins). **Chemical Biologic Interactive**, v.45, p.243, 1983.

NOTA: O = oxigênio; N = nitrogênio; OH = grupo hidroxila.

1.2.2 Na⁺K⁺-ATPase

Nos últimos 50 anos, tem sido feito estudos sobre o transporte do íon sódio (Na⁺) no epitélio, o qual é o processo de transporte mais bem caracterizado de todas as células eucarióticas (AHEARN et al., 1999). Na maioria dos casos, a absorção do Na⁺ através do epitélio envolve o processo de difusão do Na⁺ do meio extracelular para a célula através de canais ou carreadores proteicos (difusão facilitada). A saída do Na⁺ da célula para a corrente sanguínea é contra um gradiente eletroquímico, e realizada pela Na⁺K⁺-ATPase (“bomba de sódio”), usualmente localizada na membrana basolateral (THERIEN; BLOSTEIN, 2000).

Os processos fundamentais na transferência de solutos através da célula epitelial incluem: (i) adsorção do soluto na superfície da membrana celular, (ii) entrada

da célula. A saída da célula para o sangue pode envolver uma variedade de carreadores, especialmente transportadores primários, que utilizam a energia armazenada (por exemplo, hidrólise do ATP) para mover o soluto contra um gradiente eletroquímico do sangue (HANDY; EDDY; BAINES, 2002).

Sob circunstâncias normais, a Na^+K^+ -ATPase utiliza a energia liberada da hidrólise do ATP para exportar 3 íons Na^+ da célula em troca de 2 íons K^+ do sangue para a célula. Recentemente, observou-se também seu envolvimento no transporte de vários metais, os quais podem inibir a Na^+K^+ -ATPase.

A ATPase é encontrada em várias formas íon-dependente (Na^+K^+ - ATPase; Ca^{2+} - ATPase; $\text{Ca}^{2+}\text{HCO}_3^-$ - ATPase; $\text{Mg}^{2+}\text{HCO}_3^-$ - ATPase), e regula o volume celular, pressão osmótica e permeabilidade da membrana, além de contribuir para restabelecer o potencial de membrana de todas as células animais.

Em peixes é principalmente encontrada nas brânquias e em outros tecidos como esôfago, intestino e rins.

A Na^+K^+ -ATPase é inibida pela ouabaína e outros digitálicos que atuam em sítios extracelulares da membrana. Vários compostos químicos podem inibir a atividade da ATPase, principalmente os metais pesados como chumbo e prata. A alteração da atividade da ATPase pode resultar em queda do mecanismo de transporte ativo, necessário para a absorção de nutrientes, íons e metabólitos. A inibição da Na^+K^+ -ATPase, provavelmente resulta numa incontável entrada de Na^+ para o interior da célula, a favor do gradiente de concentração, juntamente com moléculas de água, a favor do gradiente osmótico. Este processo pode causar inchaço da célula e finalmente ruptura da membrana (THAKER et al., 1996).

Esta bomba é regulada pela concentração de íons Na^+ e K^+ e pela estimulação hormonal via AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) (FERGUSON; BOUTILIER, 1989). A PKA pode modificar proteínas alvos por fosforilação de resíduos de aminoácidos específicos.

A Na^+K^+ -ATPase é uma fosfo-ATPase composta de pelo menos três subunidades: α , β e γ (BLANCO; MERCER, 1998). A subunidade α (massa molecular de ~ 112 kDa) é responsável pelas propriedades catalíticas, a qual contém um sítio de

ligação para cátions e ATP, e sofre mudança conformacional utilizando a energia liberada da hidrólise do ATP para o transporte iônico. A subunidade α da Na^+K^+ -ATPase parece ser um substrato para serina/treonina quinases: proteína quinase AMPc dependente (PKA) e proteína quinase Ca^{2+} /fosfolipídio dependente (PKC). Modificações covalentes da Na^+K^+ -ATPase pelas quinases e fosfatases, representam um mecanismo pelo qual os hormônios podem modular a atividade da Na^+K^+ -ATPase através da fosforilação e desfosforilação.

A β -subunidade glicosilada (massa molecular ~ 35 kDa) tem papel importante na expressão, maturação e movimentação da enzima pela membrana. A subunidade γ é polipeptídeo não essencial para a atividade da Na^+K^+ -ATPase, mas parece que modula a afinidade do ATP e K^+ da enzima renal (MAHMMOUD; CORNELIUS, 2000).

Na^+K^+ -ATPase é uma das mais importantes enzimas associadas com a regulação iônica em brânquias de peixes porque indiretamente fornece energia para excreção branquial de NaCl de teleósteos marinhos (MCCORMICK, 1995). O envolvimento da Na^+K^+ -ATPase no balanço iônico de peixes de água doce ainda não é bem compreendido (PERRY, 1997). Também está envolvida em processos que mantêm o volume celular (BLANCO; MERCER, 1998). Dois exemplos de estudos em peixes são as células clorinadas em teleósteos marinhos e células tubulares na glândula retal de elasmobrânquios. Nestes dois tipos de células, a Na^+K^+ -ATPase está localizada ao longo da membrana basolateral e/ou sistema tubular. Muitas pesquisas têm reportado uma correlação positiva entre o ambiente salino e a atividade da Na^+K^+ -ATPase das brânquias em peixes teleósteos, especialmente em salmonídeos (BLANCO; MERCER, 1998).

Recentemente, estudos da regulação da Na^+K^+ -ATPase branquial de peixes com anticorpos homólogos e heterólogos e com seqüências parciais de DNAC para a subunidade α estão sendo cada vez utilizados. Por exemplo, mudanças na atividade da Na^+K^+ -ATPase branquial têm sido positivamente correlacionada com o nível de RNAm e proteínas específicas para Na^+K^+ -ATPase, sugerindo que mudanças na atividade da Na^+K^+ -ATPase branquial de peixes são devido a mudanças na relativa

abundância da enzima. Em mamíferos, ativação de Na^+K^+ -ATPase latentes têm mostrado ser a responsável por mudanças na atividade da enzima mas, isto não tem sido muito estudado em peixes (UCHIDA; KANEKO, 1996).

Células ricas em Na^+K^+ -ATPase podem ser imunolocalizadas tanto na região lamelar da brânquia quanto na interlamelar de salmões de água doce. Tem sido sugerido que as células ricas em Na^+K^+ -ATPase encontradas na lamela podem estar envolvidas com a captação dos íons em peixes de água doce, enquanto as células encontradas na região interlamelar são associadas com a excreção de NaCl no ambiente marinho (UCHIDA; KANEKO, 1996).

1.2.3 Colinesterase

O mecanismo da neurotransmissão colinérgica requer a rápida inativação da acetilcolina (DALE, apud MASSOULIÉ; BON, 1992). LOEWI e NAVRATIL mostraram em 1926 que a acetilcolina podia ser destruída por uma enzima que existia no extrato aquoso de tecidos de sapo. STEDMAN, Ed. e STEDMAN, El., citado por MASSOULIÉ; BON, (1992), caracterizou uma esterase que hidrolisa especificamente ésteres de colina em soro de cavalo, a qual chamou de colinesterase.

O termo colinesterase é normalmente utilizado para referir-se à soma da atividade da “pseudocolinesterase” ou butirilcolinesterase com a atividade da acetilcolinesterase ou “colinesterase verdadeira”. Estas enzimas diferem na afinidade pelo substrato, bem como na velocidade de degradação deste, diferem na localização e concentração numa mesma espécie. Diferentes formas moleculares também têm sido encontradas em uma mesma espécie. A butirilcolinesterase tem maior especificidade a hidrolise da propionilcolina e butirilcolina e na maioria dos peixes, é encontrada principalmente no soro e em menor quantidade nos tecidos como o muscular e o nervoso. A acetilcolinesterase tem maior afinidade para hidrolisar a acetilcolina e é principalmente encontrada nos eritrócitos, músculo e cérebro. Ambas são enzimas encontradas solúveis ou ligadas à membrana (MASSOULIÉ; BON, 1992).

As propriedades catalíticas da colinesterase, assim como a sua ocorrência e localização histoquímica em tecidos de varias espécies animais, tem sido extensivamente estudados.

A atividade da colinesterase pode ser determinada em diferentes tecidos e fluidos, e entre a mesma espécie a sensibilidade enzimática pode variar considerando o compartimento onde a atividade é medida (SILVA DE ASSIS,1998).

Compostos como os inseticidas organofosforados (OP) e carbamatos inibem a colinesterase de maneira irreversível e reversível, respectivamente. Outros compostos como metais pesados e organoclorados parecem também inibi-la, porém a concentração necessária para promover esse efeito é relativamente mais alta (STURM et al, 2000; GALGANI; BOCQUENÉ; CADIOU, 1992).

A medida da atividade da ChE é muito utilizada para diagnosticar exposição a tóxicos anticolinesterásicos em peixes, e pode ser considerado um dos mais antigos biomarcadores (SILVA DE ASSIS,1998; STURM, et al., 2000).

WEISS, 1958 demonstrou que peixes expostos a organofosforados (OP) apresentaram redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE) proporcional à concentração e ao tempo de exposição. A inibição ainda foi dependente da natureza do OP e da espécie de peixe exposta. A retirada dos peixes para um sítio não contaminado levou à recuperação dos níveis de AChE, sendo o tempo de recuperação uma função do grau de inibição inicial e da natureza do composto.

Apesar da inibição da colinesterase ser um biomarcador mais específico de animais expostos aos organofosfatos ou carbamatos, similares resultados tem sido descrito para a deltametrina (SZEGLITES et al., 1995a). Tratamento com deltametrina *in vivo* em carpas adultas (*Cyprinus carpio L.*) por três dias causou uma diminuição de 20% na atividade da colinesterase plasmática (BALINT et al., 1995).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da contaminação pela deltametrina, em concentrações subletais, em cascudos (*Ancistrus multispinnis*), utilizando biomarcadores bioquímicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o efeito da deltametrina sobre a quantidade total do CYP450 em *Ancistrus multispinnis* expostos via intracelomática, em concentrações subletais.
- b) Determinar o efeito da deltametrina sobre a atividade catalítica do CYP450 expressa sob a forma da atividade da EROD, em *Ancistrus multispinnis* expostos via intracelomática, em concentrações subletais.
- c) Determinar o efeito da deltametrina sobre a atividade da ATPase, na forma Na^+K^+ - ATPase, em *Ancistrus multispinnis* expostos via intracelomática, em concentrações subletais.

Determinar o efeito da deltametrina sobre a atividade da colinesterase muscular em *Ancistrus multispinnis* expostos via intracelomática, em concentrações subletais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Peixes da espécie *Ancistrus multispinnis* foram selecionados como animais testes. Esta espécie foi escolhida por apresentar dimorfismo sexual, ser facilmente aclimatada em laboratório e por ser uma espécie nativa. Os animais foram adquiridos de fornecedor comercial conhecido, transportados ao laboratório em saco plástico com água e oxigênio saturado e imediatamente foram transferidos para aquários previamente preparados, atendendo nossas condições padronizadas: temperatura da água em $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH de 7.3 ± 0.2 , fotoperíodo de 12 horas e alimentação com ração enriquecida com algas uma vez ao dia. Foram utilizados espécimes machos e fêmeas com comprimento corporal de 10 ± 2 cm.

3.2 ACLIMATAÇÃO

Os peixes foram aclimatados em aquários-estoque com 120 litros de capacidade, com características físicas e químicas controladas (temperatura em $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e $\text{pH} = 7.3 \pm 0.2$), por um mês. Neste período, os animais foram alimentados com ração enriquecida com algas, diariamente.

3.3 SUBSTÂNCIA EXPERIMENTAL

Deltametrina ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{NO}_3$) de grau técnico 99,8% Sigma, foi dissolvida em óleo de girassol de procedência comercial.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Após aclimatação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro

aquários, com 12 animais cada (figura 8):

FIGURA 8 - GRUPOS DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO



Grupo 1
(controle)
n= 12



Grupo 2
(deltametrina 3 mg.kg⁻¹)
n= 12



Grupo 3
(deltametrina 4 mg.kg⁻¹)
n= 12



Grupo 4
(3MC 30 mg.kg⁻¹)
n= 12

FONTE: a autora

A via de administração utilizada em todos os peixes foi a via intracelomática, com auxílio de seringa de 1 mL e agulha 13 x 0,45mm.

O protocolo experimental foi repetido, com exceção do grupo que recebeu o composto 3MC, totalizando 24 animais por grupo. Segue abaixo o procedimento realizado:

- a) os animais testes foram pesados e, receberam diferentes doses de deltametrina (3 ou 4 mg.kg⁻¹) dissolvida em óleo de girassol comercial, via intracelomática, sendo que o volume da solução administrada variou de acordo com o peso corporal de cada animal;

- b) os animais do grupo controle receberam apenas óleo de girassol comercial, também via intracelomática, com variação do volume administrado de acordo com o peso corporal do animal;
- c) ao quarto grupo, administrou-se o composto 3-metilcolantreno (3MC) na dose de 30 mg.kg^{-1} , potente indutor do CYP1A, para controle positivo e validação da metodologia da atividade do CYP450;
- d) os animais permaneceram nos aquários testes por um período de 96 horas, nas mesmas condições padrões de aclimatação, incluindo alimentação uma vez ao dia;
- e) após 96 horas, os animais foram sacrificados por secção da coluna vertebral;
- f) o peso (g) e o comprimento corporal (cm) de cada animal foram verificados, juntamente com a análise do sexo;
- g) o fígado, coração, esôfago, brânquias, cérebro e o músculo axial foram retirados para serem processados para as análises enzimáticas.

3.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.5.1 Fígado

Para a quantificação do CYP450 total e para a análise da atividade da EROD, o fígado foi processado para a extração das frações S_9 e microsomal, baseando-se nas metodologias descritas por STEGEMAN, BINDER e ORREN (1979) e por SILVA DE ASSIS (1998). O processamento do fígado foi assim realizado:

- a) as amostras (armazenadas em nitrogênio líquido em *pool* de 4 fígados) foram descongeladas em temperatura de 4°C ;
- b) para a homogeneização, foi adicionada à amostra uma quantidade de

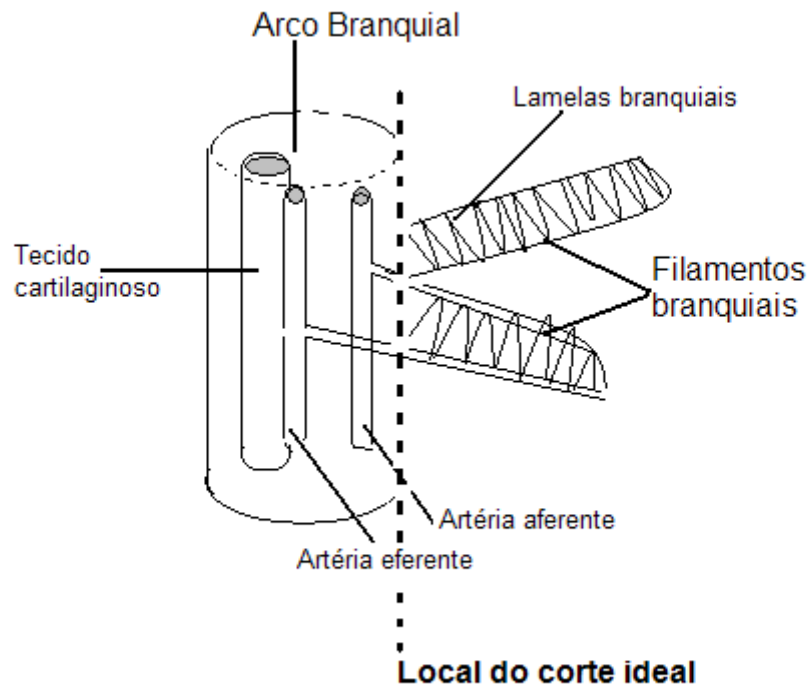
- tampão para manter a relação de 1 mg de proteína por mL de tampão (fosfato de potássio 0,1M pH 7,4). A amostra foi homogeneizada a 4°C com auxílio do homogeneizador automático Potter - Elvehjem;
- c) o homogeneizado foi dividido em dois eppendorfs para serem centrifugados;
 - d) as amostras foram centrifugadas por 20 min a 10.000 x g a 4°C;
 - e) o sobrenadante foi coletado (fração S₉) e o precipitado desprezado. 500 µL do sobrenadante foram aliqotados e armazenados a – 70°C (para as análises da atividade da EROD e da quantidade de proteína), e o restante foi transferido para um tubo especial de ultracentrífuga;
 - f) a fração S₉ foi ultracentrifugada por 1 h a 100.000 x g a 4 °C;
 - g) o sobrenadante foi dispensado (citosol) e o precipitado (microsoma) foi ressuspendido com 500 µL de tampão de ressuspensão gelado:
 - tampão de ressuspensão:
 - citrato de sódio 0,1 M pH = 7.4
 - cloreto de potássio 0,1 M
 - ditiotheitrol 1 mM
 - glicerol 30% (v/v);
 - h) alíquotas do microsoma foram armazenadas em – 70°C para análise da proteína e atividade da EROD.

3.5.2 Brânquias, Coração, Esôfago e Cérebro

Para a análise da atividade da Na⁺K⁺-ATPase foram utilizadas as brânquias, o coração, o esôfago e o cérebro. Logo após a retirada das brânquias, os filamentos branquiais foram separados cuidadosamente dos arcos, com auxílio de um bisturi, padronizando o local do corte para evitar possível conteúdo proteico falsamente elevado (figura 9). Os filamentos branquiais foram armazenados individualmente em

temperatura de -70°C . O coração, o esôfago e o cérebro foram armazenados em pool de 4 em temperatura de -70°C .

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ARCO E DOS FILAMENTOS BRANQUIAIS



FONTE: A autora

As amostras foram processadas como segue a baixo:

a) no momento da análise, as amostras foram descongeladas em temperatura de 4°C e homogeneizadas em tampão SEI pH 7.4, na proporção de 1mg de proteína por mL de tampão, com homogeneizador automático Potter – Elvehjem:

- tampão SEI:

0,3 M sacarose

0,1 mM Na_2EDTA

30 mM imidazol

10 mM de β -Mercaptoetanol para preservar a atividade;

- b) o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g durante 5 min à 4°C;
- c) o sobrenadante foi transferido para um eppendorf e seu volume medido;
- d) foi adicionada ao sobrenadante uma solução de saponina (0,2 mg de saponina. mg de proteína⁻¹), para aumentar a sensibilidade ao substrato;
- e) o material resultante foi utilizado para verificar a atividade da Na⁺K⁺-ATPase e a quantidade de proteína.

3.5.3 Músculo Esquelético

O músculo axial dos cascudos foi utilizado para a medida da atividade da ChE, os quais estavam armazenados em freezer convencional. O procedimento para a homogeneização do músculo segue a baixo:

- a) as amostras foram descongeladas em gelo;
- b) 250 mg do músculo foram adicionadas em frasco para homogeneização com 2 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7.5 (1 mg de proteína/ mL de tampão);
- c) as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador automático Potter - Elvehjem e transferidas individualmente para eppendorf;
- d) o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g a 4°C durante 10 min;
- e) o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a – 20°C para análise de proteína e da atividade da colinesterase.

3.6 ANÁLISES ENZIMÁTICAS

3.6.1 Medida do Citocromo P450 Total

A medida do CYP450 total foi baseada nos métodos de OMURA e SATO (1964) e CUNHA BASTOS, et al., (1989), fundamentados no princípio de que o CYP450, na sua forma reduzida, complexa com o monóxido de carbono (CO), produzindo um composto que absorve luz em 450nm. A amostra reduzida é oxidada e um espectro diferencial entre as duas é medido espectrofotometricamente. O protocolo para medida do citocromo P450 total segue a baixo:

- a) as amostras foram diluídas com tampão de ressuspensão diretamente em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico (1 mg de proteína. mL⁻¹);
- b) foi adicionado à amostra na cubeta 50 µL de fenasina metassulfato 20 µM e 50 µL de ascorbato de sódio 2 mM;
- c) a este conteúdo foi borbulhado levemente monóxido de carbono, durante 30 segundos;
- d) a amostra foi colocada no espectrofotômetro Beckman DU-650 e escaneada entre os comprimentos de onda de 400 e 650 nm, para registrar a curva de referência;
- e) após o registro da curva da amostra reduzida, foram adicionados alguns cristais do agente oxidante ditionito de sódio;
- f) a amostra foi misturada por inversão e recolocada no espectrofotômetro para a nova leitura.

Para cada amostra, foram realizadas três leituras consecutivas, com intervalo de 1 minuto. Para o cálculo, utilizou-se a média das três leituras. O resultado representa a diferença entre o espectro reduzido e complexado com CO e o espectro oxidado.

3.6.1.1 Cálculo do citocromo P450 total

Para calcular a quantidade do citocromo P450 total, utilizamos a diferença entre as absorbâncias em 450 nm e 490 nm, com base no coeficiente de extinção de

91cm⁻¹mM⁻¹:

$$\text{CYP450 total (nmol.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbância 450} - \text{absorbância 490} \times 1000}{91}$$

A quantidade de CYP450 total específica foi assim calculada:

$$\text{CYP450 total (nmol.mL}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}\text{)} = \frac{\text{nmol.mL}^{-1} \times D}{[\text{proteína}]}$$

considerando:

D= fator de diluição da amostra

[proteína]= quantidade de proteína na amostra (mg. mL⁻¹)

3.6.2 Medida da Atividade da EROD

A atividade da EROD foi medida segundo o método de BURKE e MAYER (1974), modificado por SILVA DE ASSIS (1998) e adaptado às nossas condições laboratoriais. O princípio do método consiste na detecção fluorimétrica do produto final (resorufina), depois de uma reação de oxigênio-desetilação. A medida da intensidade da fluorescência corresponde à soma da resorufina produzida por unidade de tempo e é equivalente a atividade do CYP450 da amostra. A reação foi medida no espectrofluorímetro Shimadzu e calculada usando a curva do padrão externo ou curva de calibração.

3.6.2.1 Preparo da solução de resorufina

Um cristal de resorufina (PM=235.17) foi dissolvido em metanol, em frasco envolto com papel alumínio (fotossensível). Quando o cristal estava totalmente dissolvido, determinamos a concentração exata da solução espectrofotometricamente,

assumindo ϵ ($\lambda = 572 \text{ nm}$, pH 8.0) = $73 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$A = c \cdot \epsilon \cdot d$ onde

A = absorvância

c = concentração

ϵ = coeficiente de extinção molar

d = caminho óptico (1 cm)

A partir desta solução, preparamos uma solução de resorufina $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para a realização da curva de calibração ou do padrão externo de 0 a $1,4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de resorufina.

3.6.2.2 Preparo da solução de 7-etoxiresorufina

Um cristal de 7-etoxiresorufina (7 ER, PM = 241,2) foi dissolvido em metanol em frasco envolto com papel alumínio (fotossensível).

A concentração da solução de 7 ER foi determinada por espectrofotômetro, assumindo ϵ ($\lambda = 482 \text{ nm}$, pH 8.0) = $22,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

A partir desta solução, preparamos uma solução $2,6 \mu\text{M}$ de 7 ER em tampão Tris-NaCl $0,1 \text{ M}$ pH 7.5 para a análise da atividade da EROD.

3.6.2.3 Ensaio da atividade da EROD

Os procedimentos para a medida da atividade da EROD foram os seguintes:

- a) no momento da análise, uma das frações foi descongelada (a frações S_9 ou a microssomal) sob o gelo;
- b) a amostra ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi pipetada na própria cubeta do equipamento e em seguida, adicionou-se a solução de 7 ER $2,6 \mu\text{M}$ em tampão pH 7.5, até completar o volume final da cubeta de $500 \mu\text{L}$;
- c) o conteúdo da cubeta (branco da reação) foi incubado a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min

- no espectrofluorímetro Shimadzu;
- d) após o período de incubação, imediatamente adicionamos 30 μL de NADPH 2,6 mM, iniciando a reação;
 - e) a reação foi lida no comprimento de onda de excitação de 530 nm e de extinção de 590nm, com abertura da fenda da luz de 3mV durante 15min;
 - f) a concentração da resorufina de cada amostra foi calculada pela média de duas medidas.

3.6.2.4 Cálculo da atividade da EROD

A partir da curva de calibração obtivemos, pela regressão linear, a equação da reta:

$$y = ax + b$$

$$F = m \cdot \text{concentração (}\mu\text{mol/cubeta)} + b$$

Onde:

F = fluorescência

b = 0

m = declive da curva (“slope”)

O cálculo da atividade (em $\mu\text{mols resorufina formada}\cdot\text{min}^{-1}/\text{cubeta}$) foi obtido pela divisão do $\Delta F \cdot \text{min}^{-1}$ pelo slope m da curva de calibração:

$$\text{atividade} = \frac{\Delta F \cdot \text{min}^{-1}}{m}$$

O cálculo da atividade específica foi obtido pela seguinte equação:

$$\text{atividade específica (}\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1}) = \frac{\text{atividade}}{V_A/V_T \times C}$$

onde: VA = volume da amostra (em μL)
 VT = volume total na cubeta (em μL)
 C = quantidade de proteína (em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

3.6.3 Medida da Atividade da Na^+K^+ -ATPase

A medida da atividade da Na^+K^+ -ATPase foi analisada pelo método de QUABIUS, BALM, e WENDELAAR BONGA, 1997, o qual baseia-se na medida da formação do fosfato inorgânico, à medida que a enzima hidrolisa o ATP.

Em cada cavidade da microplaca, sobre frasco com gelo, foi adicionado:

- a) 10 μL amostra diluída para 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;
- b) em seguida, foram adicionados 100 μL de tampão Na^+K^+ -ATPase “A”

ou “B” pH 7,4:

- tampão Na^+K^+ -ATPase “A”:

30 mM imidazol

100 mM NaCl

5 mM MgCl_2

13 mM KCl

0,1 mM Na_2EDTA

3 mM ATP;

- tampão Na^+K^+ -ATPase “B”:

30 mM imidazol

100 mM NaCl

5 mM MgCl_2

2,5 mM de ouabaína

0,1 mM Na_2EDTA

3 mM ATP;

- c) a amostra foi incubada a 25°C durante 45 min no escuro (ocorreu a formação de fosfato inorgânico);
- d) após o tempo de incubação, foram adicionados 200 µL do reagente de cor gelado;
- reagente de cor:
- é uma mistura 1:1 de ATC 8,6 % (interromper a reação) e do reagente de cor propriamente dito: 0,66 mM de H₂SO₄ (97%); 9,2 mM molibdato de amônia e 0,33 mM Fe₂SO₄. 7H₂O;
- e) a leitura foi realizada em espectrofotômetro 2 min após a adição do reagente de cor, em filtro de 620 nm.

Cada amostra foi analisada em triplicata sendo: 3 com cloreto de potássio e 3 sem cloreto de potássio, mas com ouabaína.

Como branco da reação, utilizou-se água e, como padrão, fosfato de cálcio 1620 µM.

3.6.3.1 Cálculo da atividade

A atividade enzimática foi calculada com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Abs. KCl} - \text{Abs. ouabaína}}{\text{Abs. padrão}} \times \text{concentração padrão} \times \frac{1}{\text{conc. proteína}} \times \frac{\text{tempo de incubação}}{60 \text{ min}}$$

Concentração do padrão = 1620 µM

Quantidade de proteína = mg.L⁻¹

Unidade = µM Pi. mgproteína⁻¹. h⁻¹

3.6.4 Medida da Atividade da ChE

A atividade da ChE foi medida segundo o método de ELLMAN et al., (1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998). É baseado na hidrólise da

acetilcolina pela ChE, originando colina que, combinando-se com DTNB (5,5' – Ditio – bis – 2 – nitrobenzoato), produz um composto de coloração amarela, medido em espectrofotômetro. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro da marca Tecan (doação do DAAD, serviço de intercâmbio alemão).

O procedimento para a medida da atividade foi o seguinte:

- a) o homogeneizado foi diluído em água destilada (1 mg.mL^{-1}) e pipetado $50 \mu\text{L}$ nas cavidades da microplaca (quatro repetições);
- b) em seguida, foi adicionado $200 \mu\text{L}$ do DTNB (5,5' – Ditio – bis – 2 – nitrobenzoato), preparado a $0,75 \text{ mM}$ em tampão fosfato e pH 7,5;
- c) $50 \mu\text{L}$ do substrato acetilcolina, preparado a 9 mM , foram acrescentados a cada amostra, iniciando a reação;
- d) imediatamente após a adição do substrato, foram realizadas as leituras da absorbância no espectrofotômetro em 415 nm , durante 3 min .

3.6.4.1 Cálculo da atividade da ChE

Foi baseado na equação de Lambert-Beer:

$$A = c \cdot \epsilon \cdot d$$

A = absorbância (OD)

c = concentração

ϵ = coeficiente de extinção molar

$$(1,36 \cdot 10^4 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

d = caminho óptico ($0,9 \text{ cm}$)

Assim:

$$c \text{ ou } \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{(\text{delta OD} \cdot \text{min}^{-1}) \times 1000}{(13,6 \times 0,9)}$$

A atividade específica pode ser calculada pela fórmula:

$$\text{atividade específica (nmol. min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{c}{VA/VT \cdot p}$$

VA = volume da amostra (50 μL)

VT = volume final da reação (300 μL)

p = concentração de proteína contida na amostra (mg.mL^{-1})

3.7 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA

Para medir a quantidade de proteína de todas as amostras, utilizamos o método de BRADFORD (1976), com curva padrão de soro albumina bovina.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação entre os grupos, os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via, seguida da Prova de Tukey.

A correlação entre parâmetros como comprimento, peso e atividade enzimática da ChE, e entre a atividade da EROD na fração S₉ e na fração microsomal, utilizamos a correlação de Pearson.

4 RESULTADOS

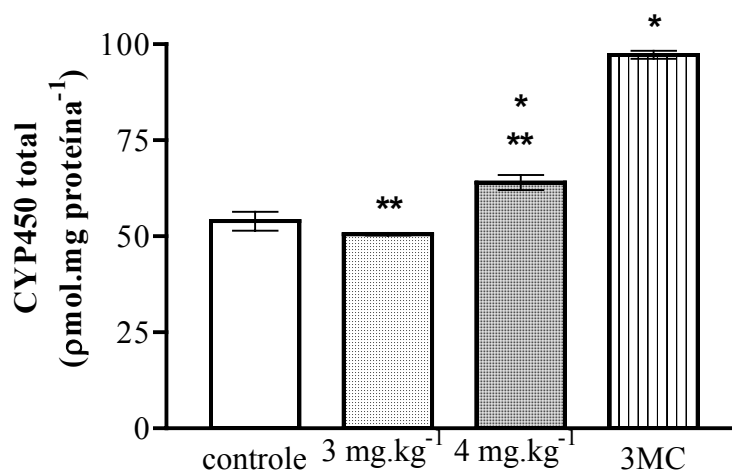
4 RESULTADOS

4.1 CITOCROMO P450 TOTAL

O citocromo P450 total, analisado na fração microsomal do fígado, foi induzido pela deltametrina nos animais expostos por 96 horas à dose de 4 mg.kg^{-1} , como observado na figura 10. O valor da quantidade total de $65,96 \pm 2 \text{ pmol.mg proteína}^{-1}$ foi significativamente maior que o grupo controle, que foi de $56,3695 \pm 3 \text{ pmol.mg proteína}^{-1}$.

O grupo que foi tratado com o composto 3MC (controle positivo) também apresentou aumento da concentração do CYP450 total.

FIGURA 10 - QUANTIDADE DO CITOCROMO P450 TOTAL.



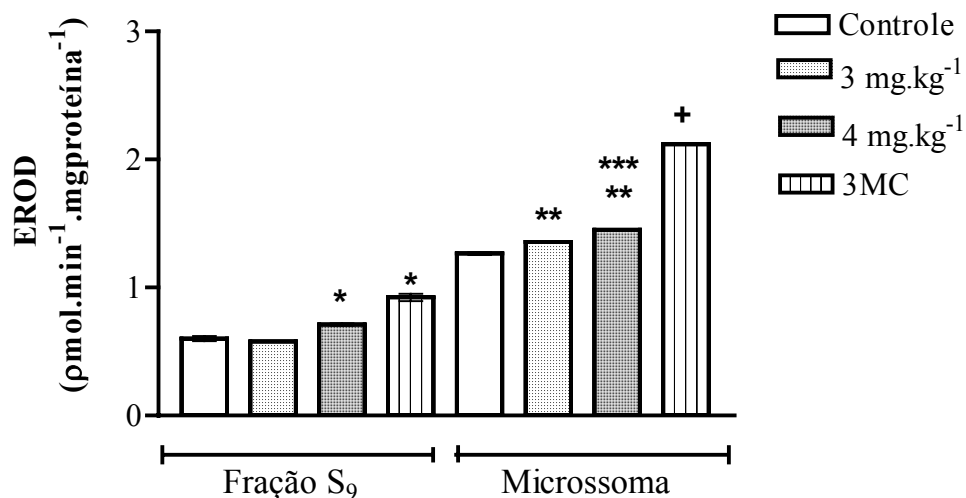
NOTA: * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e ** $p < 0,001$ em relação ao 3MC (ANOVA).

4.2 ATIVIDADE DA EROD

Os resultados observados neste trabalho demonstram que a atividade da EROD da espécie *Ancistrus multispinnis* foi induzida pela deltametrina nas doses de 3 e 4 mg.kg^{-1} na fração microsomal do fígado. Na fração S₉, apenas foi detectada

indução na dose de 4 mg.kg⁻¹ (figura 11).

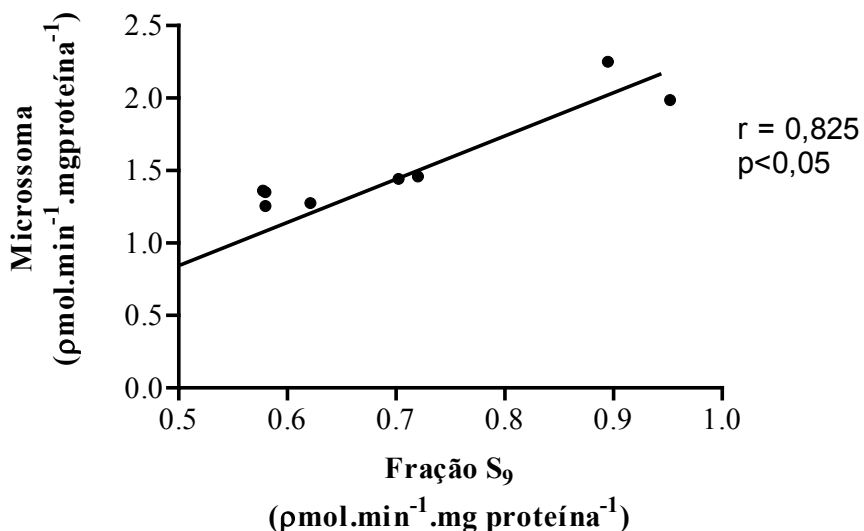
FIGURA 11 - ATIVIDADE DA EROD NA FRAÇÃO S₉ E NA FRAÇÃO MICROSSOMAL.



NOTA: * p < 0,01= em relação ao controle de S₉ ** p < 0,001= em relação ao controle do microsoma
 *** p < 0,01= em relação a deltametrina 3 mg.kg⁻¹ no microsoma e + p < 0,01= em relação ao controle do microsoma (ANOVA).

A figura 12 nos mostra a correlação positiva entre a atividade da EROD entre nas frações S₉ e microsomal.

FIGURA 12 - CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE DA EROD NA FRAÇÃO S₉ E NA FRAÇÃO MICROSSOMAL (correlação de Pearson).

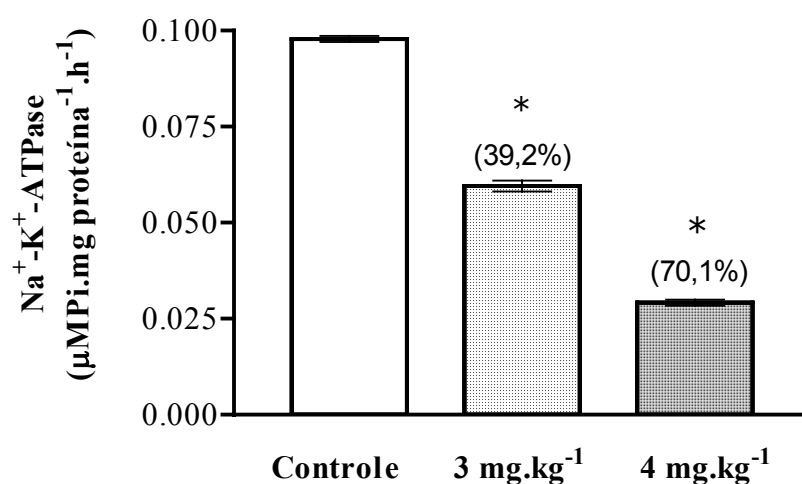


4.3 ATIVIDADE DA Na⁺K⁺-ATPase

As figuras 13, 14 e 15 mostram os resultados da atividade da Na⁺K⁺-ATPase.

A figura 13 mostra que a Na⁺K⁺-ATPase foi inibida pela deltametrina nas doses de 3 e 4 mg.kg⁻¹, em esôfago de *Ancistrus multispinnis* (figura 13). A porcentagem de inibição está representada na figura com o valor entre parênteses.

FIGURA 13 - ATIVIDADE DA Na⁺K⁺-ATPase NO ESÔFAGO DE *Ancistrus multispinnis*. * p<0,05 (ANOVA)



A figura 14 mostra a atividade da Na⁺K⁺-ATPase no coração de *Ancistrus multispinnis*, a qual foi inibida pela deltametrina nas duas doses testadas. A porcentagem de inibição está representada na figura com o valor entre parênteses.

A figura 15 mostra que a atividade da Na⁺K⁺-ATPase nas brânquias de *Ancistrus multispinnis*, foi inibida pela deltametrina na dose de 4 mg.kg⁻¹. A porcentagem de inibição está representada na figura com o valor entre parênteses.

FIGURA 14 - ATIVIDADE DA Na^+K^+ -ATPase NO **CORAÇÃO** DE *Ancistrus multispinnis*. * $p < 0,05$ (ANOVA)

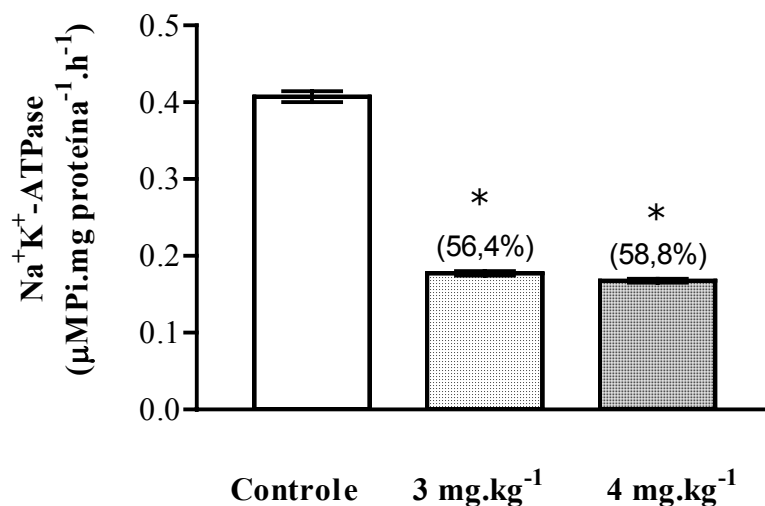
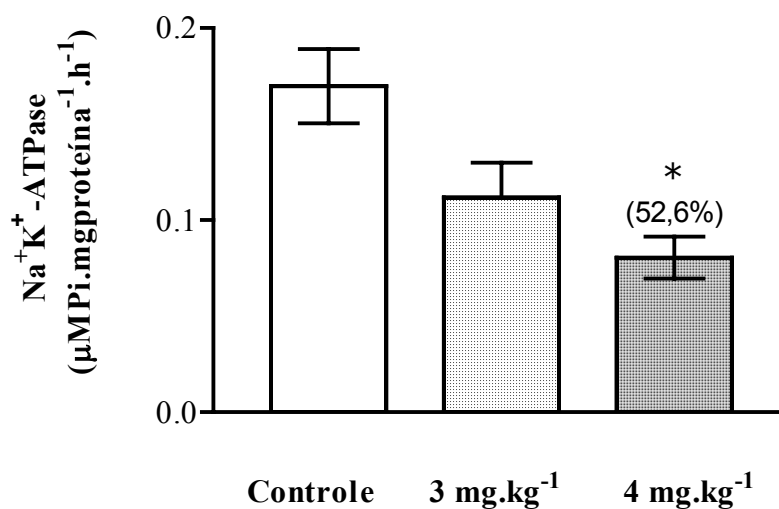
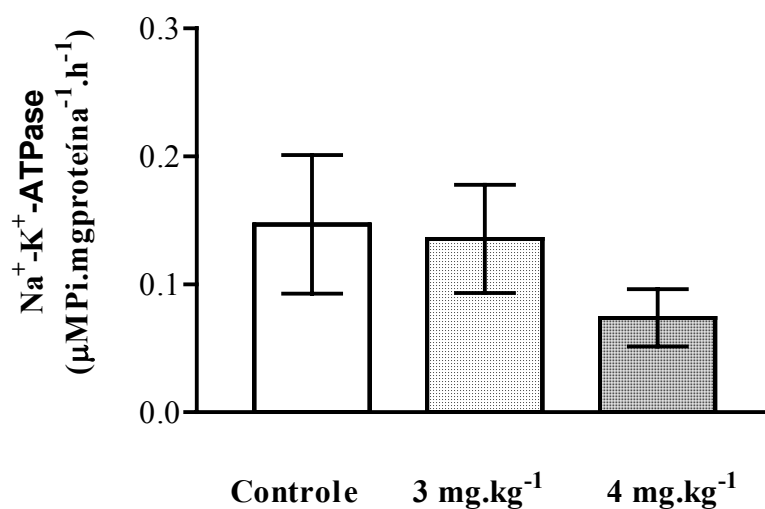


FIGURA 15 - ATIVIDADE DA Na^+K^+ -ATPase NAS **BRÂNQUIAS** DE *Ancistrus multispinnis*. $p < 0,05$ (ANOVA)



A figura 16 mostra que a atividade da enzima no cérebro não foi alterada nos peixes intoxicados com deltametrina, em nenhuma das doses testadas.

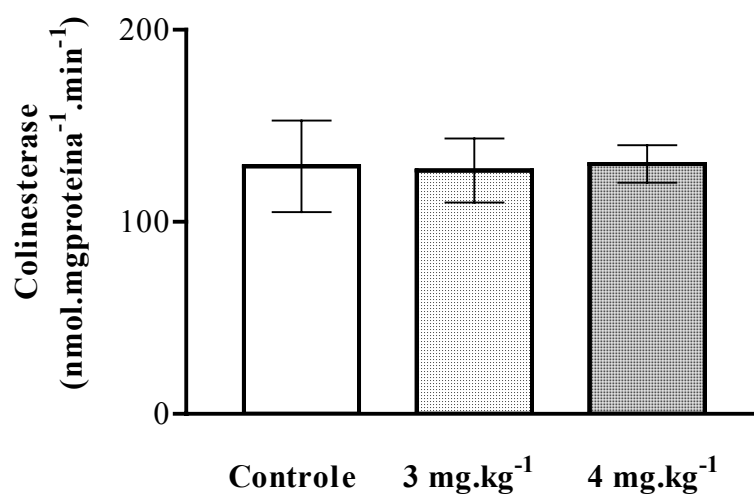
FIGURA 16 - ATIVIDADE DA Na^+K^+ -ATPase NO **CÉREBRO** DE *Ancistrus multispinnis*.



4.4 ATIVIDADE DA COLINESTERASE

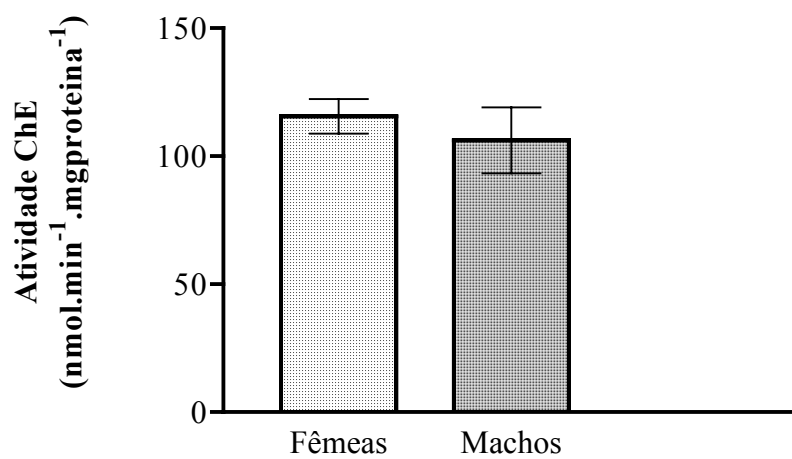
Os resultados observados neste trabalho demonstram que a atividade da colinesterase de tecido muscular da espécie *Ancistrus multispinnis* não sofreu alteração nas duas doses de deltametrina testadas em relação ao grupo controle, como mostra a figura 17.

FIGURA 17 - A ATIVIDADE DA ChE DE MÚSCULO ESQUELÉTICO EM *Ancistrus multispinnis*.



A figura 18 mostra que há correlação negativa entre o peso corporal dos

FIGURA 20 - ATIVIDADE COLINESTERÁSICA EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DA ESPÉCIE *Ancistrus multispinnis* DE ACORDO COM O SEXO.



5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 EFEITOS DA DELTAMETRINA NO CITOCROMO P450

Os resultados mostraram que a deltametrina induziu a quantidade total do CYP450 e a atividade catalítica expressada pela EROD, nos cascosos que foram intoxicados via intracelomática por 96 horas.

O CYP450 (e em particular a indução deste sistema) é um dos biomarcadores mais estudados no ambiente aquático por ser um sistema de enzimas altamente sensíveis e específicas a grupos de contaminantes orgânicos, como por exemplo, os PAHs (STEGEMAN; HAHN, 1994). A exposição a produtos química indutores conduz a uma estimulação seletiva, mediada pelo receptor Ah, da transcrição do gene CYP1A, resultando no aumento do nível do RNAm específica nova síntese das isoenzimas do CYP1A, e um aumento na respectiva atividade catalítica (por exemplo, EROD). Assim, a indução pode ser medida pela quantidade total da enzima, pela atividade enzimática e a pela de síntese de RNAm, uma complementando a outra (POLAND; GLOVER, 1987; GUENGERICH; MACDONALD, 1990; WHITLOCK, 1990; STEGEMAN; HAHN, 1994).

Compostos com estrutura molecular planar como PCDDs, PAHs são os mais estudados e caracterizados compostos indutores deste sistema (STEGEMAN; HAHN, 1994). O mecanismo baseado na relação indução/estrutura química do composto ainda não é conhecido. A indução está relacionada pelo menos parcialmente com a relação estrutura/atividade na ligação com o receptor. Este tipo de mecanismo não tem sido muito definido nas espécies aquáticas. Nos mamíferos, a ligação da substância ao receptor não é o suficiente para a indução ocorrer, alguns compostos ligam, mas não produzem complexos receptor-efetor. Há a necessidade de se definir os eventos

celulares relacionados com a captação de várias estruturas para resultar na resposta de indução, e a necessidade de testar outros produtos como indutores de CYP1A (STEGEMAN; HAHN, 1994). Devido à estrutura da deltametrina não ser similar a dos PCDDs e PAHs, por exemplo, o mecanismo de ação da indução do CYP1A não pode ser explicado baseado na relação indução-estrutura química da deltametrina. Porém, outros estudos também observaram o aumento do CYP1A1/1A2 e da atividade da EROD pela deltametrina em fígado e cérebro de ratos Wistar (DAYAL et al., 1999), mas não explicaram o mecanismo desta indução. Desse modo mais estudos deverão ser realizados para pesquisar o mecanismo de indução da deltametrina.

A medida da quantidade total do CYP450, embora frequentemente utilizada e de fácil determinação, é menos sensível à indução do que isoenzimas especificamente induzíveis ou suas respectivas atividades. Em alguns trabalhos, a quantidade do CYP450 total permaneceu inalterada, enquanto CYP1A e/ou a sua atividade correspondente foi significativamente induzida como resultado da exposição à contaminação (PAYNE et al., 1987; ELSKUS; STEGEMAN, 1989). Em nosso estudo, a quantidade total do CYP450 foi induzida apenas pela dose de 4 mg.kg⁻¹ da deltametrina, enquanto que a atividade da EROD foi induzida também pela dose de 3 mg.kg⁻¹, possivelmente devido a maior sensibilidade de indução da EROD ou maior sensibilidade na medida da atividade.

A quantidade do CYP450 total também se torna menos sensível quando compostos simples atuam como indutores de algumas isoenzimas específicas inibindo, porém outras. Isto pode resultar em uma considerável alteração do conteúdo ou atividade da isoenzima, sem afetar a quantidade total do CYP450 (MIRANDA et al., 1990).

A atividade catalítica, determinada principalmente como atividade da EROD, também é um método simples quando comparado com medida do nível do RNAm, e vários autores consideram a atividade da EROD, quando parâmetro de indução, quantitativamente mais sensível que a medida do conteúdo proteico de CYP1A por

imunoquantificação (ELISA ou *immunoblotting*). A imunoquantificação, porém, tem a vantagem de ser aplicada em amostras de baixa qualidade, como, por exemplo, amostras desnaturadas (STEGEMAN; HAHN, 1994).

Fatores bióticos e abióticos, não relacionados ao poluente, podem afetar o estado do CYP450 e podem interferir nos métodos analíticos. Os mecanismos e o grau dos efeitos destes fatores em diferentes espécies ainda não está esclarecido (STEGEMAN; HAHN, 1994). Para detectar a indução do CYP450 pela deltametrina, foi necessária a padronização dos métodos, considerando as características bioquímicas do *Ancistrus multispinis*, e as condições laboratoriais. KLEMZ, 2002, trabalhando com a mesma espécie de animais, padronizou o método para a quantidade de CYP450 total, o qual foi adotado neste estudo. Na padronização, o autor utilizou o composto 3MC como controle positivo, o qual mostrou-se um indutor de CYP1A na espécie *Ancistrus multispinis*, comprovado também pelo método de *western blot*. O 3MC também se mostrou um indutor do CYP450 neste estudo, e foi utilizado como controle positivo na análise do CYP450 total e na atividade da EROD.

Os principais fatores bióticos que consideramos na padronização dos métodos foram a temperatura, o tamanho do animal e a condição nutricional da espécie. Os peixes neste trabalho foram aclimatados à temperatura laboratorial por um mês, e mantidos assim durante o experimento para evitar influenciar a toxicidade da deltametrina. Correlações inversas têm sido encontradas entre o nível de CYP1A (atividade da EROD ou proteína CYP1A) e a temperatura, podendo mascarar o efeito do poluente. Os peixes sintetizam mais enzimas para compensar a perda da temperatura corporal, e atividade enzimática declina com a temperatura (GOKSØYR; FORLIN, 1992). O tamanho do animal reflete a idade do animal e o estágio de maturação sexual. Selecionamos animais jovens, machos e fêmeas fora do período reprodutivo, já que o estradiol é um regulador da atividade monooxigenase, alterando o conteúdo e/ou a atividade de vários CYP450. Estudos confirmaram a supressão do CYP1A pelo estradiol por um mecanismo desconhecido. Quanto ao estado nutricional,

este é um fator que também pode afetar a atividade das enzimas de detoxificação dos peixes. Peixes com estado nutricional prejudicado revelaram significativa redução da atividade da EROD. Entretanto, poluentes podem induzir a atividade do CYP1A em peixes com moderada desnutrição (GEORGE; HENDERSON, 1992). Assim, na aclimação laboratorial, os peixes foram condicionados à alimentação com ração à base de algas, mantendo uma boa nutrição.

Métodos para a coleta, processamento e armazenamento das amostras de fígado também foram padronizados. O fígado foi rapidamente coletado, rinsado em tampão e armazenado em nitrogênio líquido. A atividade do CYP450 diminui e aumenta a variabilidade cerca de 15 min após a retirada do órgão, dependendo da temperatura externa. A contaminação com bile ou hemoglobina pode interferir com as leituras de fluorescência e com o espectro do CYP450 ou até mesmo inibir o CYP450 (HODSON et al., 1991). Uma simples precaução que adotamos após a dissecação do fígado foi rinsá-lo imediatamente no tampão de homogeneização para remover traços de sangue e bile.

Testamos a atividade da EROD em duas frações da amostra homogeneizada: o sobrenadante pós-mitocondrial, também chamado fração S₉ e o depósito de microssoma, ou microssoma.

O interesse em testar a atividade nas duas frações foi analisar se haveria correlação entre a atividade da EROD na fração S₉ e entre a atividade da EROD no microssoma. Nossos resultados mostraram que é possível quantificar a atividade tanto na fração S₉, quanto na microssomal, já que nas duas verificamos a possível indução da enzima, obtendo boa correlação entre as frações, embora não tenhamos detectado indução da EROD na dose de 3 mg.kg⁻¹ de deltametrina na fração S₉.

Vários protocolos recomendam o uso da fração microssomal, pois durante o processo de ultracentrifugação, boa parte das proteínas inespecíficas seria eliminada e exerceria menor interferência na medida da EROD. Outros sugerem o uso da fração S₉, já que encontraram boa correlação entre as análises no microssoma e S₉. Em

experimentos com a espécie de peixe *Limanda limanda*, EGGENS et. al., (1992) encontrou uma alta correlação ($r = 0,97$, $p < 0,001$) entre os resultados da atividade da EROD nas duas frações. A utilização da fração S₉ em programas de biomonitoramento ambiental facilita a medida do CYP1A, por dispensar ultracentrifugação e diminuir etapas técnicas, desde que a amostra esteja padronizada.

A detecção da indução do CYP450 pela deltametrina, após padronização metodológica, indica uma resposta adaptativa do animal e pode resultar em maior metabolismo e excreção do pesticida. Embora a detoxificação seja essencial para o animal, o CYP450 também pode estar envolvido em vários mecanismos de intoxicação. Alguns pré-tóxicos, pré-mutagênicos e pré-carcinogênicos são convertidos por este sistema em produtos mais reativos e tóxicos. Distúrbios do ciclo catalítico do P450 podem levar à produção de radicais livres, eles mesmos são tóxicos e mutagênicos (STEGEMAN; HAHN, 1994). O aumento da atividade do CYP1A pode alterar o perfil dos hormônios esteróides, pode mudar o metabolismo de tiroxina e vitamina A, alterar o sistema reprodutivo e imune, e aumentar a prevalência de doenças (MUNKITTRICK et al., 1991).

A ocorrência simultânea de efeitos adversos e a indução do CYP450 indicam que as medidas da indução justificam os estudos além do impacto biológico. A indução é uma das mais fáceis e mais sensíveis respostas para se detectar. Se a indução for evitada, presumivelmente outras respostas biológicas mediadas pelo xenobiótico também serão evitadas. Se a indução é detectada, são necessários estudos mais detalhados sobre a sobrevivência, crescimento, reprodução e bioacumulação do indutor na comunidade dos peixes no local da exposição.

O conceito de que a exposição a baixas concentrações de poluentes ambientais afeta primeiramente os níveis mais baixos da organização biológica (molecular e subcelular) e, que concentrações elevadas afetam níveis mais altos, tem sido um motivo para várias investigações. Com o aumento da concentração do xenobiótico, a indução do P450 é aumentada. Entretanto, altos níveis de contaminação

podem inibir a atividade da enzima (inibição competitiva enquanto, freqüentemente, o conteúdo proteico permanece alto (HAHN et al., 1994). Eventualmente, a capacidade enzimática para detoxificação é perdida, e efeitos histopatológicos (os quais podem parcialmente ser causados pela biotransformação de substâncias inativas em ativas) começam a ser evidentes. Neste estágio, o conteúdo e a atividade enzimática pode ser novamente alterado devido ao desequilíbrio da função das células e de todo o órgão) (CURTIS et al., 1993).

5.2 EFEITOS DA DELTAMETRINA NA ATIVIDADE DA $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPASE

A atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase também foi um biomarcador bioquímico utilizado para verificar o efeito subletal da deltametrina. Neste estudo, a deltametrina inibiu a atividade desta enzima em vários órgãos estudados (brânquias, coração e esôfago) no *Ancistrus multispinnis*. O coração e as brânquias foram os órgãos mais sensíveis para detectar a contaminação pela deltametrina pois, a atividade da enzima nos órgãos dos animais controles foi maior e a inibição pela deltametrina foi maior nos animais intoxicados. Esta inibição pode resultar na inibição do transporte de íons sódio através da membrana, desregulando o balanço iônico da célula, podendo causar danos irreversíveis no tecido.

Há poucos estudos relatando a influência de piretróides na atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase em peixes. Cipermetrina, também um piretróide tipo II, causou inibição da atividade da ATPase do cérebro, fígado e rim de carpas *Labeo rohita*, expostas via hídrica à dose de 0,014 ppm durante 45 dias (DAS; MUKHERJEE, 2003). Em *Cyprinus carpio* a atividade desta enzima foi inibida pelo fenvalerato, também um pesticida piretróide, nas brânquias, cérebro, músculo esquelético e fígado (REDDY; PHILIP, 1991). Em nosso estudo, não observamos inibição da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase do cérebro, nas doses de deltametrina testadas. Este resultado pode ser devido a diferentes isoformas da enzima em diferentes tecidos e especificamente, por

diferentes isoformas da subunidade α (3 tipos já caracterizados em alguns peixes), responsável pela atividade catalítica. As isoformas da subunidade α da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase podem ter diferentes distribuições de acordo com o tecido e diferentes afinidades pelo substrato (íon) e pela ouabaína (BLANCO; MERCER, 1998), além de diferentes vias de regulação hormonal e ou por proteínas quinases (THERIEN; BLOSTEIN, 2000).

É importante ressaltar que mesmo administrando o tóxico via intracelomática, houve inibição da enzima nas brânquias. Como as brânquias constituem cerca de 90% da área da superfície corpórea dos peixes, e estão em contato íntimo com a água ambiental, elas são os alvos primários para poluentes aquáticos (MCDONALD; WOOD, 1993). Sendo uma enzima essencial para controlar o balanço de íons das células e, conseqüentemente, atuar na homeostase de vários mecanismos endócrinos e também na liberação de neurotransmissores, possibilita detectar efeitos precoces no organismo, antes que a contaminação persistente prejudique os sistemas vitais.

5.3 EFEITOS DA DELTAMETRINA NA ATIVIDADE DA CHE

Nos experimentos realizados, a atividade da colinesterase de músculo esquelético de *Ancistrus multispinnis* não sofreu inibição, quando estes foram expostos as duas doses de deltametrina. Embora não tenhamos encontrado nenhum dado na literatura sobre estudos da atividade da colinesterase e efeitos da deltametrina em cascudos, efeitos de inibição da colinesterase têm sido determinados previamente para piretróides (REDDY; PHILIP, 1994; SZEGLETES et al., 1995a) incluindo cipermetrina e deltametrina (BÁLINT et al., 1995; REDDY; PHILIP, 1994; SZEGLETES et al., 1995a). SZEGLETES et al., 1995b, realizou o estudo dos efeitos *in vivo* da exposição a deltametrina ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$ em água 12°C por 3 dias) na atividade e distribuição das formas moleculares da acetilcolinesterase de carpas (*Cyprinus carpio* L.). Diferentes órgãos foram examinados (cérebro, coração, fígado e músculo

esquelético) e o sangue e, a atividade da enzima diminuiu mais que 20% quando medida no plasma. Além do mais, sabemos que pode haver variações na quantidade ou na isoforma da enzima de acordo com o órgão.

A atividade da enzima também mostrou que a correlação entre o peso (g) e o tamanho (cm) corporais pela atividade da colinesterase é negativa, corroborando com os dados encontrados por KLEMZ (2002), que estudou cascudos contaminados com endossulfano. Resultados semelhantes também foram encontrados por LUNDIN (1962), que avaliou a atividade desta enzima em diversos peixes, tanto de água doce como de água salgada. O autor concluiu que a atividade da enzima em músculo esquelético obedeceu a uma relação inversa do comprimento corporal das espécies por ele investigadas.

Estes resultados podem ser explicados porque as colinesterases parecem ser formadas em taxas mais elevadas nas fases iniciais de desenvolvimento. Uma atividade máxima é atingida após um certo período, depois do qual, a diminuição contínua da atividade enzimática passa a acompanhar, progressivamente, o aumento do tecido muscular (SAWYER, 1944).

Em bioensaios ou em programas de biomonitoramento, onde é necessária a comparação da atividade enzimática dos peixes coletados em locais diferentes e em diferentes estações do ano, estas informações se tornam relevantes para aumentar a confiabilidade dos resultados.

Quanto ao sexo dos animais, não encontramos nenhuma diferença na atividade da colinesterase em machos e em fêmeas. Estes resultados estão em concordância com estudos realizados por SILVA DE ASSIS, (1998), o qual não observou diferença na atividade entre machos e fêmeas, igualmente com KIRBY et al. (2000) que, na espécie *Platichthys flesus*, também não encontrou diferenças entre os sexos.

Analisando os resultados em conjunto, observamos que a deltametrina altera o equilíbrio das funções bioquímicas em *Ancistrus multispinnis*, mesmo em concentrações subletais. Portanto, o impacto da deltametrina causado nos

biomarcadores estudados faz deste inseticida um importante contaminante para espécies aquáticas, implicando assim no seu monitoramento.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A quantidade de CYP450 total da espécie *Ancistrus multispinnis* foi induzida pela deltametrina nas condições experimentais apresentadas.

Para a análise da atividade da EROD, a fração microssomal ou a fração S₉ podem ser utilizadas.

A deltametrina induziu a atividade da EROD nos peixes intoxicados via intracelomática, nas condições laboratoriais padronizadas.

A Na⁺K⁺-ATPase foi inibida pela deltametrina nas brânquias, no esôfago e no coração, com exceção do cérebro, nas condições experimentais estudadas;

As brânquias e o coração foram os órgãos mais sensíveis para detectar a inibição da Na⁺K⁺-ATPase pela deltametrina na espécie *Ancistrus multispinnis*;

A deltametrina não causou inibição da atividade colinesterásica na espécie *Ancistrus multispinnis*, nas condições experimentais apresentadas;

A atividade colinesterásica apresentou correlação negativa com o peso e com o comprimento corporal dos peixes e não houve variação entre os sexos;

Os biomarcadores estudados detectaram os efeitos subletais causado pela deltametrina no *Ancistrus multispinnis*, intoxicados via intracelomática, e podem ser empregados em biomonitoramento.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABOU-DONIA, M. B.; MENZEL, D.B. Fish brain cholinesterase: it's inhibition by carbamates and automatic assay. **Comparative Biochemical Physiology**. v. 21, p. 99-108, 1967.

AHEARN, G.A.; DUERR, J.M.; ZHUANG, Z.; BROWN, R.J.; ASLAMKHAN, A.; KILLEBREW, D.A. Ion transport processes of crustacean epithelial cells. **Physiology Biochemistry Zoology**. v. 72, p. 1-18, 1999.

ANADON, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M. R.; FERNANDEZ-CRUZ, M. L.; DIAZ, M. J.; FERNANDEZ, M. C.; MARTINEZ, M. A. Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-OH-metabolite in the rat. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 141, p. 8-16, 1996.

BABU, P. R. A.; REDDY, G. R.; BABU, G. R.V. & CHETTY, C. S. Recovery of Benthocarb-Inhibited AChE in fish brain: na in vitro study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 17, p. 317-322, 1989.

BALINT, T.; SZEGLETES, Z.; SZEGLETES. Zs.; HALASY, K.; NEMCSÓK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorous metidation and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatatic Toxicology** v. 33, p. 279-295, 1995.

BARLOW, S. M; SULLIVAN, F. M.; LINES, J. Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. **Food and Chemical Toxicology**. v. 39, p. 407-422, 2001.

BLANCO, G. ; MERCER, R. W. Isozymes of the Na⁺K⁺ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal Physiology**. v. 275, p. 633-650, 1998.

BRADBURY, J. E.; FORSHAW, P. J.; GRAY, A. J.; RAY, D. E. The action of mephenesin and other agents on the effects produced by two neurotoxic pyrethroids in the intact and spinal rat. **Neuropharmacology**. v. 22, p. 907-914, 1983.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCHELI, T. B.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**. v. 25, p. 201-268, 1995.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug metabolism and Disposition**. v. 2, p. 583-588; 1974.

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

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. **Biochemical Pharmacology**. v. 34, p. 3337, 1985.

CLARK, J. M. Effects and mechanisms of action of pyrethrin and pyrethroid insecticides. In: Chang, L. W., Dyers, R. S. (Eds.), **Handbook of Neurotoxicology**. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 511-546, 1995.

CUNHA BASTOS, J.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; BURTH, P.; HARAB, R.; DE LUNA, M. G.; ROSSINI, A.; CASTRO FARIA, M. V. Drug metabolism components in liver microsomes from benthic fish (cascudo). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 94C, n.2, p. 683-689, 1989.

CURTIS, L. R.; CARPENTER, H. M.; DONOHOE, R. M.; WILLIAMS, D. E.; HEDSTROM, O. R.; DEINZER, M. L.; BEILSTEIN, M. A.; FOSTER, E.; GATES, R. Sensitivity of cytochrome P450-1A1 induction in fish as a biomarker for distribution of TCDD and TCDF in the Willamette River, Oregon. **Environmental Science Technology**. v. 27, p. 2149, 1993.

DALE, H. H. The action of certain esters of choline and their relation to muscarine. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutic**. v. 6, p. 147-190, 1914.

DAS, B. K.; MURKERJEE, S. C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comparative and Physiology**. Part C, v. 134, p. 109-121, 2003.

DAYAL, M.; PARMAR, D.; DHAWAN, A.; DWIVEDI, U. N.; DOEHMER, J.; SETH, P. K. Induction of rat brain and liver cytochrome P450A1A/1A2 and 2B1/2B2 isoenzymes by deltamethrin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 27, p. 169-178, 1999.

DEMOUTE, J. P. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. **Pesticide Science**. v. 27, p. 375-385, 1989.

DIGIULIO, R. T.; BENSON, W. H.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. London: Taylor & Francis, 1995.

EGGENS, M. L.; GALGANI, J.; KLUNGSOYR, L.; EVERTS, J. Hepatic EROD-activity in dab, *Limanda Limanda*, in the German Bight using an improved plate-reader method. **Marine Ecology Progress Series**. v. 91, p. 71-75, 1992.

ELSKUS, A. A.; STEGMAN, J. J. Induced cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus* associated with environmental contamination by polychlorinated biphenyls and polynuclear aromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Reserch**. v. 27, p. 31, 1989.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p. 88-95, 1961.

FERGUSON, R. A.; BOUTILIER, R. G. Metabolic-membrane coupling in red cells at trout: The effects of anoxia and adrenergic stimulation. **Journal exp. Biology**. v. 143, p. 149-164, 1989.

GALGANI, F.; BOCQUENÉ, G.; CADIOU, Y. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. **Marine Ecology Progress Series**. v. 91, p. 72-82, 1992.

GEORGE, S.; HENDERSON, J. Influence of dietary PUFA content on cytochrome P450 and transferase activities in Atlantic salmon . **Marine Environmental Reserch**. v. 34, p. 127, 1992.

GOKSØYR, A.; FÖRLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatatic Toxicology**, v. 22, p. 287, 1992.

GUENGERICH, F. P.; MACDONALD, T. L., Mechanisms of cytochrome P450 catalysis, **FASEB J.**, v. 4, p. 2453, 1990.

HAHN, M. E.; WOODWARD, B. L. STEGEMAN, J. J.; KENNEDY, S. W. Rapid assessment of induced cytochrome P4501A (CYP1A) protein and catalitic activity in fish hepatoma cells grown in multi-well plates. **Environmental Toxicology And Chemistry**. V. 95, p. 5, 1994.

HANDY, R. D.; EDDY, F. B.; BAINES, H. Sodium-Dependent Copper Uptake Across Epithelia: a Review of Rationale with Experimental Evidence from Gill and Intestine. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1566, p. 104-115, 2002.

HEILMANN, L. J.; SHEEN, Y. Y.; BIGELOW, S. W.; NEBERT, D. W. Trout P4501A1: cDNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance. **DNA**. v. 7, p. 379, 1988.

HODSON, P. V.; KLOEPPER-SAMS, P. J.; MUNKITTRICK, K. R.; LOCKHART, W. L.; METNER, D. A.; LUXON, P. L.; SMITH, I. R.; GAGNON, M. M.; SERVOS, M.; PAYNE, J. F. Protocols for measuring mixed function oxygenases of fish liver. **Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.** v. 1829, p. 2-24, 1991.

HOLLENBERG, P. F. Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalysed xenobiotic metabolism. **FASEB J.**, v. 6, p. 686, 1992.

HUDSON, P. M.; TILSON, H. A.; CHEN, P. H.; HONG, J. S. Neurobehavioral effects of permethrin are associated with alterations in regional levels of biogenic amine metabolites and amino acid neurotransmitters. **Neurotoxicology**, v. 7, p. 143-154, 1986.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE Jr., P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

KIRBY, M. F.; MORRIS, S.; HURST, S. J.; KIRBY, P.; NEALL, P.; TYLOR, T.; FAGG, A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**. v. 40, n. 9, p. 780-791, 2000.

KLEMZ, C. Uso de **Biomarcadores de Contaminação Ambiental em Peixes *Ancistrus sp* (Cascudo)**, Curitiba, Pr, 2002, 67p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia, Orientadora Professora Doutora Helena C. da Silva de Assis) Universidade Federal do Paraná.

LI, J.; QUABIUS, S. E.; WENDELAAR BONGA, G.; FLIK, G.; LOCK, R. A. C. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Aquatic Toxicology**. v. 43, p. 1-11, 1998.

LOEWI, O.; NAVRATIL, E. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung XI über den mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin. **Pflügers Arch.** v. 214, p. 689-696, 1926.

LUNDIN, S. J. Comparative Studies of Cholinesterases in Body Muscles of Fish. **Journal of Cellular Comparative Physiology**. v. 59, p. 93-105, 1962.

MAGNOTTI Jr., R. A.; ZAINO, J. P.; McCONNEL, R. S. Pesticide-sensitive fish muscle cholinesterases. **Comparative Biochemical Physiology**. v. 108C, n.2, p. 187-194, 1994.

MAHMMOUD, Y. A.; CORNELIUS, F. Phosphorylation of Na⁺K⁺ATPase by Protein Kinase A e Protein Kinase C: Functional Significance in Regulation. **Journal Biology Chemistry**. v. 275, p. 35969-35977, 2000.

MASSOULIÉ, J.; BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annual Rev. Neuroscience**. v. 5, p. 57-106, 1992.

MCCORMICK, S. D. Hormonal control of gill Na⁺K⁺ATPase and chloride cell function. **Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation**. v. 14 (ed. C. M. Wood e T. J. Shuttleworth), p. 285-315, 1995.

MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. **Fish Ecophysiology**. p. 297-332, London:Chapman and Hall, 1993.

MIRANDA, C. L., WANG, J. L., CHANG, H. S.; BUHLER, D. R. Multiple effects of 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl administration on hepatic cytochrome P450 isozymes and associated mixed-function oxidase activities in rainbow trout. **Biochemical Pharmacology**. v. 40, p. 387, 1990.

MOORE, A.; WARING, C. P. The effects of a synthetic pyrethroid on some aspects of reproduction in atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquatic Toxicology**. v.52, p. 1-12, 2000.

MUNKITTRICK, K. R.; PORTT, C. B; VAN DER KRAAK, G. J.; SMITH, I. R.; ROKOSH, D. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker population. **Can. J. Fish Aquat. Sci.** v. 48, p. 1371-1380, 1991.

NEBERT, D. W.; ADESNIK, M.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GONZALEZ, F. J.; GUENGERICH, F. P.; GUNSALUS, I. C.; JOHNSON, E. F.; KEMPER, B.; LEVIN, W.; PHILIPS, I. R.; SATO, R.; WATERMAN, M. R. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. **DNA**. v. 06, p. 01, 1987.

NELSON, D. R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, D. J; GUENGERICH, F. P.; ESTABROOK, R. W.; FEYEREISEN, R.; GONZALEZ, F. J.; COON, M. J.; GUNSALUS, I. C.; GOTOH, O.; OKUDA, K.; NEBERT, D. W. The P450 superfamily- update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA Cell Biology**. v. 12, p. 1, 1993.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 239, n.7, p. 2370-2378, 1964.

PAYNE, J. F.; FANCEY, A. D.; RAHIMUTULA, A. D.; PORTER, E. L. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 86, p. 233-245, 1987.

PERRY, S. F. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annu. Rev. Physiology**. v. 59, p. 325-347, 1997.

PHARMACOLOGY2000. Drugs and metabolisms. Disponível em: <<http://www.pharmacology2000.com>> Acesso em: 01 nov. 2003.

POLAND, A.; KNUTSON, J. C. 2,3,7,8 -Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 22, p. 517, 1982.

POLAND, A.; GLOVER, E. Variation in the molecular mass of the Ah receptor among vertebrate species and strains of rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 146, p. 1439, 1987.

POLAT, H.; ERKOÇ, F. U.; VIRAN, R.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**. v. 49, p. 39-44, 2002.

QUABIUS, E. S.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 108, p. 472-482, 1997.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Washington, D.C.: Taylor & Francis, p. 3-67, 1995.

REDDY, P. M.; PHILIP, G. H. Inhibition of Mg^{2+} and Na^+K^+ ATPases in selected tissues of fish, *Cyprinus carpio* under fenvalerate toxicity. **Biochemistry International**. v. 23, p. 715-721, 1991.

REDDY, P. M.; PHILIP, G. H. In vivo inhibition of AchE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. **Bull. Environmental Contam. Toxicol.**, v. 52, p. 619-626, 1994.

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUEE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa ounctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 56, p. 295-301, 2003.

SAWYER, C. H. Nature of the early somatic movements in *Fundulus heteroclitus*. **Journal of Cellular Comparative Physiology**. v. 24, p. 71-84, 1944.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**. Julho 1998, 99 pp. Tese (doutorado) Universidade Técnica de Berlim, Alemanha.

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of Pyrethroid Neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, 2001.

STEDMAN, Ed.; STEDMAN, El. Choline-esterase. An enzyme present in the blood serum of the horse. **Biochemical Journal**. v. 26, p. 2056-2066, 1932.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. OSTRANDER, G. K.; MALINS, D. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1994.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R. T.; FORLIN, L.; FOWLER, B. M.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect, in **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**, HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L., Eds., Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 235, 1992.

STEGEMAN, J. J.; BINDER, R. L.; ORREN, A. Hepatic and Extrahepatic Microsomal electron Transport Components and Mixed-Function Oxigenases in the Marine Fish *Stenotomus versicolor*. **Biochemical Pharmacology** v. 28, p. 3431-3439, 1979.

STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H.; LIESS, M. Different Sensitivity to Organophosphates of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase from Three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) Application in Biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 19, n. 6, p. 1607-1615, 2000.

SZEGLETES, T.; POLYHOS, C.; BALINT, T.; RADY, A.; LANG, G.; KUFCSAK, O.; NEMCSOK, L. *In vivo* effects of deltamethrin on some biochemical parameters of cap (*Cyprinus carpio* L.) **Environmental monitoring and assessment**, v. 35 n. 2, p. 97-111, 1995a.

SZEGLETES, T.; BÁLINT, T.; SZEGLETES, Zs.; NEMCSÓK, L. *In vivo* effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AchE. **Ecotoxicology And Environmental Safety**. v. 31, p. 258-263, 1995b.

THAKER, J.; CHHAYA, J.; SHEEBA, N.; MITTAL, R. Effects of Chromium (VI) on Some Ion-dependent ATPases in Gills, Kidney and Intestine of a Coastal teleost *Periophthalmus dips*. **Toxicology**. v. 112, p. 237-244, 1996.

THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **Am. J. Physiology**. v. 279, p. 541-566, 2000.

THOMPSON, H. M.; LANGTON, S. D.; HART, A. D. M. Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife – a biochemical approach. **Comparative Biochemical Physiology**. v. 111C, p. 1-12, 1995.

UCHIDA, K.; KANEKO, T. Enhanced chloride cell turnover in the gills of chum salmon fry in seawater. **Zoology Science**. v. 13, p. 655-660, 1996.

WEISS, C. M. Stream Pollution – Response of fish to sub-lethal exposures of organic phosphorus insecticides. **31st Annual Meeting Federation of Sewage and Industrial Wastes**, Detroit. v. 31, n. 5. 1958.

WHITLOCK, J. P. Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 30, p. 251, 1990.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 97 – Deltamethrin. **Geneva: International Programme on Chemical Safety – IPCS**, 1990.

WILLIAMS, R. T. **Detoxication Mechanism**, 2nd ed, Chapman & Hall, London, 1959.