

CLÁUDIO KLEMZ

**USO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL
EM PEIXES *Ancistrus* sp. (CASCUDO)**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa
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

Co-orientador:

Prof. Dr. Afonso C. D. Bainy

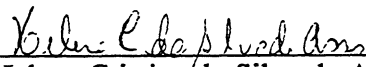
CURITIBA

2002



PARECER

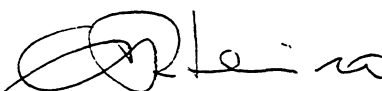
A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “USO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM PEIXES *Ancisturs sp.* (CASCUDO)”, de autoria do Pós-Graduando CLAUDIO KLEMZ, e composta pelos Professores Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis (como orientador e Presidente); Dr. Jayme da Cunha Bastos (UERJ), Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Prof^a Dr^a Helena Cristina da Silva de Assis, nota DEZ (10); Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos, nota DEZ (10); e Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, nota DEZ (10). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o Pós-Graduando foi APROVADO, coma nota DEZ (10). Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo orientador. Em Curitiba, 15 de abril de 2002.



Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis



Dr. Jayme da Cunha Bastos



Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho.

*Excuse me Mr.,
do you have the time?
Or are you so important that it stands still.*

*Excuse me Mr.,
want you lend me your ear?
Or are you not only blind, but do you not hear?*

*Excuse me Mr.
but isn't that your oil in the sea?
And the pollution in the air Mr., whose could that be?*

*Excuse me Mr.
Can't you see the children dying?
You say that you can't help them Mr., but you're not even trying.*

*So, excuse me Mr.
but I'm a mister too,
and you're givin' Mr. a bad name, Mr. like you.*

*So, I'm taking the Mr. from out in front of your name,
'cause it's a Mr. like you that puts the rest of us to shame.*

Ben Harper

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE GRÁFICOS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1) INTRODUÇÃO	1
1.1) HISTÓRICO E CONCEITOS.....	3
1.2) INTERAÇÕES ENTRE POLUENTES E ORGANISMOS VIVOS.....	5
1.3) BIOMARCADORES.....	7
1.3.1) Atividade da colinesterase.....	10
1.3.2) Citocromo P450.....	13
1.4) ENDOSULFANO.....	15
2) OBJETIVOS	17
3) MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1) OBTENÇÃO DOS PEIXES.....	18
3.2) ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES.....	18
3.3) DESENHO EXPERIMENTAL.....	18
3.3.1) Exposição Piloto ao Endosulfano (Pré-Experimento).....	19
3.3.2) Exposição Aguda ao Endosulfano (40mg/Kg).....	19
3.3.3) Exposição Sub-Letal ao Endosulfano (4mg/Kg).....	19
3.3.4) Exposição ao 3-metilcolantreno (Citocromo P450 Total).....	19
3.4) ANÁLISE DA ATIVIDADE COLINESTERÁSICA.....	20
3.4.1) Preparação da amostra.....	20
3.5) ANÁLISE DO CITOCROMO P450.....	22
3.5.1) Extração Microssomal Hepática.....	22
3.5.2) Padronização da Metodologia (CYP450 Total).....	22
3.5.3) Análise do Citocromo P450 Total.....	23
3.5.4) Análise do Citocromo P450 1A (<i>Western Blot</i>).....	24
3.6) CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	26
3.7) ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1) ANÁLISE DA ATIVIDADE COLINESTERÁSICA.....	27
4.1.1) Exposição Piloto ao Endosulfano (Pré-Experimento).....	27

4.1.2) Exposição Aguda ao Endossulfano (40 mg/Kg).....	28
4.1.3) Exposição Sub-Letal ao Endossulfano (4mg/Kg).....	28
4.1.4) Correlação entre atividade colinesterásica com o comprimento e o peso dos peixes.....	33
4.1.5) Variação da atividade colinesterásica com o sexo dos peixes.....	35
4.2) ANÁLISE DO CITOCROMO P450.....	38
4.2.1) Concentração Protéica dos Extratos Microssomais Hepáticos.....	38
4.2.2) Padronização da Metodologia para Citocromo P450 Total.....	38
4.2.2.1) Definição do protocolo experimental.....	38
4.2.2.2) Fatores Interferentes na Obtenção dos Espectros Diferenciais.....	42
4.2.3) Efeitos do Endossulfano sobre o CYP450 Total.....	46
4.2.3.1) Exposição Aguda ao Endossulfano (40 mg/Kg).....	46
4.2.3.2) Exposição Sub-Letal ao Endossulfano (4mg/Kg).....	47
4.2.4) Efeitos do Endossulfano sobre a isoforma CYP1A (<i>Western Blot</i>).....	49
5) CONCLUSÕES.....	54
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática da dinâmica dos poluentes no ambiente.....	2
FIGURA 2	Representação esquemática das vias de detoxificação e de ativação e dos efeitos moleculares decorrentes.....	7
FIGURA 3	Representação esquemática dos níveis de organização biológica onde podem ser observados efeitos de poluentes ambientais.....	8
FIGURA 4	Sítios de ligação e ação das ChEs sobre a Ach.....	11
FIGURA 5	Princípio do Método de Ellman.....	20
FIGURA 6	Correlação entre atividade colinesterásica em músculo e o peso corporal de cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.).....	33
FIGURA 7	Correlação entre atividade colinesterásica em músculo e o comprimento corporal de cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.).....	34
FIGURA 8	Espectro diferencial de absorção de microsossoma hepático de cascudo (<i>Ancistrus</i> sp.) exposto por via intracelomática a 30mg/Kg de 3MC por 72 horas.....	39
FIGURA 9	Seqüência de espectros diferenciais de absorção de microsossomas tratados com fenasina metasulfato 25 μ M e ascorbato de sódio 2 mM provenientes de peixes expostos por via intracelomática a 30mg/Kg de 3MC por 72 horas.....	41
FIGURA 10	Espectros diferenciais obtidos em análises do citocromo P450 total de microsossomas de cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.) com PMS e ascorbato de sódio.....	42
FIGURA 11	Espectro diferencial de um microsossoma preparado a partir de amostras de fígado perfundidas com solução salina 9%.....	43
FIGURA 12	Espectro diferencial de um microsossoma preparado a partir de amostras de fígado perfundidas com solução salina 9%, tratado com PMS e ascorbato de sódio.....	43

FIGURA 13	Comparação dos espectros diferenciais de microsoma perfundido tratado com PMS e ascorbato de sódio e de hemoglobina da espécie <i>Ancistrus</i> sp.....	44
FIGURA 14	Espectros diferenciais de amostras que sofreram variação de temperatura e que não sofreram.....	45
FIGURA 15	Resultado do <i>western blot</i>	50

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Atividade colinesterásica de cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.) expostos ao endosulfano a 40 mg/Kg.....	29
GRÁFICO 2	Atividade colinesterásica de cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.) expostos ao endosulfano a 4mg/Kg (1º experimento).....	30
GRÁFICO 3	Atividade colinesterásica de cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.) expostos ao endosulfano a 4mg/Kg (2º experimento).....	30
GRÁFICO 4	Atividade colinesterásica em tecido muscular de cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.) machos e fêmeas.....	35
GRÁFICO 5	Concentração de citocromo P450 total em cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.) após 8 horas de tratamento com uma dose de 40 mg/Kg de endosulfano por via intracelomática.....	46
GRÁFICO 6	Concentração de citocromo P450 total em cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.) após 24, 48 e 96 horas de tratamento com uma dose de 4 mg/Kg de endosulfano por via intracelomática (1º experimento).....	47
GRÁFICO 7	Concentração de citocromo P450 total em cascudos (<i>Ancistrus</i> sp.) após 24, 48 e 96 horas de tratamento com uma dose de 4 mg/Kg de endosulfano por via intracelomática (2º experimento).....	48
GRÁFICO 8	Expressão da isoforma CYP1A em microssoma hepático de <i>Ancistrus</i> sp. Tratados com endosulfano na dose de 4 mg/Kg por via intracelomática.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Concentrações de proteína microsomal hepática.....	38
TABELA 2	Efeito da variação de temperatura sobre a quantidade de CYP450 mensurável.....	45

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Por cento

Δ - Variação

\square – Concentração

3MC – 3-metilcolantreno

Ach – Acetilcolina

AchE – Acetilcolinesterase

AcSCh – Acetilticolina

Ah – *Aryl hydrocarbon*

ALAD – Enzima ácido aminolevulínico desidratase

APS – Persulfato de amônio

ARNT – *Aryl hydrocarbon nuclear transferase*

BchE – Butirilcolinesterase

BuSCh – Butirilticolina

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CB – Carbamato

Cd²⁺ - Íon cádmio

ChE – Colinesterase

Cl⁻ - Íon cloro

CO – Monóxido de carbono

Cu²⁺ - Íon cobre

CYP 1A – Citocromo P 1A

CYP 450 – Citocromo P450

DTNB – 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato

ep – Erro padrão

EROD – Etoxiresorufina O-deetilase

Fe²⁺ – Cátion ferroso

Fe³⁺ - Cátion férrico

g – Unidade de centrifugação

GABA – Ácido gama amino butírico

Hg²⁺ - Íon mercúrio

HPAs – Hidrocarbonetos poliaromáticos

HSPs –Heat shock proteins

IgG – Imunoglobulina G
KCl – Cloreto de potássio
 KH_2PO_4 – Fosfato de potássio
KOH – Hidróxido de potássio
mA – Miliampéres
MFO – Oxigenases de função mista
 Na_2HPO_4 – Fosfato de sódio
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ – Disulfato de sódio
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADPH – Nicotinamida Adenina Fosfato Dinucleotídeo Reduzida
° C – Graus Celsius
OC - Organoclorado
OD – Densidade óptica
OP – Organofosforado
PCBs – Bifenilas policloradas
pH – Potencial hidrogeniônico
PMS – Fenasina metassulfato
ppm – Partes por milhão
q.s.p. – Quantidade suficiente para
 R^2 - Coeficiente de correlação
SNC – Sistema Nervoso Central
UA – Unidades arbitrárias
US-EPA – Agência de Proteção Ambiental – Estados Unidos
v/v – Volume por volume
OMS – Organização Mundial de Saúde

RESUMO

O uso de biomarcadores como indicadores precoces de contaminação ambiental começa a ser discutido no Brasil. Estes marcadores já são usados com frequência em programas de monitoramento ambiental em outros países, no entanto, as particularidades de sua interpretação ainda representam um grande desafio à sua aplicação prática. Devido às características bioquímicas, fisiológicas e anatômicas de cada espécie animal usada como bioindicadora, a utilização efetiva de biomarcadores deve ser precedida da padronização das metodologias para cada uma delas. No presente trabalho foi escolhido um peixe nativo, o cascudo (*Ancistrus* sp.), para padronização das metodologias de análise da atividade colinesterásica e do citocromo P450 (CYP450), componente do sistema de enzimas do metabolismo hepático. Também foi avaliado o efeito do inseticida organoclorado endossulfano, sobre a expressão destes biomarcadores nos cascudos. Uma dose subletal de endossulfano (4mg/Kg) foi administrada por via intracelomática e os peixes foram sacrificados após 24, 48 e 96 horas. A atividade colinesterásica foi medida em músculo axial e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os peixes expostos ao endossulfano e os peixes do grupo controle. Já as enzimas do CYP450, que têm sua transcrição induzida por diversos tipos de poluentes, sofreram inibição significativa após 96 horas da administração do endossulfano. Biomarcadores como a atividade colinesterásica apresentam maior sensibilidade a certos tipos de contaminantes ambientais, como organofosforados e carbamatos, respondendo de maneira menos específica a outros poluentes ambientais. Esta característica, no entanto, é importante pois tanto biomarcadores específicos como os mais genéricos podem ser aplicados com diferentes funções em programas de monitoramento ambiental. A inibição do citocromo P450 causada pelo endossulfano pode ser devida a inibição enzimática autocatalítica e/ou a efeitos deste composto sobre membranas lipídicas, alterando a expressão de enzimas associadas a estas estruturas. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o uso de biomarcadores na avaliação de qualidade ambiental depende da padronização e de pesquisas adicionais para a sua correta aplicação e interpretação em programas de monitoramento ambiental.

ABSTRACT

The use of biomarkers as early warning systems begins to be debated in Brazil. These markers have already been used in environmental monitoring programs in other countries; however, its peculiarities of interpretation are still a great challenge for its practical application. Due to specific biochemical, physiological and anatomical features of each animal species used as bioindicators, the standardization of methodologies for each one must precede the ultimate application of biomarkers. In the present work, the native fish *cascudo* (*Ancistrus* sp.) had the methodologies for cholinesterase activity and cytochrome P450 analysis standardized. Additionally, the effects of the chlorinated insecticide endosulfan on the cited biomarkers were also evaluated. A sublethal dose of endosulfan was given intraperitoneally and fish were killed 24, 48 and 96 hours after treatment. Cholinesterase activity was measured in axial muscle and did not reveal any significant statistical changes between exposed fish to endosulfan and the control group. On the other hand, cytochrome P450 enzymes, which have its transcription induced by several kinds of pollutants, showed a statistically significant inhibition after 96 hours of administration of endosulfan. Biomarkers like the cholinesterase activity are relatively specific for a certain group of contaminants, especially organophosphate and carbamate compounds, but less specific to other environmental pollutants. Such feature can be of relevant use in environmental monitoring programs, where both specific and general biomarkers shall be associated. Inhibition of cytochrome P450 enzymes caused by endosulfan can be due either to enzymes self-inactivation or to the effects of this compound on cell lipidic membranes altering the expression of membrane associated enzymes. The results observed in this work show that further research and standardization are needed for the proper application and interpretation of biomarkers in environmental pollution monitoring programs.

1) INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da sociedade industrial tem contribuído significativamente para a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos. No entanto, desde o início da industrialização a partir do século XIX, o ambiente natural vem sendo modificado de diversas maneiras. O aumento da capacidade produtiva e a crescente tecnificação dos processos, visando a produtividade máxima, têm provocado um aumento na exploração dos recursos naturais com um conseqüente aumento na produção de rejeitos, geralmente constituídos por substâncias nocivas ou tóxicas.

Durante a Segunda Guerra Mundial foi observado um grande desenvolvimento na produção de compostos químicos sintéticos. Posteriormente, muitas destas substâncias passaram a ser utilizadas na agricultura, na indústria, assim como na saúde pública para o controle de doenças (MOO, 1998).

Com a implantação da agricultura industrial, extensas áreas naturais têm sido substituídas por monoculturas, causando um grave desequilíbrio no solo e o desenvolvimento de plantas e insetos indesejáveis. Assim, passaram a ser utilizados diversos agroquímicos, entre fertilizantes e agrotóxicos, o que tornou a agricultura uma das principais fontes de contaminantes aquáticos.

Atualmente o grau de contaminação ambiental com rejeitos das atividades produtivas vem ameaçando a saúde do homem e das demais espécies. A consciência deste problema tem se refletido na formação de convenções internacionais para discussão do assunto e no surgimento de regulamentações legais anteriormente inexistentes em diversos países.

Este tipo de pressão social sobre as atividades produtivas de maior impacto tem levado a uma maior exigência na qualidade dos processos, forçando a adaptação das indústrias à nova realidade. Com isto, existe uma tendência de que a atividade industrial venha, não somente a suprir as necessidades de consumo criadas pela sociedade, como também a preencher requisitos sanitários e ecológicos.

No processo de adequação às novas necessidades deve-se considerar também o avanço nos meios de monitoramento das condições do ambiente natural. As técnicas tradicionais de quantificação dos poluentes ambientais

podem ser agora acompanhadas por métodos mais abrangentes e de menor custo que, se utilizados em consonância, otimizam o processo de monitoramento ambiental.

O ambiente aquático é um meio invariavelmente atingido pelos poluentes ambientais. Isto pode ocorrer pela evaporação e posterior precipitação com as chuvas, ou pelo escoamento superficial ou despejo direto de efluentes em corpos d'água (FIGURA 1).

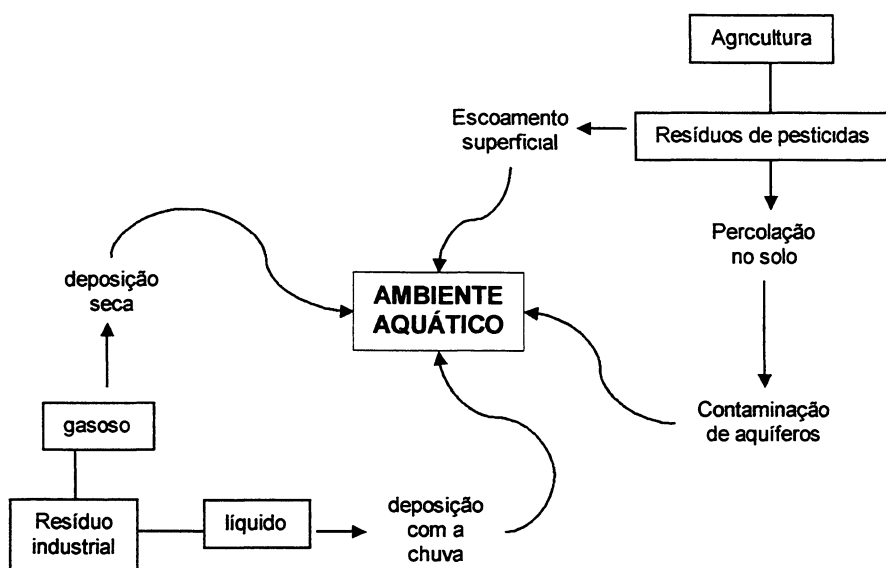


FIGURA 1 – Representação esquemática da dinâmica dos poluentes no ambiente.

A introdução de substâncias tóxicas no ambiente aquático causa não somente efeitos locais e imediatos, mas pode levar a alterações sistêmicas como a contaminação de bacias hidrográficas e o comprometimento de reservatórios subterrâneos através da infiltração pelo solo. Assim, a comunidade aquática, bem como as comunidades que fazem uso dos recursos hídricos podem ser expostas e sofrer os efeitos de contaminação crônica (THOMPSON et al., 1995).

1.1) HISTÓRICO E CONCEITOS

Os primórdios da toxicologia podem ser remetidos ao tempo de Paracelsus (1493-1541) (Rhodes et al. 1993), o “pai da toxicologia”, que pronunciou a célebre expressão: “Todas as substâncias são venenos; não existe nenhuma que não seja um veneno; a dose certa diferencia um veneno de um remédio”.

M.J.B. Orfila (1787-1853), um espanhol nascido na Ilha de Minorca, publicou o primeiro livro dedicado exclusivamente aos efeitos perigosos das substâncias químicas em organismos (MANAHAN, 1989). Mais tarde, com o advento da química orgânica, próximo a 1880, a disciplina de toxicologia passou a ter caráter formal (ZAPP, 1980).

Esta “toxicologia pioneira” provinha da integração da toxicologia clínica com a farmacologia e a medicina ocupacional, além da química e outras disciplinas (RODRICKS, 1992). Trata-se de uma área multidisciplinar desde as suas raízes. Este mesmo autor recorda que o estudo sistemático de efeitos tóxicos em animais de laboratório iniciou na década de 1920, em resposta às preocupações sobre os efeitos colaterais de aditivos alimentares, drogas e pesticidas.

Grande impacto causou o livro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carson (1962). Esta obra trouxe à tona o temor da sociedade moderna com relação à introdução de substâncias sintéticas no ambiente e renovou o interesse público e governamental na ciência da toxicologia. Neste momento, as pesquisas realizadas nas universidades, nas indústrias químicas e em laboratórios privados estimularam o surgimento de uma nova área da toxicologia, a **ecotoxicologia** ou **toxicologia ambiental**.

Estes termos se confundem, sendo a primeira definida como “a divisão da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos de substâncias naturais e artificiais em organismos vivos, tanto animais como vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera” (TRUHAUT, 1975, 1977; BUTLER, 1978). A segunda incluiria ainda os efeitos dos contaminantes ambientais e outros agentes no homem. Entretanto, estes termos são geralmente usados como sinônimos (RAND et al., 1995).

Antes da Segunda Guerra Mundial já se praticaram alguns testes de toxicidade com organismos aquáticos, incluindo invertebrados e peixes (ANDERSON, 1944; ANDERSON e DeFOE, 1980; HUNN, 1989).

Porém, foi nos anos que se seguiram à Segunda Grande Guerra, que esforços passaram a ser realizados para padronizar os testes de toxicidade aguda. Laboratórios específicos foram estabelecidos no Reino Unido, Canadá e Estados Unidos. Nascia então a **toxicologia aquática**, que foi definida como “o estudo dos efeitos de substâncias químicas e outros compostos de origem antrópica (**xenobióticos**) ou natural sobre organismos aquáticos em vários níveis de organização” (RAND et al., 1995). O efeito dessas substâncias passou a ser estudado, assim como, a influência de fatores naturais sobre as respostas fisiológicas, buscando um meio de prever impactos ambientais. Nesta época, os testes de toxicidade aguda passaram a ser a “pedra fundamental” das metodologias de estudo dos efeitos de poluentes (BUIKEMA et al., 1982).

A partir da década de 1960 a toxicologia aquática passou a ser aplicada mais intensivamente na América do Norte e na Europa. Testes de toxicidade aguda eram realizados em efluentes de indústrias e cidades visando determinar os efeitos sobre a biota e sobre seu habitat, os corpos d’água (WELLS, 1989).

Os métodos de estudo passaram então a evoluir. Bioensaios de exposição estática e de fluxo contínuo foram criados, experimentos multifatoriais e o controle preciso da qualidade da água foram implementados. O interesse nos efeitos crônicos subletais e exposição a baixos níveis de contaminação avançou bastante, particularmente devido a disseminação de compostos organoclorados (pesticidas) e resíduos industriais persistentes (bifenilas policloradas - PCBs) ao redor do mundo (CARSON, 1962).

A experimentação progrediu para metodologias abrangentes que consideravam conjuntamente as fontes de poluição, a interação das substâncias químicas entre si e fatores relacionados à água e suas características físico-químicas (pH, salinidade, temperatura). Estudos foram realizados em uma variedade de espécies, desde microorganismos até peixes (RAND et al., 1995).

Na década de 1970 foi criada a Agência de Proteção Ambiental nos Estados Unidos (US-EPA), e testes de toxicidade aguda em peixes passaram a ser aceitos como um parâmetro válido na criação de regulamentações por parte dos governos (RAND et al., 1995).

Em 1980 foi criado o jornal científico *Aquatic Toxicology* e foi fundada a Sociedade de Toxicologia e Química Ambiental (SETAC). Nesta década a toxicologia aquática “amadureceu” bastante em termos científicos. Desde então, muitos livros especializados foram publicados; simpósios, *workshops* e congressos foram realizados abordando este tema e novos termos e conceitos foram estabelecidos.

Biomarcadores, por exemplo, que são respostas dos organismos aos poluentes têm sido pesquisados e utilizados como metodologia alternativa aos testes de toxicidade aguda (GOLDBERG e FRAZIER, 1989; HUGGETT et al., 1992). Efeitos genotóxicos e mutagênicos também têm sido objeto de discussão nestes fóruns. Os anos 90 presenciaram grandes avanços da toxicologia aquática tanto em laboratório quanto no campo (RAND et al., 1995).

1.2) INTERAÇÕES ENTRE POLUENTES E ORGANISMOS VIVOS

Quando os poluentes são absorvidos por organismos vivos, dois tipos de respostas podem ser esperadas: aquelas que são decorrentes do metabolismo do poluente pelo organismo exposto, e aquelas que decorrem de seu mecanismo de toxicidade (WALKER et al., 1996).

Um exemplo de resposta decorrente do metabolismo consiste no incremento da expressão de proteínas destinadas à remoção da molécula do xenobiótico. Xenobióticos lipofílicos, por exemplo, são metabolizados e/ou conjugados a moléculas endógenas de modo a promover o aumento da hidrossolubilidade das moléculas do poluente elevando sua taxa de excreção. Isto é promovido por enzimas biotransformadoras dentre as quais destacam-se as monooxigenases do retículo endoplasmático de vertebrados e invertebrados (BUCHELI e FENT, 1995).

Quando certos íons metálicos excedem um nível celular, outros tipos de proteínas são induzidas; as metalotioneínas. Estas proteínas, com alto conteúdo do aminoácido cisteína, que contém grupos tiol (-SH), podem

combinar-se com íons Cu^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} , seqüestrando-os e reduzindo sua concentração e toxicidade nas células (OLSSON, 1996).

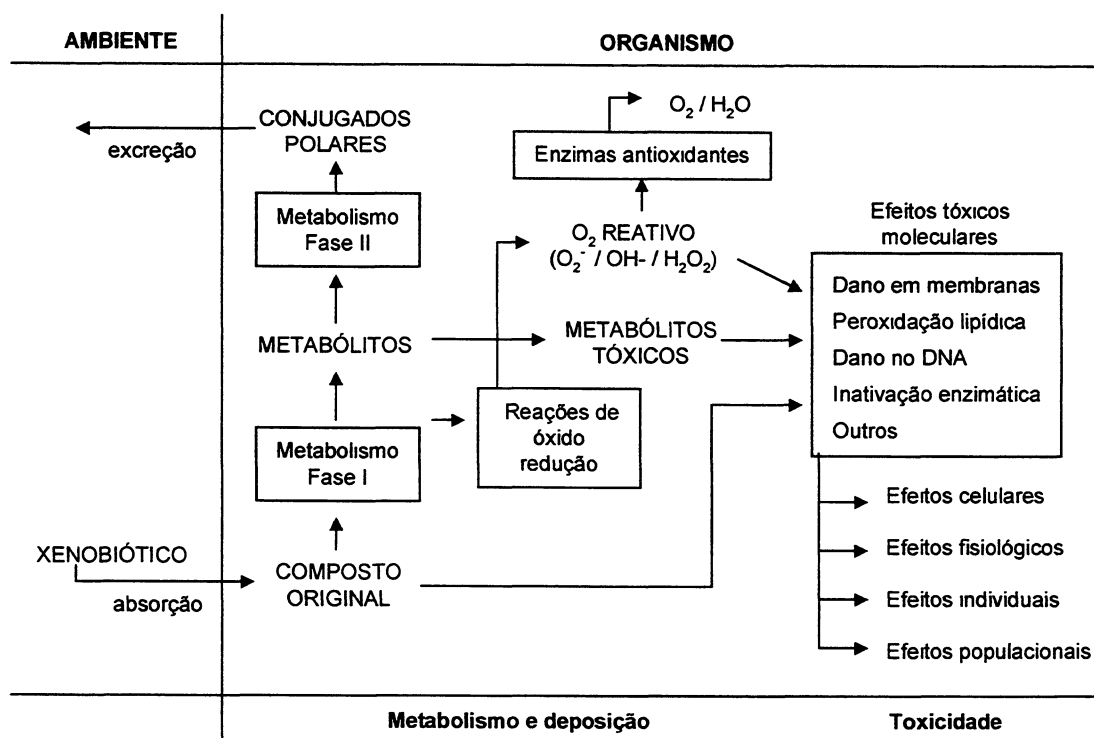
Estas respostas estão relacionadas com a proteção do organismo e prevenção de efeitos tóxicos dos xenobióticos, removendo-os antes que eles interajam com seus sítios de ação de forma significativa.

Um outro tipo de mecanismo de proteção está relacionado à reparação de danos celulares que já ocorreram. Um exemplo importante são as proteínas de estresse e os mecanismos de reparação do DNA (NUNN et al., 1996).

Xenobióticos podem também causar efeitos tóxicos que não são relacionados ao seu metabolismo, mas sim ao mecanismo de toxicidade propriamente dito. Estes incluem alterações na atividade ou funções enzimáticas, alterações em receptores, surgimento de intermediários reativos ou alterações na expressão gênica. As alterações bioquímicas causadas no local de ação da substância tóxica representam o mecanismo de ação responsável pela toxicidade (WALKER et al., 1996).

Em alguns casos estas alterações podem não causar efeito nocivo algum, porém em outros, conseqüências sérias a nível celular ou no organismo inteiro podem ser observadas. Nestes casos a saúde do organismo é adversamente afetada, podendo culminar com o óbito (HUGGETT et al., 1992) (FIGURA 2).

Os efeitos tóxicos causados por poluentes em organismos vivos podem ser específicos de um grupo de contaminantes ou podem ser comuns às diversas classes de poluentes. Da mesma forma, as respostas dos organismos a um certo poluente podem ser específicas de uma determinada espécie, ou podem ser comuns às diferentes espécies (WALKER et al., 1996).



Fonte: FENT, K. **Ökotoxikologie – Umweltchemie, Toxicologie und Ökologie**. Stuttgart: Thieme, 1998.

FIGURA 2 – Representação esquemática das vias de detoxificação e de ativação e dos efeitos moleculares decorrentes.

1.3) BIOMARCADORES

De maneira geral, biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensuradas indicando a presença, o efeito e, em alguns casos, o grau de contaminação (WALKER et al., 1996).

A partir da introdução de substâncias químicas no ambiente, os organismos expostos podem incorporar o contaminante por diversas vias de absorção. Uma vez absorvidos os poluentes atuam em locais de ação que representam seu mecanismo molecular de toxicidade.

Desta interação, que pode ser a ligação a um receptor, a uma enzima ou ao próprio material genético, resultam efeitos moleculares que, por sua vez,

levam a efeitos fisiológicos. Alterações fisiológicas podem levar os indivíduos a apresentar comportamentos anormais ou afetar a saúde dos mesmos.

Estes efeitos afetam a espécie em questão, interferindo no sucesso reprodutivo ou em relações interespecíficas, causando alterações na dinâmica populacional. A partir deste ponto, os efeitos da contaminação ambiental são observados na comunidade e, conseqüentemente, todo o ecossistema pode ser negativamente afetado (FENT, 1998) (FIGURA 3).

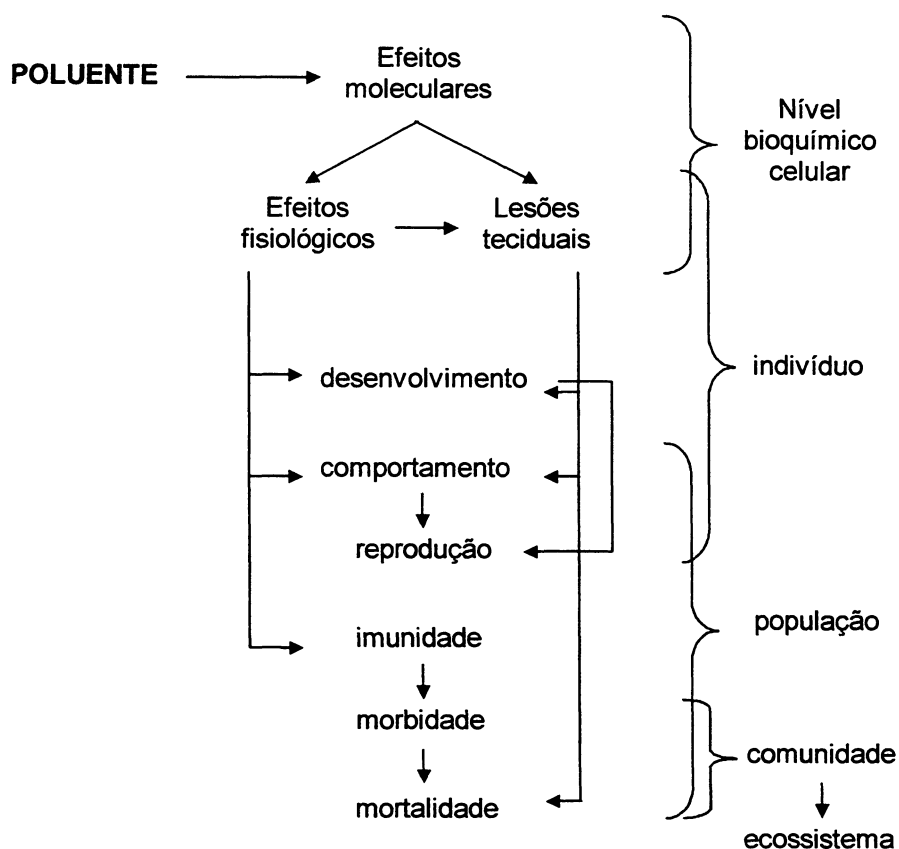


FIGURA 3 – Representação esquemática dos níveis de organização biológica onde podem ser observados efeitos de poluentes ambientais.

Biomarcadores podem ser identificados em cada um destes níveis organizacionais. Porém é nos níveis mais básicos, nas respostas bioquímicas e moleculares, que os efeitos iniciais dos poluentes são observados. Nestas situações as alterações dos poluentes podem ser reversíveis, de forma que medidas preventivas possam ser tomadas evitando o comprometimento mais severo do ambiente (HUGGETT et al, 1992; LEAVER, 1996).

Os biomarcadores podem ser classificados em duas categorias: de exposição e de efeito. **Biomarcadores de exposição** são aqueles que indicam se um indivíduo foi ou está exposto a alguma espécie de poluente sem, no entanto, permitir qualquer inferência a respeito do grau de efeitos adversos causados. **Biomarcadores de efeito** são aqueles que demonstram a ocorrência de um efeito tóxico no organismo estudado (WALKER et al., 1996). Geralmente, as alterações bioquímicas podem ser consideradas marcadores tanto de exposição como de efeito (HUGGETT et al, 1992).

As respostas biológicas causadas por contaminantes ambientais podem ser específicas a um determinado poluente, como a inibição da enzima ácido aminolevulínico desidratase (ALAD) causada na contaminação por chumbo; ou podem ser bastante inespecíficas, como a resposta indutora do sistema das monooxigenases causada por uma variedade de substâncias.

Uma questão que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos. Se a resposta for positiva, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação. Por esta razão biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação (WALKER et al., 1996).

Para compreender completamente os efeitos tóxicos dos contaminantes ambientais, é necessário correlacionar os primeiros efeitos moleculares com os efeitos em níveis de organização mais elevados, no entanto, esta relação é dificilmente detectável (HUGGETT et al, 1992; WALKER et al., 1996).

Biomarcadores indicam se um grupo de organismos num dado ambiente está dentro de seus padrões fisiológicos normais. Isto pode ser facilmente compreendido fazendo uma analogia com os exames de bioquímica clínica da medicina humana. Ou seja, uma bateria de testes pode ser realizada para determinar se um indivíduo ou grupo de indivíduos estão saudáveis. Para isso, é necessário determinar que espécies e que testes deverão ser realizados. As espécies indicadoras (**bioindicadores**) devem ter seus padrões normais conhecidos a as metodologias padronizadas. Quanto aos testes que devem ser escolhidos, a especificidade e o grau de relação que pode ser estabelecido entre a contaminação e o efeito devem ser considerados. Tanto testes

específicos como genéricos têm utilização em programas de monitoramento ambiental (WALKER et al., 1996).

A utilização de biomarcadores para detecção de contaminação ambiental é um assunto pouco abordado no Brasil até o momento (SILVA DE ASSIS, 1998; BAINY et al., 1999). Na Europa e América do Norte espécies-chave tiveram alguns padrões fisiológicos normais determinados, o que permite sua utilização como espécies bioindicadoras.

No Brasil esta etapa se encontra em desenvolvimento. Alguns autores têm explorado o assunto e colaborado para a padronização de biomarcadores em espécies nativas (CUNHA BASTOS et al., 1989; LEITÃO et al., 2000).

Neste trabalho serão apresentados dois biomarcadores que têm sido utilizados em programas de monitoramento ambiental.

1.3.1) Atividade da colinesterase

A acetilcolina (Ach) é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo. É encontrada em gânglios autonômicos, junções neuroefetoras parassimpáticas e neuromusculares somáticas, na medula adrenal e também no SNC. Uma vez liberada na fenda sináptica a Ach interage com receptores exercendo seus efeitos fisiológicos (ADAMS, 1992). As colinesterases (ChE) são as enzimas responsáveis pela hidrólise da Ach, regulando a transmissão do impulso nervoso (ADAMS, 1992; GALGANI et al., 1992).

Em vertebrados há dois tipos homólogos de ChE. A acetilcolinesterase (AchE) tem como função fisiológica a hidrólise da Ach em seus locais de ação (MASSOULIÉ et al., 1993). A butirilcolinesterase (BchE), também chamada pseudocolinesterase, é encontrada no plasma e em outros tecidos. Ela pode exercer alguma contribuição na atividade colinesterásica nos tecidos muscular e nervoso mas, de modo geral, sua função não é muito bem compreendida (MASSOULIÉ et al., 1993).

As ChEs possuem dois sítios ativos que identificam a molécula de Ach: uma região aniônica, onde ocorre ligação eletrostática com o nitrogênio catiônico da porção colina, e um local esterásico, onde a porção carboxila do éster acetil se liga covalentemente (FIGURA 4). A enzima promove a retirada da colina ficando acetilada para reagir com uma molécula de água e produzir

ácido acético. Ao fim do processo a enzima é reativada e a fração colina é prontamente reabsorvida por um processo de transporte sódio-dependente (ADAMS, 1992; DEUTCH e ROTH, 1999).

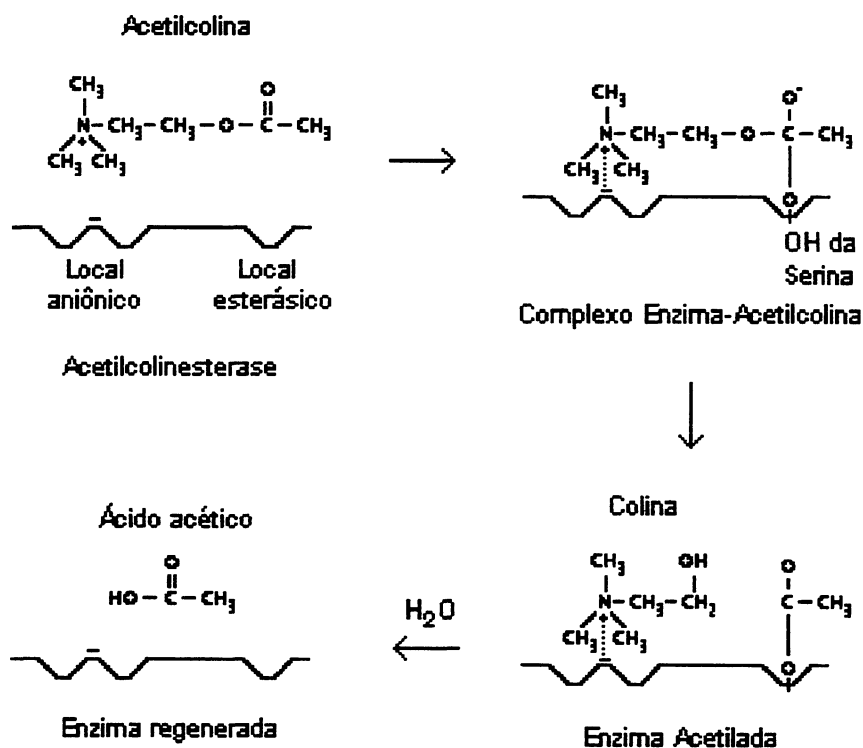


FIGURA 4 – Sítios de ligação e ação das ChEs sobre a Ach.

A inativação enzimática da AchE tem sido um campo importante no desenvolvimento de agentes farmacológicos. Substâncias anticolinesterásicas têm sido usadas desde a Primeira Guerra Mundial. Agentes neurotóxicos como o gás Sarin, são usados como armas químicas, enquanto compostos organofosforados (OP), carbamatos (CB) e ciclodienos são amplamente usados como inseticidas na agricultura industrial (DEUTCH e ROTH, 1999). À exceção dos agroquímicos, estima-se que pelo menos 5% de todos os produtos químicos industriais sejam providos de atividade neurotóxica (CARLSON et al., 1998).

Os inibidores da colinesterase intensificam a atividade da Ach endógena promovendo respostas colinomiméticas difusas decorrentes da ativação de

receptores muscarínicos e nicotínicos. Convulsões, atividade secretora exacerbada e aumento da motilidade gastrointestinal são observados. A morte pode sobrevir em decorrência da penetração do composto inibidor no SNC (ADAMS, 1992).

A inibição causada por anticolinesterásicos pode ser reversível ou irreversível. Compostos organofosforados, por exemplo, interagem com as colinesterases no local esterásico e formam um complexo inibidor enzimático extremamente estável que não sofre dissociação espontânea significativa. Assim, a enzima fica permanentemente fosforilada e a recuperação de sua atividade depende da síntese de nova enzima (ADAMS, 1992).

Outros compostos além de OP e CB parecem ter a capacidade de inibir as colinesterases, incluindo o endosulfano (GILL et al., 1990; DIAMANTINO et al., 2000; GARCIA et al., 2000). Porém, segundo STURM et al. (2000), as concentrações destes outros inibidores requeridas para promover efeitos sobre a AChE seriam relativamente altas em comparação com OP e CB.

A medida da inibição da colinesterase é amplamente aceita como método diagnóstico de exposição a agentes anticolinesterásicos em vertebrados (STANSLEY, 1993). Desde a década de 1950 os efeitos dos anticolinesterásicos vêm sendo estudados em organismos não intencionalmente expostos, particularmente em peixes (WEISS, 1958; ABOUDONIA e MENZEL, 1967; SZABÓ et al., 1992; MAGNOTTI et al, 1994; STURM et al., 1999a). Por este motivo, a AchE pode ser considerada um dos mais antigos biomarcadores em peixes (STURM et al., 2000).

Variações específicas de atividade são inúmeras e a viabilidade do uso das ChEs como biomarcadores de poluição aquática depende da sua caracterização nas diferentes espécies (LUNDIN, 1962; JOHNSON e WALLACE, 1987, STURM et al., 1999a). Neste trabalho pretende-se determinar a atividade colinesterásica em *Ancistrus* sp. e investigar o efeito do composto endosulfano sobre a mesma.

1.3.2) Citocromo P450

A família de enzimas coletivamente chamadas de citocromo P450 (CYP450) representa a principal via metabólica da fase I da biotransformação. Podem também ser chamadas de monooxigenases e fazem parte do sistema de oxidases de função múltipla (MFO). São enzimas que desempenham um papel essencial no metabolismo de componentes endógenos (hormônios esteróides, prostaglandinas, ácidos graxos e sais biliares), substâncias exógenas naturais, fármacos e xenobióticos (DIGIULIO et al., 1995).

Cerca de uma centena de genes para CYP450 já foram seqüenciados entre organismos procariontes e eucariontes (DIGIULIO et al., 1995). A nomenclatura é baseada no grau de similaridade entre a seqüência de aminoácidos das diversas isoenzimas. Assim, 40% de similaridade corresponde a isoenzimas de uma mesma família (CYP1, CYP2, p.e.), 70% de similaridade corresponde a isoenzimas de uma mesma subfamília (CYP1A, CYP2C, p.e), já uma similaridade de 90% corresponde uma proteína específica (CYP1A1, CYP1A2, p.e.) (BUCHELI e FENT, 1995).

As monooxigenases são encontradas principalmente no retículo endoplasmático e mitocôndrias de fígado, rins, cérebro e intestino delgado, assim como em diversos outros órgãos (STEGEMAN e HAHN, 1994). Em vertebrados, a maior taxa de metabolismo ocorre no fígado (STURM et al., 2000) e é nesse órgão que as maiores quantidades de CYP450 são encontradas (JOHANNESSEN e DEPIERRE, 1978).

O sistema das MFOs é constituído pelos seguintes componentes: NADPH e a enzima NADPH citocromo P450 redutase, citocromo b_5 e a enzima citocromo b_5 redutase, além do próprio CYP450 e do substrato a ser biotransformado (BUCHELI e FENT, 1995).

Este sistema catalisa principalmente reações de hidroxilação, além de reações de epoxidação, desalquilação, desaminação, sulfoxidação e dessulfuração (DIGIULIO et al., 1995).

O CYP450 contém em sua molécula um grupamento prostético heme acceptor final de um sistema de transporte de elétrons. Quando o ferro do grupamento heme se encontra na forma reduzida (Fe^{2+}), o CYP450 pode combinar-se com monóxido de carbono (CO) o que vai lhe conferir uma absorvância máxima num comprimento de onda de 450 nm. Esta propriedade

ocorre somente se o CYP450 estiver intacto. Caso ocorra a degradação da enzima, a combinação com o monóxido de carbono vai gerar um pico de absorção em 420 nm (OMURA e SATO, 1964). Estes autores determinaram o primeiro método para mensurar a quantidade de CYP450.

Devido à importância do CYP450 nas interações químico-biológicas e nas respostas dos organismos a xenobióticos, suas diversas formas vêm sendo estudadas em muitas espécies. Isto inclui o homem, além de espécies de interesse comercial e também espécies selvagens expostas aos agentes químicos introduzidos no ambiente (STEGEMAN, 1993).

A exposição a xenobióticos como hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), dibenzofuranos, dibenzodioxinas entre outros, leva ao aumento da taxa de transcrição do gene específico para estes grupos químicos (CYP1A). Como resultado, haverá aumento nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) e maior tradução das respectivas isoenzimas com incremento da atividade catalítica.

O receptor que regula a expressão gênica do CYP1A é conhecido como receptor Ah (*aryl hydrocarbon*). A indução é iniciada pela ligação do xenobiótico a um complexo protéico que compreende o receptor Ah e a chaperona HSP 90 (*heat-shock protein 90*), a qual é liberada no momento desta ligação. O receptor Ah complexado com o xenobiótico liga-se então a uma enzima chamada ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear transferase*) e todo o complexo é transferido para o interior do núcleo celular. Agora os fatores de transcrição estão aptos a promover a transcrição do RNAm (STEGEMAN e HAHN, 1994).

O estudo das características do CYP450 em peixes é particularmente importante no âmbito da toxicologia aquática. Devido ao seu papel no metabolismo de xenobióticos, este sistema enzimático torna-se uma importante ferramenta na avaliação de risco no ambiente natural. Esta avaliação pode ser realizada tanto através da quantidade de CYP450 como pelo aumento da atividade catalítica do sistema. Muitos trabalhos exploram a utilização deste sistema enzimático como biomarcador de contaminação aquática (CUNHA BASTOS et al., 1989; NARBONNE et al., 1991; VAN DER OOST et al., 1991; SILVA DE ASSIS, 1998; BAINY et al., 1999).

1.4) ENDOSULFANO

O endosulfano (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzadioxatiepina 3-óxido) é um inseticida organoclorado (OC) pertencente ao grupo dos ciclodienos e tem ampla utilização na agricultura industrial (DEVI, et al., 1981; NAQVI e VAISHNAVI, 1993).

Sua classificação toxicológica varia entre as fontes consultadas. Segundo a Organização Mundial de Saúde - OMS, é considerado moderadamente tóxico e ganha relevância como poluente ambiental por sua ampla utilização (NAQVI e VAISHNAVI, 1993). Já na classificação da agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (US-EPA), é considerado um produto altamente tóxico.

A liberação de uso do endosulfano é devida ao fato deste produto ser considerado de baixa persistência no ambiente em comparação aos demais compostos organoclorados, como o DDT, endrin e dieldrin (DEVI et al., 1981; TOLEDO e JONSSON, 1992).

Segundo NAQVI e VAISHNAVI (1993), o composto é relativamente persistente com tempo de meia-vida variando de alguns meses até dois anos no solo e de um a seis meses na água, dependendo das condições climáticas, de anaerobiose e de pH. Segundo os mesmos autores, o endosulfano sofre pronta adsorção a partículas do solo podendo ser detectado em sítios contaminados.

MATTHIESSEN et al. (1982) afirmam que peixes acumulam o produto diretamente da água, sendo que a carga acumulada é perdida rapidamente quando os peixes são transferidos para um ambiente livre de pesticidas. Os autores também observaram que crocodilos e aves piscívoras também acumularam resíduos em magnitude semelhante aos níveis encontrados nas presas.

De modo geral, a toxicocinética do endosulfano em peixes é pouco conhecida, principalmente quando se trata de peixes neotropicais (JONSSON e TOLEDO, 1993). O metabolismo e a excreção parecem ser exercidos principalmente pelo fígado e pelos rins (DEVI et al., 1981; SWARUP et al., 1981; TOLEDO e JONSSON, 1992). Geralmente se observa que as

concentrações de resíduos encontrados nos tecidos sofrem incremento durante o período de exposição podendo atingir um estado de equilíbrio. Em seguida retornando a níveis mais baixos ou mesmo desaparecendo quando da remoção da fonte de contaminação (MATTHIESSEN et al., 1982; NAQVI e VAISHNAVI, 1993).

DEVI et al. (1981) afirmam que, apesar do endosulfano ser um pesticida seguro, ele pode causar sérios problemas no ambiente aquático. É unânime entre diversos autores a opinião de que a toxicidade para organismos aquáticos seja extremamente elevada, principalmente para peixes. (DEVI et al., 1981; SWARUP et al., 1981; MATTHIESSEN et al., 1982; NAQVI e VAISHNAVI, 1993; TOLEDO e JONSSON, 1992; JONSSON e TOLEDO, 1993). Com relação aos efeitos sobre a atividade colinesterásica existe considerável controvérsia entre os autores (ZINKL et al., 1991; NAQVI e VAISHNAVI, 1993; PAYNE et al., 1996).

2) OBJETIVOS

Objetivo geral:

Padronizar os métodos para avaliação dos biomarcadores atividade colinesterásica, quantidade de CYP450 total e quantidade de CYP1A na espécie de peixe *Ancistrus* sp. (cascudo).

Objetivos específicos:

- determinar os valores de atividade colinesterásica, quantidade de CYP450 total e quantidade de CYP1A em *Ancistrus* sp.;
- avaliar os efeitos da contaminação por endossulfano administrado em doses subletais por via intracelomática na atividade colinesterásica em *Ancistrus* sp.
- avaliar os efeitos da contaminação por endossulfano administrado em doses subletais por via intracelomática na quantidade de CYP450 total em *Ancistrus* sp.
- avaliar os efeitos da contaminação por endossulfano administrado em doses subletais por via intracelomática na quantidade de CYP1A em *Ancistrus* sp.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) OBTENÇÃO DOS PEIXES

Exemplares da espécie *Ancistrus* sp. ($10,7\text{g} \pm 0,75$ (peso \pm ep)) foram coletados no Rio Marumbi, afluente do Rio Nhundiaquara localizados no município de Morretes no Estado do Paraná. A coleta foi realizada manualmente no período noturno com auxílio de uma lanterna submersa. Os animais foram transportados ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR. Na chegada ao laboratório, os peixes foram transferidos para aquários-estoque de 120 litros previamente preparados.

3.2) ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES

Os peixes acondicionados nos aquários-estoque permaneceram por um período mínimo de quinze dias sob condições controladas de fotoperíodo (12 horas claro /12 horas escuro), aeração constante e temperatura da água a 25°C.

3.3) DESENHO EXPERIMENTAL

Ensaio biológicos foram realizados em aquários teste de 30 litros que comportaram até doze peixes cada. A formação dos grupos experimentais foi realizada de modo aleatório. Peixes do aquário estoque foram medidos, pesados e receberam por via intracelomática uma injeção de endossulfano diluído em óleo de girassol no caso de grupos teste e somente de óleo de girassol, no caso dos grupos controle.

Após o período de exposição, cada peixe foi sacrificado por lesão do tecido cerebral. Imediatamente foram retirados o fígado, para extração microsomal e análise do CYP450, e amostras de músculo axial para análise da atividade colinesterásica.

O composto 3-metilcolantreno (3MC), potente indutor do CYP1A, gene responsável pelo metabolismo de xenobióticos em peixes foi usado para a padronização da metodologia de análise do CYP450 total.

3.3.1) Exposição Piloto ao Endossulfano (Pré-Experimento)

Este pré-experimento foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos comportamentais das doses de endossulfano preliminarmente propostas. Foram formados três grupos experimentais, com quatro peixes cada, que receberam as doses de 40, 4 e 0,4 mg/Kg, respectivamente denominados grupo 40, grupo 4 e grupo 0,4. Os peixes tiveram seu comportamento observado após 24, 48 e 96 horas da administração.

3.3.2) Exposição Aguda Letal ao Endossulfano (40mg/Kg)

Para avaliar a resposta da atividade colinesterásica e da quantidade de CYP 450 total na exposição aguda ao endossulfano foram formados três grupos experimentais de seis peixes. O grupo controle recebeu apenas o veículo, óleo de girassol, sendo o volume administrado similar aos grupos teste. Dois grupos teste foram contaminados com o endossulfano na dose de 40 mg/Kg.

A partir do momento em que os peixes dos grupos teste passaram a apresentar sinais de intoxicação (8 horas de exposição) um grupo foi sacrificado para coleta de amostras. O segundo grupo e o grupo controle foram sacrificados 24 horas após a administração da droga.

3.3.3) Exposição Aguda Sub-Letal ao Endossulfano (4mg/Kg)

Dois bioensaios foram realizados para avaliar o efeito sub-letal da contaminação por endossulfano na atividade colinesterásica e na quantidade de CYP450 total. No primeiro experimento foram formados quatro grupos de cinco peixes. O grupo controle recebeu somente o veículo e foi sacrificado 96 horas após a administração. Três grupos teste receberam a dose de 4 mg/Kg e foram sacrificados com 24, 48 e 96 horas após a administração, respectivamente.

O segundo experimento foi realizado de forma idêntica com exceção do número amostral por grupo, que foi elevado para doze peixes.

3.3.4) Exposição ao 3-metilcolantreno (Citocromo P450 Total)

Para padronização da metodologia de análise do CYP450 total foram utilizados dois grupos experimentais. O grupo teste foi contaminado por via intracelomática com 30 mg/Kg de 3-metilcolantreno (3MC) em óleo de girassol, composto que tem a capacidade de induzir o CYP450 (LANGE, 1996). O grupo

controle recebeu somente o veículo pela mesma via e em igual volume ao grupo teste. Ambos os grupos foram sacrificados após 72 horas de exposição e os peixes tiveram os fígados retirados e conservados em nitrogênio líquido para posterior extração microssomal.

3.4) ANÁLISE DA ATIVIDADE COLINESTERÁSICA

A análise da colinesterase foi realizada pelo método de ELLMAN et al. (1961) modificado para microplaca por HERBERT et al. (1995).

O princípio da técnica é a exposição de um homogeneizado de tecido muscular e do reagente 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB) ao substrato acetiltiocolina. Este substrato é hidrolisado pela ChE muscular em tiocolina e acetato. A tiocolina resultante reage com o DTNB gerando o ânion 5-Tio-2-nitrobenzoato, responsável pelo aparecimento de coloração amarela, que é medida com espectrofotômetro a 415 nm (FIGURA 5).

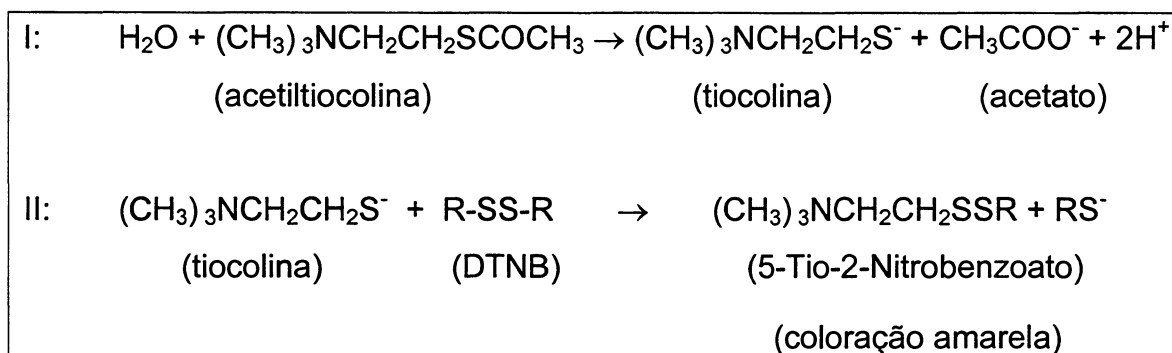


FIGURA 5 – Princípio do Método de Ellman.

3.4.1) Preparação da amostra

Amostras de músculo axial de cada peixe (200 a 300mg) foram homogeneizadas em Potter-Elvehjem em 2 ml de tampão fosfato (0,1M; pH 7,5). Estes homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 g a 4°C. O sobrenadante foi separado e o depósito descartado. Para a realização da análise, o extrato tecidual foi diluído a 1:50 e pipetado (50µl) nas cavidades da microplaca (quatro repetições). O DTNB preparado a 0,75mM foi adicionado (200µl) a cada amostra. O substrato acetiltiocolina foi preparado a 9 mM e adicionado (50µl) a cada cavidade imediatamente antes da leitura no

espectrofotômetro de microplaca a 415 nm. Foram realizadas seis leituras com intervalo de 1 minuto.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado a partir da equação de Lambert-Beer:

$$c = \frac{OD}{\epsilon \times d}$$

onde:

d = 0,9 cm (caminho óptico percorrido na microplaca)

$\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção)

Deste modo:

$$c \text{ ou } \eta \text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = \frac{(\Delta OD / \text{min}) \times 1000}{(13,6 \times 0,9)}$$

Para se obter a atividade enzimática específica a velocidade da reação foi relacionada à quantidade de proteína contida na amostra ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$):

$$\eta \text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} = \frac{c}{\text{vol.}/300 \times \text{concentração de proteína}}$$

vol. = μl da amostra / cavidade da microplaca

Os resultados de atividade colinesterásica obtidos nos experimentos foram analisados quanto à ocorrência de correlação com fatores como o peso, o tamanho e o sexo dos peixes.

3.5) ANÁLISE DO CITOCROMO P450

3.5.1) Extração Microssomal Hepática

A extração microssomal foi baseada nas metodologias descritas por STEGEMAN et al. (1979) e por SILVA DE ASSIS (1998).

As amostras de fígado foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em gelo. Cada amostra, com aproximadamente 1g de fígado, foi adicionada de 4 ml de tampão de homogeneização (0,08M Na₂HPO₄; 0,02M KH₂PO₄; 0,15M KCl; pH 7,4) e homogeneizada em Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 g a 4° C. O sobrenadante deste processo (fração S9) foi separado e ultracentrifugado por 80 minutos a 100.000 g a 4° C. O sobrenadante da ultracentrifugação foi descartado e o depósito ressuspensionado com 1ml de tampão de ressuspensão (tampão de homogeneização adicionado de 20% de glicerol (v/v); pH 7,4) obtendo-se a fração microssomal hepática.

Alíquotas de microssoma foram separadas em criotubos e conservadas em nitrogênio líquido. Uma porção do microssoma foi separada para análise da concentração de proteína.

3.5.2) Padronização da Metodologia (CYP450 Total)

A medida do CYP450 total foi baseada nos métodos de OMURA e SATO (1964), JOHANNESSEN e DEPIERRE (1978) e CUNHA BASTOS et al. (1989). O princípio dos métodos é a espectrofotometria diferencial entre uma amostra reduzida e incubada com monóxido de carbono (CO) e a mesma amostra oxidada. A análise espectrofotométrica foi realizada em um equipamento Beckman DU-650.

Estes diferentes protocolos foram testados e avaliados em suas vantagens e desvantagens chegando-se, por fim, a um protocolo que se adequou à espécie em estudo. Tais testes preliminares foram feitos a partir de amostras de peixes injetados com 3MC (controle positivo).

O monóxido de carbono necessário para marcação do citocromo P450 foi inicialmente produzido a partir do gotejamento de ácido fórmico em ácido sulfúrico concentrado e aquecido (ASSUMPÇÃO e MORITA, 1968). Posteriormente passou-se a produzir este gás a partir do gotejamento de ácido

sulfúrico sobre formiato de sódio aquecido. O gás resultante foi purificado através da passagem por uma solução de KOH e Na₂S₂O₄ (1:2) e uma solução de CaCl₂.

Estes métodos para produção do monóxido de carbono (CO) mostraram-se ineficientes, assim optou-se por utilizar o gás industrializado, envasado em cilindro. Este equipamento possibilita que o gás seja borbulhado em amostras contidas num tubo de ensaio sem que haja risco de destruição da amostra por impurezas que acompanham o gás produzido em laboratório.

Após a definição do protocolo experimental usado, foram realizadas algumas análises para confirmar a viabilidade do método. Algumas amostras hepáticas foram perfundidas antes da extração microssomal, visando a remoção de resíduos de hemoglobina que podem interferir nos resultados. A perfusão foi realizada através da injeção de solução salina 0,9% em cada fragmento de fígado retirado até que o mesmo assumisse uma coloração amarelada. A seqüência da extração microssomal foi realizada conforme descrito anteriormente (item 3.5.1).

Também o efeito da variação na temperatura de conservação das amostras de microssoma foi avaliado. Foram comparados os resultados de amostras mantidas em nitrogênio líquido (-196°C) e de amostras que foram mantidas em nitrogênio líquido, transferidas para gelo seco (-80°C) e posteriormente recolocadas em nitrogênio líquido.

3.5.3) Análise do Citocromo P450 Total

Cada amostra de microssoma foi diluída com tampão de ressuspensão em um tubo de ensaio em proporção adequada para obter a concentração de 1mg de proteína por ml. Este conteúdo foi adicionado de 50µl de fenasina metassulfato 20 µM, 50µl de ascorbato de sódio 2 mM e borbulhado com monóxido de carbono durante 30 segundos. Transferido para a cubeta, este conteúdo foi colocado no espectrofotômetro para registro da curva de referência entre 400 e 650 nm. Após este registro, foram adicionados à cubeta alguns cristais de ditionito de sódio e o conteúdo foi misturado por inversão. Com a cubeta recolocada no equipamento foi realizada nova leitura. O resultado representa a diferença entre o espectro reduzido e marcado com CO

e o espectro oxidado. Cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico foram usadas.

A quantidade de CYP450 total foi determinada com base no coeficiente de extinção de $91 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ para a diferença entre as absorvâncias em 450 e 490nm.

$$\eta \text{mol.ml}^{-1} = \frac{\text{Abs (450-490)}}{91} \times 1000$$

Considerando-se a concentração de proteína adicionada à cubeta:

$$\eta \text{mol.mg proteína}^{-1} = \frac{\eta \text{mol.ml}^{-1} \times \text{fd}}{[\text{proteína}]}$$

onde:

fd = fator de diluição da amostra microsomal hepática

[proteína] = concentração de proteína na amostra microsomal hepática

3.5.4) Análise do Citocromo P450 1A (*Western Blot*)

Para a quantificação da isoforma CYP1A foi usada a técnica de *western blotting* que consiste na separação eletroforética das proteínas microsomais, transferência das mesmas para uma membrana de nitrocelulose, marcação com anticorpos, revelação por autoradiografia e quantificação por densitometria.

Para a eletroforese foram preparadas duas soluções de gel SDS-poliacrilamida. Uma para o gel de entrada (acrilamida 5%), onde as amostras foram aplicadas, e outra para o gel de corrida (acrilamida 12%), no qual as proteínas das amostras foram separadas por peso molecular, formando bandas.

Para a eletroforese as amostras de microsoma foram diluídas a uma concentração final de $40 \mu\text{g}$ de proteína em tampão de tratamento com β -mercaptoetanol (TRIS 0,25M, 40% de glicerol, 4% SDS, azul de bromo fenol, β -mercaptoetanol 0,5%, pH 6,8). O tratamento das amostras consistiu na fervura

fervura por 3 minutos e centrifugação por 5 minutos a 2000 g. As amostras foram então aplicadas aos poços no gel de entrada.

Com a cuba para eletroforese montada, foi adicionado o tampão de corrida e foram ligados os eletrodos a 80 volts até as amostras atingirem o limite entre os géis de entrada e de corrida. A partir daí a voltagem foi ajustada para 120 volts até que a corrida estivesse completa.

Terminada a eletroforese, o gel foi retirado e lavado com água bidestilada para realização da transferência para a membrana de nitrocelulose. O sistema de transferência foi montado intercalando-se uma esponja fina, um filtro de papel, o gel, a membrana de nitrocelulose. Este sistema foi colocado na cuba com tampão CAPS-Metanol 10% para transferência a 400 mA por 60 minutos, sob agitação e resfriado.

Após a transferência, o sistema foi desmontado e a membrana retirada. O próximo passo foi o bloqueio dos sítios de ligação para imunoglobulinas na membrana com solução de leite em pó desnatado diluído a 5% em TBS (0,05M TRIS; 0,15M NaCl; pH 7,5). A membrana foi imersa na solução bloqueadora e agitada vagarosamente por 60 minutos.

Depois disto, a membrana foi lavada em água destilada para retirar o excesso de solução de bloqueio. Após a lavagem a membrana foi incubada no anticorpo primário (anticorpo 1-12-3 anti-P450 de *Stenotomus chrysops* (CYP1A)) durante 90 minutos. Depois do término da incubação a membrana foi lavada 3 vezes alternadamente em TBS, água destilada e TBS com Tween 0,5%.

Posteriormente a membrana foi incubada no anticorpo secundário (anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase) por mais 90 minutos. Após o período de incubação, a membrana foi lavada da mesma forma utilizada anteriormente após a incubação com o anticorpo primário. A revelação das bandas foi realizada pelo método de quimioluminescência de acordo com as instruções do kit da *Amersham Pharmacia*.

As autoradiografias foram digitalizadas em *scanner* e analisadas por densitometria com auxílio do *software Scion Image* (NIH *Image for Windows PC*). A concentração relativa de CYP1A foi determinada por comparação da densidade integrada por μg de proteína em cada amostra.

3.6) CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteína das amostras utilizadas nas diferentes análises realizadas neste trabalho foi determinada segundo o método de BRADFORD (1976), utilizando soro albumina bovina como padrão.

3.7) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos foram analisados estatisticamente por Anova de uma via seguido da Prova de Bonferroni para comparação entre os grupos. Nas comparações de dois grupos foi usado o teste-*t* não pareado seguido da correlação de Welch. Para testar a correlação entre parâmetros foi realizada a correlação de Pearson.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) ANÁLISE DA ATIVIDADE COLINESTERÁSICA

4.1.1) Exposição Piloto ao Endossulfano (Pré-Experimento)

Após 24, 48 e 96 horas da administração do endossulfano por via intracelomática em três grupos de peixes nas doses de 40 mg/Kg (grupo 40), 4 mg/Kg (grupo 4) e 0,4 mg/Kg (grupo 0,4), foram observadas alterações comportamentais.

Após 24 horas da administração foi registrada a morte de um peixe do grupo 40. Os demais peixes deste grupo apresentaram extensões repetidas das nadadeiras, seguidas de natações rápidas e de períodos de relaxamento. As espículas operculares permaneceram protraídas. Aparentemente os peixes respondiam mais intensamente a estímulos, como o contato com outro indivíduo. Nenhum deles estava aderido às paredes do aquário, comportamento observado nos grupos 4 e 0,4.

Dentro desse mesmo período os peixes do grupo 4 apresentavam-se mais ativos que os do grupo 0,4 porém menos ativos que os do grupo 40. Somente um peixe do grupo 4 estava aderido à parede do aquário. As nadadeiras dos peixes deste grupo estavam, em geral, relaxadas.

Em 24 horas não foram observadas alterações no grupo 0,4. Todos os peixes encontravam-se aderidos às paredes do aquário, com as nadadeiras relaxadas.

Após 48 horas da administração, o comportamento de extensão de nadadeiras e cauda persistia nos peixes do grupo 40. Contrações musculares espásticas foram observadas neste grupo. Um indivíduo apresentava dificuldade em manter a posição normal, nadando eventualmente em decúbito dorsal. Nos grupos 4 e 0,4 não foram mais observadas alterações comportamentais.

Passadas 96 horas de exposição todos os peixes do grupo 40 morreram, enquanto os peixes dos grupos 4 e 0,4 não demonstravam sinais de intoxicação.

As alterações comportamentais observadas sugerem a ocorrência de um efeito neurotóxico. Comportamento semelhante, incluindo hiperatividade, movimentos de natação rápida e contrações musculares espásticas, foi relatado por CARLSON et al. (1998) ao avaliar os efeitos neurológicos do endosulfano sobre a reação de alarme na espécie *Oryzias latipes*. DROMMOND e RUSSOM (1990) e BRADBURY et al. (1991) também constataram tal comportamento em outras espécies de peixes expostas ao endosulfano.

Através deste experimento foi possível determinar a dose aguda letal (40 mg/Kg) e a dose aguda sub-letal (4 mg/Kg) de endosulfano que foram usadas para estudar os efeitos deste composto sobre os biomarcadores avaliados neste trabalho.

4.1.2) Exposição Aguda Letal ao Endosulfano (40 mg/Kg)

Os resultados obtidos da atividade colinesterásica muscular em peixes expostos de forma aguda ao endosulfano, na dose de 40 mg/Kg e mortos após 8 e 24 horas de exposição são apresentados no GRÁFICO 1. O grupo controle (n=4) apresentou atividade de $42,4 \pm 4,44 \text{ } \eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$. Os grupos 8 e 24 horas (n=6) apresentaram, respectivamente $51,5 \pm 11,4 \text{ } \eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$ e $46,3 \pm 4,38 \text{ } \eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

4.1.3) Exposição Aguda Sub-Letal ao Endosulfano (4mg/Kg)

Os resultados do primeiro experimento com a dose sub-letal de endosulfano (4 mg/Kg), no qual os peixes foram sacrificados após 24, 48 e 96 horas da exposição são apresentados no GRÁFICO 2. O grupo controle apresentou $54,6 \pm 7,73 \text{ } \eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$ de atividade colinesterásica, ao passo que os grupos 24, 48 e 96 apresentaram, respectivamente, $38,8 \pm 6,64$, $46,3 \pm 7,80$ e $37,4 \pm 5,75 \text{ } \eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos deste ensaio.

Os resultados do segundo experimento de exposição ao endosulfano na dose de 4 mg/Kg estão apresentados no GRÁFICO 3. O grupo controle

apresentou atividade colinesterásica de $37,4 \pm 7,45 \text{ } \eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$, ao passo que os grupos 24, 48 e 96 horas apresentaram, respectivamente, $46,1 \pm 15,6$, $34,5 \pm 5,21$ e $49,6 \pm 12,14 \text{ } \eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$. Assim como no primeiro experimento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos deste ensaio.

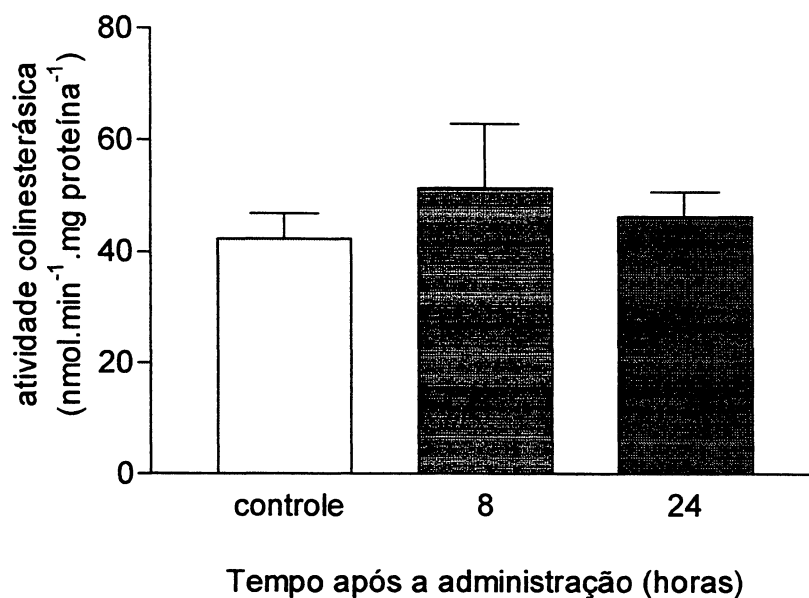


GRÁFICO 1 - Atividade colinesterásica de cascudos (*Ancistrus* sp.) expostos ao endossulfano a 40 mg/Kg.

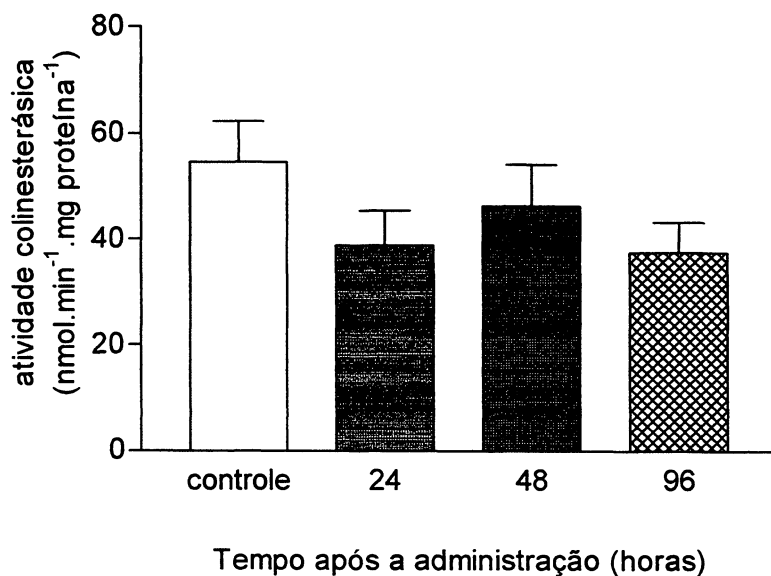


GRÁFICO 2 - Atividade colinesterásica de cascudos (*Ancistrus* sp.) expostos ao endossulfano a 4 mg/Kg (1º experimento).

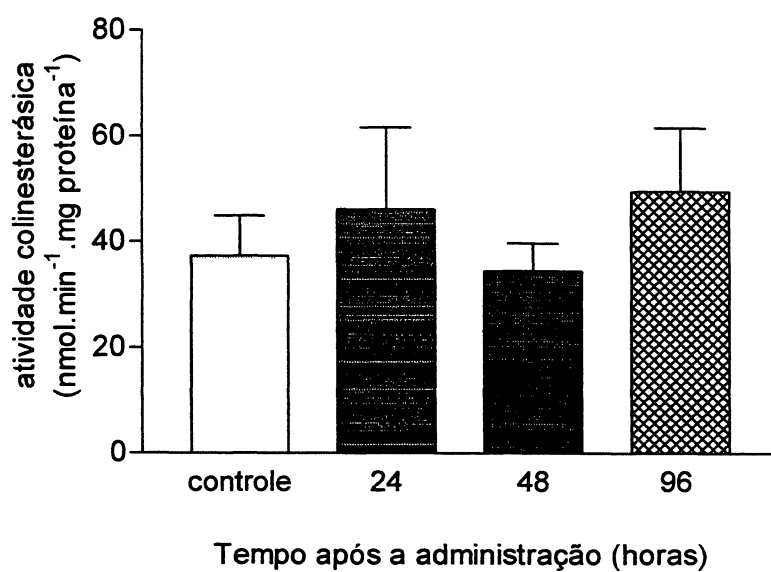


GRÁFICO 3 - Atividade colinesterásica de cascudos (*Ancistrus* sp.) expostos ao endossulfano a 4mg/Kg (2º experimento).

Os resultados observados neste trabalho demonstram que a atividade colinesterásica de tecido muscular da espécie *Ancistrus* sp. não sofreu inibição nas condições experimentais testadas.

A atividade do endossulfano como inibidor da colinesterase é motivo de controvérsia na literatura. Na revisão realizada por NAQVI e VAISHNAVI (1993) é citado que o endossulfano causou a inibição da acetilcolinesterase (AChE) em tecido cerebral de ratas expostas à dose de 4,6 mg/Kg/dia via alimento durante 13 semanas. Em ratas expostas à dose de 27,2 mg/Kg/dia pela mesma via e pelo mesmo período foi registrado um declínio da atividade da AChE plasmática.

MALLIK et al. (2000) avaliaram o efeito da exposição de ratos ao endossulfano por via oral por um período de 30 dias. Neste estudo, a atividade da AChE de tecido cerebral aumentou nos grupos tratados com endossulfano em relação ao grupo controle.

Um aumento da atividade colinesterásica também foi observado em ratas tratadas com 60 e 360 ppm de endossulfano. Este aumento de atividade regrediu durante um período de recuperação após a exposição (IPCS-INCHEM, 2002).

Em um estudo que avaliou os efeitos do endossulfano sobre a capacidade de aprendizado em ratos foi observado que a atividade da AChE cerebral foi similar nos grupos controle e nos grupos em tratamento, não havendo evidências de que o composto tenha causado inibição enzimática (PAUL et al., 1994).

Resultados provenientes de trabalhos com ratos não podem ser simplesmente extrapolados para peixes. Sabe-se que as colinesterases de peixes apresentam peculiaridades em relação às colinesterases de vertebrados superiores (MAGNOTTI et al., 1994; STURM et al., 2000).

O endossulfano não causou redução significativa da atividade da AChE cerebral na espécie de peixe *Channa punctatus* (INBARAJ e HAIDER, 1988). Neste mesmo trabalho, o organofosforado malation causou inibição dose dependente da atividade da AChE no cérebro destes peixes (INBARAJ e HAIDER, 1988).

GILL et al. (1990), estudando os efeitos do endossulfano, de OP e de CB sobre a modulação enzimática em tecidos do peixe *Puntius conchoni*,

observaram que o endosulfano causou a inibição da ChE em tecido cerebral e a indução desta enzima em músculo esquelético e no fígado. Os autores atribuíram esta indução à pseudocolinesterase, enzima sintetizada no fígado.

Organofosforados e carbamatos são grupos de compostos químicos bastante estudados e que apresentam a capacidade de causar a inibição da atividade colinesterásica, pois esta enzima é o local de ação destas substâncias. No entanto, outros compostos incluindo metais pesados, hidrocarbonetos, detergentes e o próprio endosulfano, parecem ter a capacidade de inibir as colinesterases (GILL et al., 1990; ZINKL et al., 1991; PAYNE et al., 1996). Porém, segundo STURM et al. (2000), as concentrações necessárias para que estas substâncias promovam efeitos sobre a AchE seriam comparativamente altas em relação a OP e CB.

Apesar de não ter sido observada inibição da atividade colinesterásica nas doses e nos tempos de exposição avaliados neste trabalho, o comportamento dos peixes observado na exposição piloto ao endosulfano como hiperatividade, aumento da resposta a estímulos e incapacidade de aderir às paredes do aquário, sugerem a ocorrência de efeitos neurotóxicos. Estas alterações comportamentais podem ser decorrentes de um mecanismo de ação conhecido do endosulfano, que é o bloqueio da ação do neurotransmissor inibitório GABA (COATS, 1990; BRADBURY, 1991; SALEH et al., 1993; CARLSON et al., 1998). Este bloqueio ocorre pela ligação do endosulfano, assim como de outros compostos do grupo dos ciclodienos, ao sítio de ligação da picrotoxina nos receptores GABA_A, que são canais de cloro regulados pela ligação do GABA (COATS, 1990). Com a redução do influxo de íons Cl⁻, o limiar para despolarização é diminuído resultando em hiperexcitabilidade (RANG et al., 2001).

4.1.4) Correlação entre atividade colinesterásica com o comprimento e o peso dos peixes

A correlação entre a atividade da ChE e o peso dos peixes é apresentada na FIGURA 6. O coeficiente de correlação (R^2) encontrado foi 0,5174 e a correlação foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

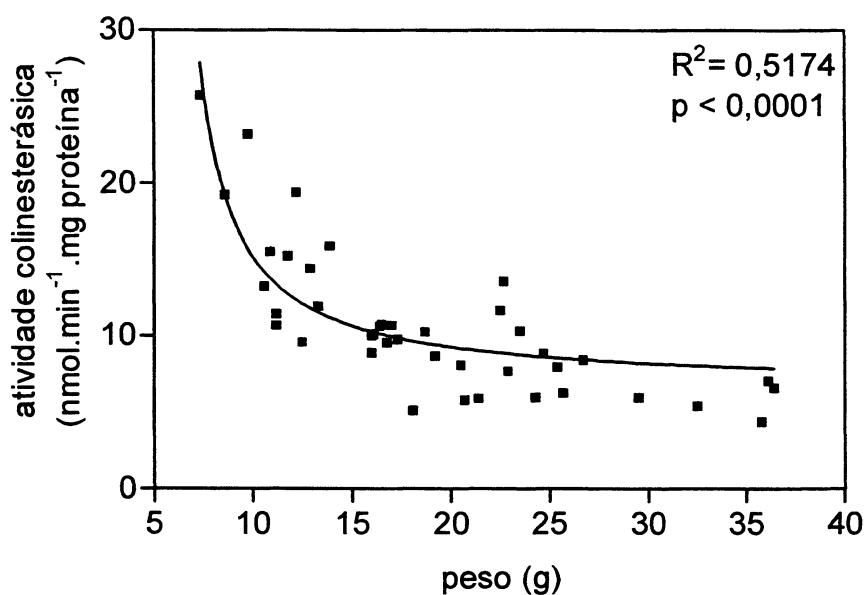


FIGURA 6 – Correlação entre atividade colinesterásica em músculo e o peso corporal de cascudos (*Ancistrus* sp.).

A correlação entre a atividade da ChE e o comprimento dos peixes é apresentada na FIGURA 7. O coeficiente de correlação (R^2) encontrado foi 0,5174 e a correlação foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

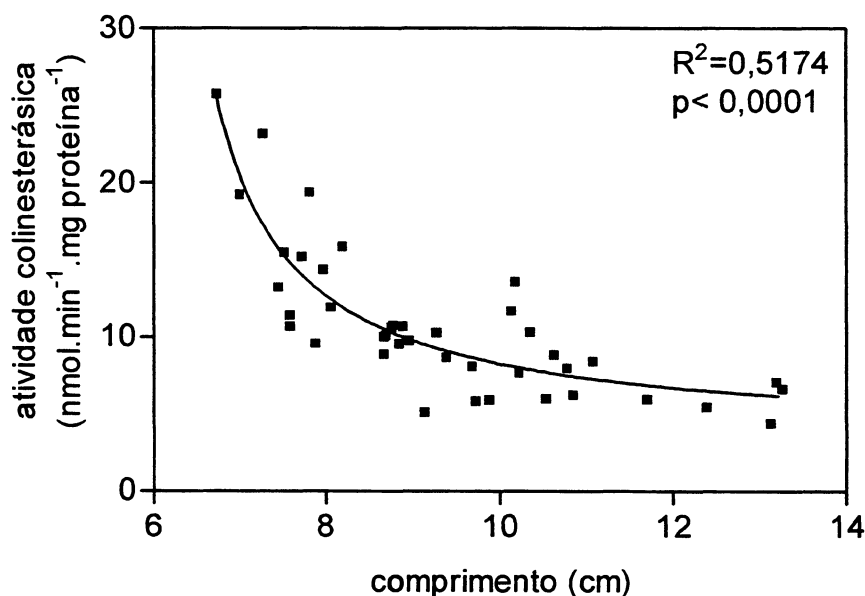


FIGURA 7 – Correlação entre atividade colinesterásica em músculo e o comprimento corporal de cascudos (*Ancistrus* sp.).

A atividade colinesterásica na espécie *Ancistrus* sp. apresentou correlação negativa com o peso e o comprimento dos peixes estudados.

Resultados semelhantes foram encontrados por LUNDIN (1962), que avaliou a atividade colinesterásica em diversos peixes, tanto da água doce como de água salgada. O autor concluiu que a atividade colinesterásica muscular esquelética obedeceu a uma relação inversa do comprimento corporal das espécies por ele investigadas.

Correlação negativa entre a atividade colinesterásica e peso e comprimento corporal de peixes da espécie *Gasterosteus aculeatus* foi também observada por STURM et al. (1999b).

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, 1943; SAWYER, 1944).

Esta informação se torna relevante no desenvolvimento de programas de monitoramento ambiental, onde é necessária a comparação da atividade colinesterásica de peixes coletados em diferentes locais e em diferentes estações do ano. Para aumentar a confiabilidade dos resultados é importante que sejam coletados peixes com pesos e comprimentos semelhantes para evitar erros na interpretação dos resultados.

4.1.5) Variação da atividade colinesterásica com o sexo dos peixes

A atividade colinesterásica de cascudos machos e fêmeas é apresentada no GRÁFICO 4. Não foi observada diferença estatística significativa entre as atividades de machos e fêmeas.

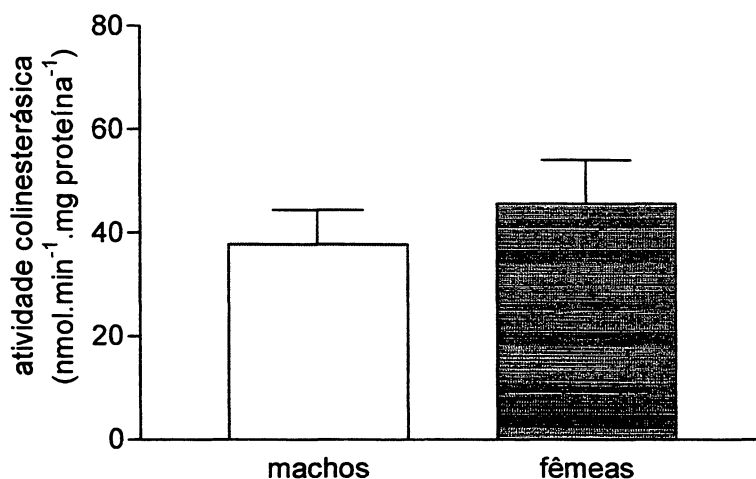


GRÁFICO 4 – Atividade colinesterásica em tecido muscular de cascudos (*Ancistrus* sp.) machos e fêmeas.

Diferença na atividade colinesterásica devida ao sexo parece não ser comum em peixes (GALGANI et al., 1992; STURM et al., 2000).

Na espécie *Gasterosteus aculeatus*, STURM et al. (1999b) não observaram diferença na atividade colinesterásica entre machos e fêmeas. KIRBY et al. (2000) igualmente não encontraram variações entre os sexos na espécie *Platichthys flesus*, assim com outros autores (HOGAN, 1970 *apud* KIRBY, 2000).

Os resultados do presente trabalho estão em concordância com estas afirmações.

Em vertebrados há dois tipos homólogos de ChE. A acetilcolinesterase (AChE) tem como função fisiológica a hidrólise da Ach em seus locais de ação. A butirilcolinesterase (BChE), que também é chamada pseudocolinesterase, é encontrada no plasma além de outros tecidos (MASSOULIÉ et al., 1993).

Em termos gerais, tem-se observado que o substrato acetiltiocolina (AcSCh) apresenta especificidade para AChE e BChE, ao passo que o substrato acetil- β -metiltiocolina (Ac β MeSCh) parece ser específico para a AChE e que o substrato butiriltiocolina (BuSCh) tem especificidade para a BChE (MASSOULIÉ et al., 1993; SILVER, 1974; USDIN, 1970).

Em peixes o tecido cerebral parece conter exclusivamente AChE (STURM et al., 1999a; SILVA DE ASSIS, 1998; STURM et al., 2000), enquanto o tecido muscular axial pode conter as duas formas de colinesterases (LUNDIN, 1962).

No entanto, as diversas formas parecem divergir em suas especificidades por substratos e susceptibilidade a inibidores em diferentes espécies (STURM et al., 1999a; STURM et al., 1999b; GILES, 2002). Colinesterases de peixes derivam da tipologia clássica das colinesterases de vertebrados e demonstram grande variação entre as espécies (STURM et al., 1999b).

Foi demonstrado, por exemplo, que a atividade da BChE encontrada em órgãos de carpa (*Cyprinus carpio*) é insignificante em relação à atividade da AChE em cérebro, músculo esquelético, músculo cardíaco e no plasma desta espécie (SZABÓ et al., 1992).

LUNDIN (1962), estudando as colinesterases de diversas espécies de peixes, observou que a maioria dos peixes de água salgada apresentavam a capacidade de hidrolisar o substrato butiriltiocolina, enquanto as espécies de água doce não foram capazes de hidrolisar este substrato. Já STURM et al. (2000) afirma que generalizações não podem ser feitas a este respeito e que a caracterização das colinesterases presentes no tecido da espécie em questão deve preceder qualquer investigação sobre colinesterases em peixes.

O uso do tecido muscular apresenta algumas vantagens em relação ao tecido cerebral, incluindo a facilidade de coleta e a maior quantidade de material disponível. Além disto, a colinesterase muscular apresenta outra perspectiva para avaliação de neurotoxicidade em comparação com a atividade colinesterásica cerebral (KIRBY et al., 2000). Como citado anteriormente, a atividade colinesterásica cerebral parece ser constituída unicamente de AchE, enquanto a colinesterase muscular é devida, em algumas espécies, à ação tanto da AchE como da BchE (LUNDIN, 1962; STURM et al., 1999a; SILVA DE ASSIS, 1998; STURM et al., 2000). A maior sensibilidade da BchE em comparação com a AchE frente a anticolinesterásicos (organofosforados) observada em alguns trabalhos (MAGNOTTI et al., 1994; STURM et al., 2000) sugere que a utilidade desta enzima seja mais adequada para a aplicação em programas de monitoramento ambiental (STURM et al., 2000).

A medida da atividade colinesterásica em peixes com o propósito de monitorar a poluição aquática tem sido bastante empregada, principalmente na Europa e na América do Norte (DIZER et al., 2001). Este biomarcador mostra-se bastante efetivo na identificação de contaminação por poluentes neurotóxicos, principalmente compostos OP e CB. Em relação às demais classes de contaminantes ambientais, no entanto, sua utilização pode não ser tão efetiva.

Muitos aspectos referentes às variações interespecíficas ainda estão por ser elucidados. Mesmo variações intraespecíficas precisam ser caracterizadas para a utilização confiável deste parâmetro bioquímico no monitoramento ambiental.

4.2) ANÁLISE DO CITOCROMO P450

4.2.1) Concentração Protéica dos Extratos Microssomais Hepáticos

Os resultados das análises da concentração de proteína obtida nos extratos microssomais são apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 – Concentrações de proteína microssomal hepática (μ S = microssoma).

AMOSTRA	N ^o PEIXES	GRAMAS POR POOL	CONCENTRAÇÃO (mg/ml)
μ S 3MC I 30 mg/Kg	10	1,05 g	13,71
μ S 3MC I controle	4	0,33 g	5,72
μ S 3MC II 30 mg/Kg	10	1,20 g	14,72
μ S 3MC II controle	10	1,03 g	11,82

4.2.2) Padronização da Metodologia para Citocromo P450 Total

4.2.2.1) Definição do protocolo experimental

Após as tentativas de produção do CO em laboratório observou-se que os resultados poderiam estar sendo prejudicados devido à presença de impurezas provenientes dos processos químicos de geração do gás. A segurança para o pesquisador também é maior quando se utiliza o gás industrializado e envasado em cilindro, pois os reagentes necessários à sua produção são altamente corrosivos.

O CO é um gás extremamente tóxico devendo-se tomar o cuidado de trabalhar com o equipamento dentro de capela ou ao menos em local muito bem ventilado. A realização de apnéia pelo pesquisador no momento da aplicação do gás nas amostras é recomendável.

As análises realizadas neste trabalho segundo o método de OMURA e SATO (1964) geraram o espectro diferencial apresentado na FIGURA 8.

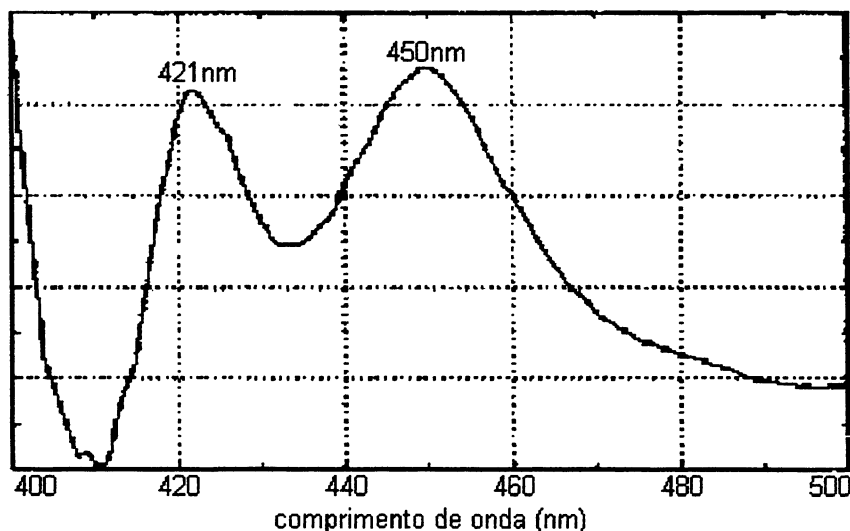


FIGURA 8 - Espectro diferencial de absorção de microsossoma hepático de cascudo (*Ancistrus* sp.) exposto por via intracelomática a 30mg/Kg de 3MC por 72 horas.

O pico observado em 450 nm é resultante da combinação do CYP450 ao monóxido de carbono. Já o pico em 420 nm é um resultado indesejável que pode ser decorrente da degradação do microsossoma (OMURA e SATO, 1964) ou da contaminação do mesmo com hemoglobina (JOHANNESSEN e DEPIERRE, 1978; STEGEMAN et al., 1979; CUNHA BASTOS et al., 1989).

JOHANNESSEN e DEPIERRE (1978) trabalhando com microsossomas de pulmão de rato observaram a ocorrência de picos de absorbância em 420nm e 450nm. Os autores propuseram que o pico em 420 nm era devido à alta contaminação do extrato microsossomal com hemoglobina e metahemoglobina (hemoglobina oxidada), uma vez que a perfusão do pulmão não era eficiente para a eliminação destas proteínas. Eles concluíram que seria necessário reduzir toda a hemoglobina oxidada sem reduzir o CYP450. Assim, quando o CO fosse borbulhado nas cubetas referência e amostra ele se ligaria à hemoglobina formando carboxi-hemoglobina que, contida em ambas as cubetas, teria seu pico em 420 nm retirado do espectro diferencial. Foi sugerido por esses autores, que a fenazina metassulfato (PMS) a 2,5 μ M, em conjunto

com ascorbato de sódio a 250 μM , seriam capazes de reduzir a hemoglobina sem reduzir o CYP450.

A PMS é um corante usado em reações de óxido/redução. Tem alto poder de oxidação sobre moléculas redutoras como NADH e NADPH e não requer poder enzimático para exercer tal função. É uma molécula hidrofóbica e quando reduzida, penetra na estrutura apolar da hemoglobina reduzindo a molécula de ferro oxidada (Fe^{3+}) do heme. O ascorbato atua como doador de elétrons para a PMS, uma vez que não pode reduzir a hemoglobina diretamente por não penetrar a estrutura molecular da mesma (BURTH, 1985).

CUNHA BASTOS et al. (1989), trabalhando com a espécie de peixe *Hypostomus punctatus*, pertencente à ordem Siluriformes, assim como a espécie usada neste trabalho (*Ancistrus* sp.), observaram a ocorrência do pico de absorção em 420 nm, além do pico esperado em 450 nm. Descartando a possibilidade de que isto fosse decorrente da degradação do CYP450 a CYP420 (OMURA e SATO, 1964), os autores adaptaram o método descrito por JOHANNESSEN e DEPIERRE (1978). Diferentes concentrações de PMS e ascorbato de sódio foram testadas em uma amostra de hemoglobina de *H. punctatus* para avaliar qual seria a mais adequada para inibir a formação de carboxi-hemoglobina nesta espécie. Os autores chegaram às concentrações de 20 μM e 2mM de PMS e ascorbato, respectivamente, para reduzir adequadamente a interferência da hemoglobina sobre a análise do CYP450.

Uma vez que o mesmo pico em 420 nm foi observado na análise do CYP450 total do *Ancistrus* sp., e que existe certa proximidade filogenética entre *H. punctatus* e *Ancistrus* sp. (Ordem Siluriformes), utilizou-se a metodologia sugerida por aqueles autores.

O resultado é apresentado na FIGURA 9. Observa-se que a metodologia foi adequada para redução da influência de hemoglobina e metahemoglobina contaminantes no microsoma da espécie *Ancistrus* sp.. Pode-se observar a diminuição gradativa do pico em 420 nm até a obtenção somente do pico referente ao CYP450.

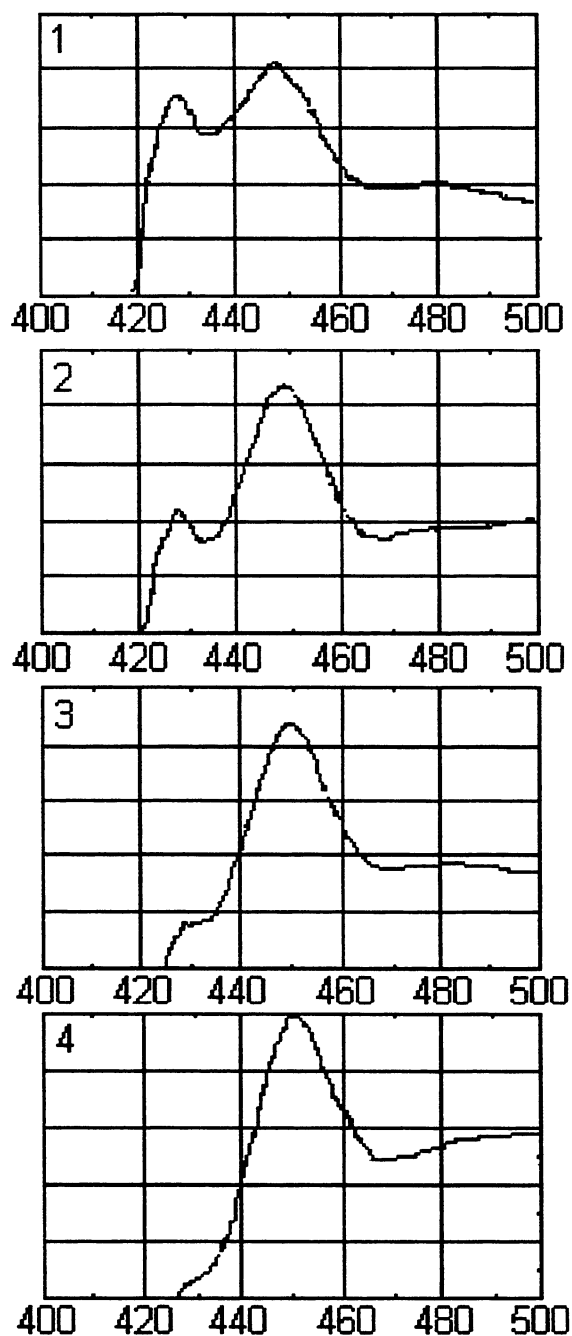


FIGURA 9 – Seqüência de espectros diferenciais de absorção de microsomas tratados com fenazina metassulfato $25\mu\text{M}$ e ascorbato de sódio 2 mM provenientes de peixes expostos por via intracelomática a 30mg/Kg de 3MC por 72 horas (1. medição imediata após a adição do ditonito de sódio; 2. medição 30 segundos após a adição do ditonito de sódio; 3. medição 1 minuto após a adição do ditonito de sódio; 4. medição 1 minuto e 30 segundos após a adição do ditonito de sódio).

4.2.2.2) Fatores Interferentes na Obtenção dos Espectros Diferenciais

4.2.2.2.1) Contaminação microssomal por hemoglobina

Dentre os espectros diferenciais obtidos foram observados picos em 425 ± 4 nm, 451 ± 1 nm e em 558 ± 3 nm, além de um vale próximo a 435 nm. Como pode ser observado na FIGURA 10, mesmo após a adição de PMS e de ascorbato de sódio, um pico próximo a 420 nm permaneceu presente em alguns espectros.

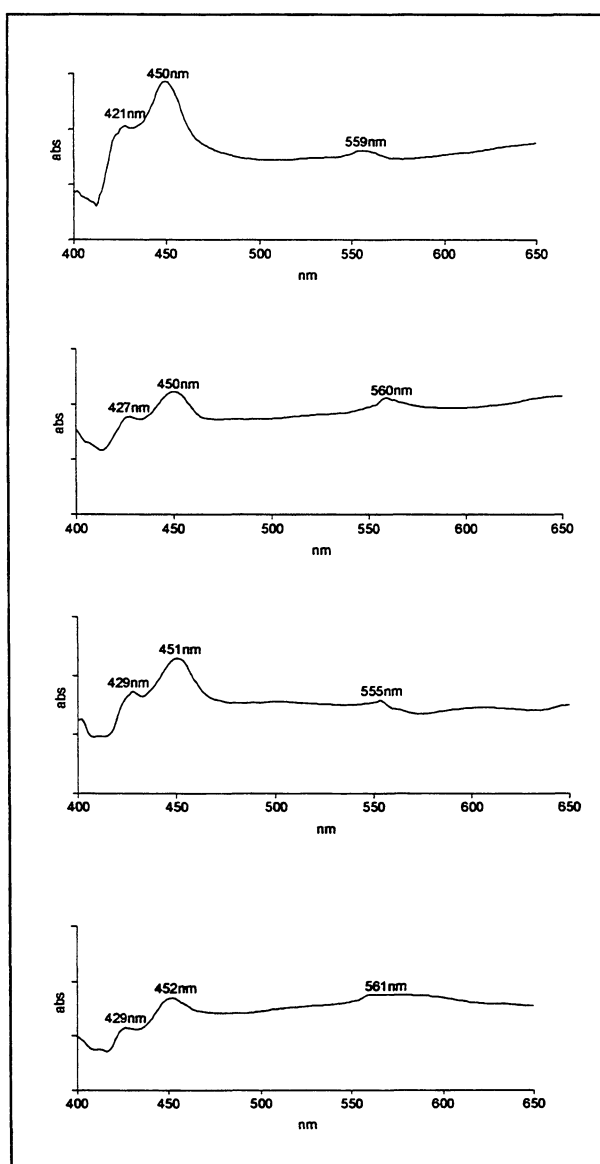


FIGURA 10 – Espectros diferenciais obtidos em análises do citocromo P450 total de microssomas de cascudos (*Ancistrus* sp.) com PMS e ascorbato de sódio.

Um espectro diferencial de uma amostra perfundida (item 3.5.2) é apresentado na FIGURA 11.

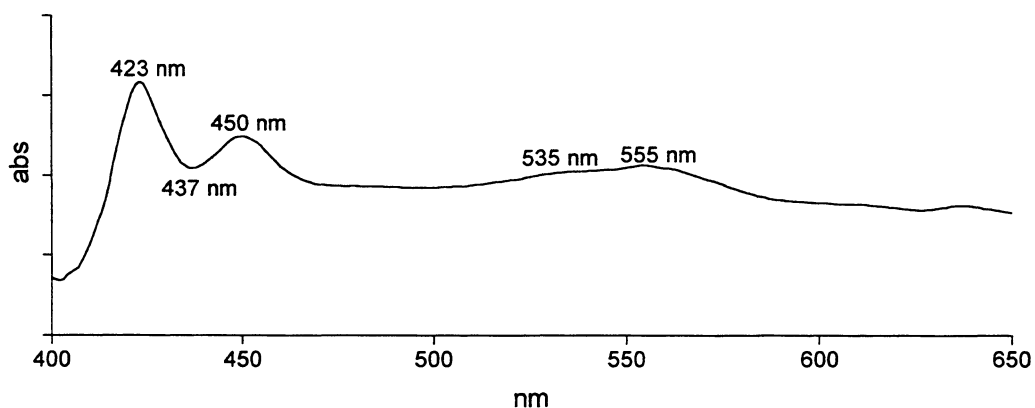


FIGURA 11 – Espectro diferencial de um microsossoma preparado a partir de amostras de fígado perfundidas com solução salina 0,9%.

Mesmo após a perfusão do tecido hepático o pico em 420 nm persistiu. Assim tratou-se com PMS e ascorbato de sódio uma amostra de microsossoma obtido de tecido perfundido. O resultado obtido é mostrado na FIGURA 12.

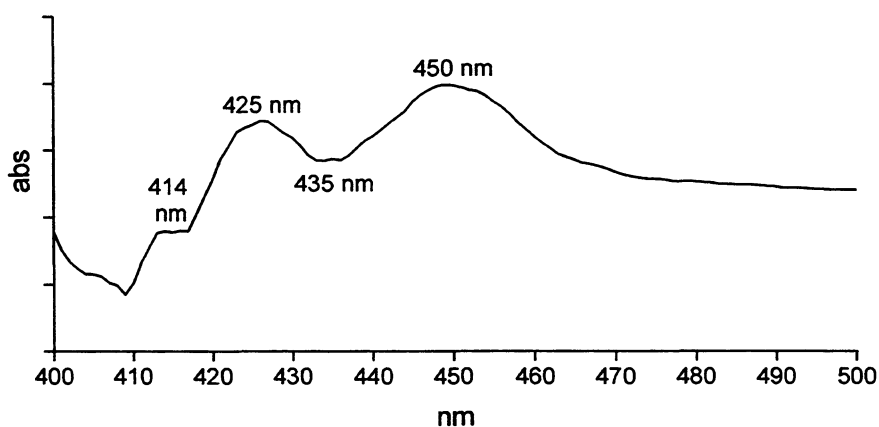


FIGURA 12 – Espectro diferencial de um microsossoma preparado a partir de amostras de fígado perfundidas com solução salina 0,9%, tratado com PMS e ascorbato de sódio.

Obteve-se uma redução, mas não a extinção do pico em 420 nm, sugerindo que a amostra ainda estava contaminada com hemoglobina, não tendo sido eficiente a perfusão realizada. Para resolver tal dúvida comparou-se o espectro mostrado na FIGURA 12 com o espectro diferencial de uma amostra de hemoglobina da espécie *Ancistrus* sp. tratada da mesma maneira que as amostras de microssoma. O resultado é apresentado na FIGURA 13.

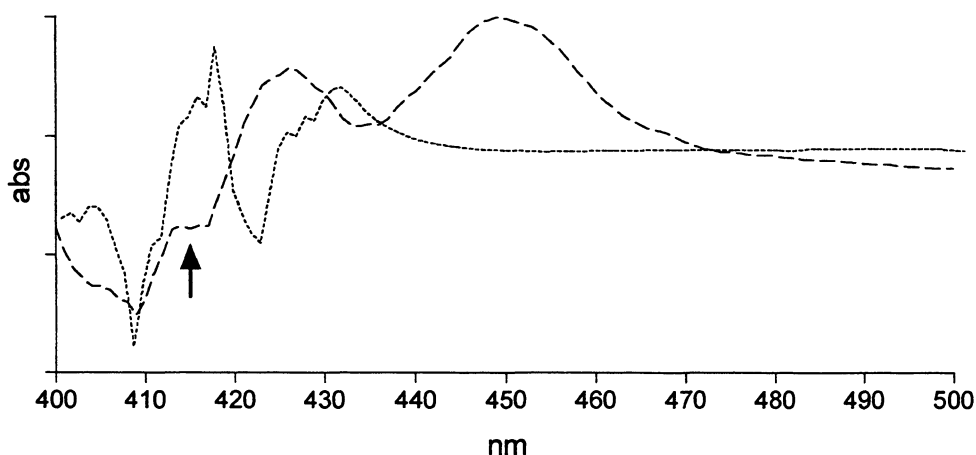


FIGURA 13 – Comparação dos espectros diferenciais de microssoma perfundido tratado com PMS e ascorbato de sódio (- - -) e de hemoglobina (.....) da espécie *Ancistrus* sp..

Note-se a coincidência dos vales em 409 nm em ambos os espectros e dos picos próximos a 415 nm no espectro da hemoglobina, causando o surgimento da linha entre 413 e 417 nm no microssoma (seta). Isto pode sugerir que a persistência do pico em 420 nm observada nos resultados deste trabalho tenha sido devida à contaminação das amostras com hemoglobina, uma vez que seja esperada a observação de características do espectro da hemoglobina no espectro microssomal contaminado por esta proteína.

4.2.2.2) Efeito da temperatura na conservação das amostras

Uma análise foi realizada com uma amostra de microsossoma que sofreu uma variação de temperatura, tendo sido transferida do nitrogênio líquido (-196° C) para gelo seco (-80° C) e depois novamente para o nitrogênio líquido sem que houvesse descongelamento. O resultado obtido foi comparado com uma amostra do mesmo material que foi mantida somente no nitrogênio líquido e analisada de maneira idêntica (FIGURA 14).

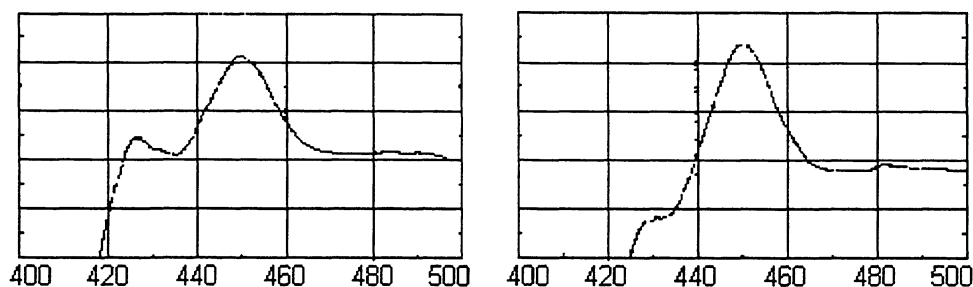


FIGURA 14 – Espectros diferenciais de amostras que sofreram variação de temperatura (esq.) e que não sofreram (dir.).

A amostra que sofreu variação de temperatura apresentou uma quantidade de CYP450 total 30% mais baixa que a quantidade mensurada na amostra que não sofreu variação de temperatura (TABELA 2). Este resultado mostra que a variação de temperatura de conservação de microsossomas desta espécie, mesmo que não haja descongelamento, é prejudicial para a qualidade do resultado final obtido.

TABELA 2 – Efeito da variação de temperatura sobre a quantidade de CYP450 mensurável.

AMOSTRA	CYP450 TOTAL	%
Sem variação de temperatura	119,0 $\mu\text{mol.mg prot.}^{-1}$	100 %
Com variação de temperatura	86,0 $\mu\text{mol.mg prot.}^{-1}$	71,6 %

4.2.3) Efeitos do Endossulfano sobre o CYP450 Total

4.2.3.1) Exposição Aguda Letal ao Endossulfano (40 mg/Kg)

Os resultados do experimento de exposição aguda ao endossulfano são apresentados no GRÁFICO 5. Cada coluna se refere a repetições de um *pool* constituído por fígados de nove peixes. O grupo controle apresentou uma concentração de $204,8 \pm 11,00 \text{ } \mu\text{mol.mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$ de CYP450 total, enquanto o grupo tratado por 8 horas apresentou $183,5 \pm 3,03 \text{ } \mu\text{mol.mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$ de CYP450 total. Apesar de ter sido observada uma tendência de diminuição da concentração de CYP450 total no grupo exposto, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos.

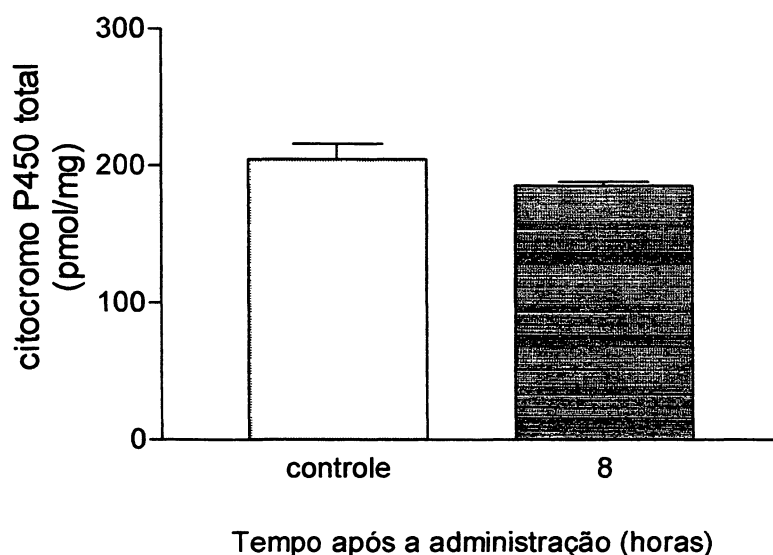


GRÁFICO 5 – Concentração de citocromo P450 total em cascudos (*Ancistrus* sp.) após 8 horas de tratamento com uma dose de 40 mg/Kg de endossulfano por via intracelomática.

4.2.3.2) Exposição Aguda Sub-Letal Ao Endosulfano (4mg/Kg)

Os resultados do primeiro experimento de exposição sub-letal ao endosulfano são apresentados no GRÁFICO 6. O grupo controle apresentou $189,2 \pm 16,61 \text{ } \mu\text{mol.mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$ de CYP450 total. Os grupos 24, 48 e 96 horas apresentaram, respectivamente, $112,3 \pm 7,12$, $191,4 \pm 2,10$ e $197,8 \pm 3,67 \text{ } \mu\text{mol.mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$ de CYP450 total. Uma diminuição significativa da concentração de CYP450 total hepático foi observada apenas nos peixes sacrificados 24 horas após a administração.

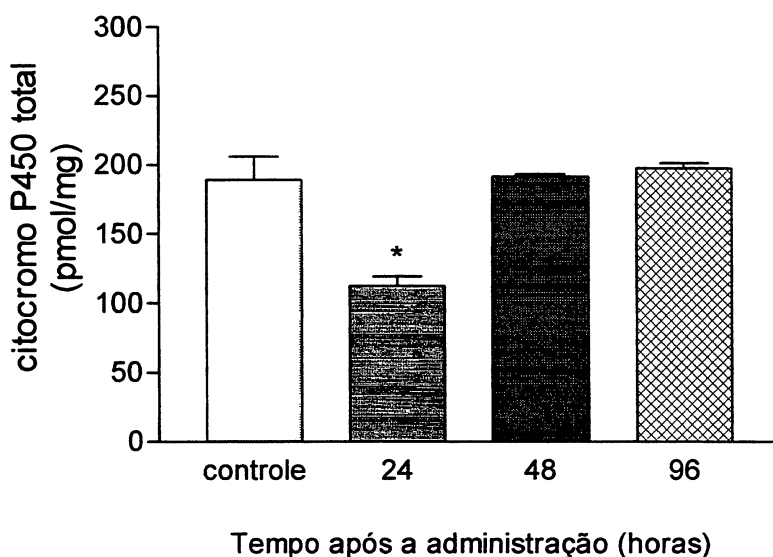


GRÁFICO 6 – Concentração de citocromo P450 total em cascudos (*Ancistrus* sp.) após 24, 48 e 96 horas de tratamento com uma dose de 4 mg/Kg de endosulfano por via intracelomática (* $p < 0,001$, ANOVA e Bonferroni).

Os resultados obtidos no segundo experimento de exposição sub-letal ao endossulfano são apresentados no GRÁFICO 7. O grupo controle apresentou $242,3 \pm 44,29 \text{ } \mu\text{mol.mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$ de CYP450 total. Os grupos 24, 48 e 96 horas apresentaram, respectivamente, $180,6 \pm 13,21$, $189,2 \pm 27,32$ e $73,89 \pm 5,84 \text{ } \mu\text{mol.mg prot.}^{-1} \pm \text{ep}$ de CYP450 total. Neste experimento foi observada uma diminuição significativa da concentração de CYP450 total hepático apenas nos peixes sacrificados 96 horas após a administração.

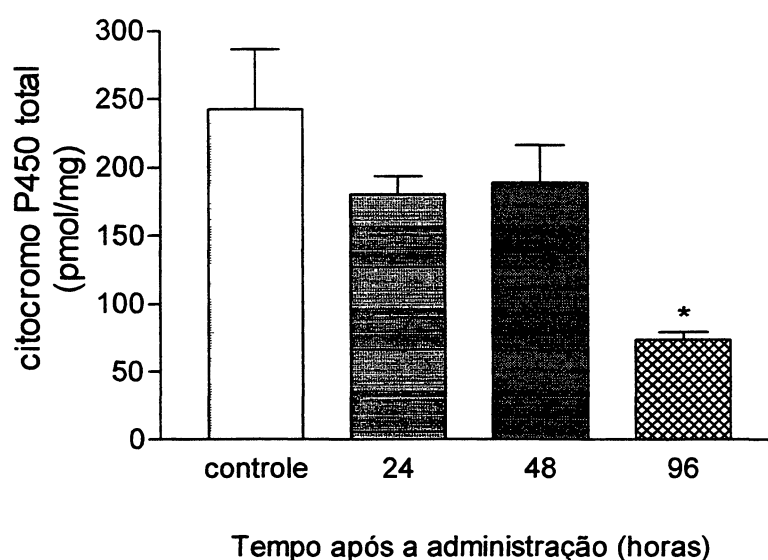


GRÁFICO 7 – Concentração de citocromo P450 total em cascudos (*Ancistrus* sp.) após 24, 48 e 96 horas de tratamento com uma dose de 4 mg/Kg de endossulfano por via intracelomática (* $p < 0,01$, ANOVA e Bonferroni).

Os resultados mostram que o endossulfano não induz a síntese de CYP450 total. Ao contrário, este composto causou uma diminuição da concentração desta família de proteínas nos animais tratados por 24 horas com uma dose de 4 mg/Kg no primeiro experimento, e por 96 horas, no segundo

experimento. De modo semelhante, DOROUGH et al. (1978) não detectaram indução do CYP 450 hepático após o tratamento de ratos com o endossulfano. Adicionalmente, NAQVI e VAISHNAVI (1993) afirmam que a contaminação crônica com endossulfano não causou indução de enzimas microssomais hepáticas e causou inibição da atividade de MFOs em tecido renal de ratos.

BUCHELI e FENT (1995) afirmam que a análise do CYP450 total pode ocultar resultados devido à possibilidade de aumento da concentração de uma isoforma, ao mesmo tempo em que outra tenha sua concentração diminuída. Por esta razão foi realizada a quantificação da isoforma CYP1A, que sofre indução na exposição a vários xenobióticos em peixes (LANGE, 1996).

4.2.4) Efeitos do Endossulfano sobre a isoforma CYP1A (*Western Blot*)

Os resultados da quantificação da isoforma CYP1A pela técnica de *western blot* são apresentados no GRÁFICO 8.

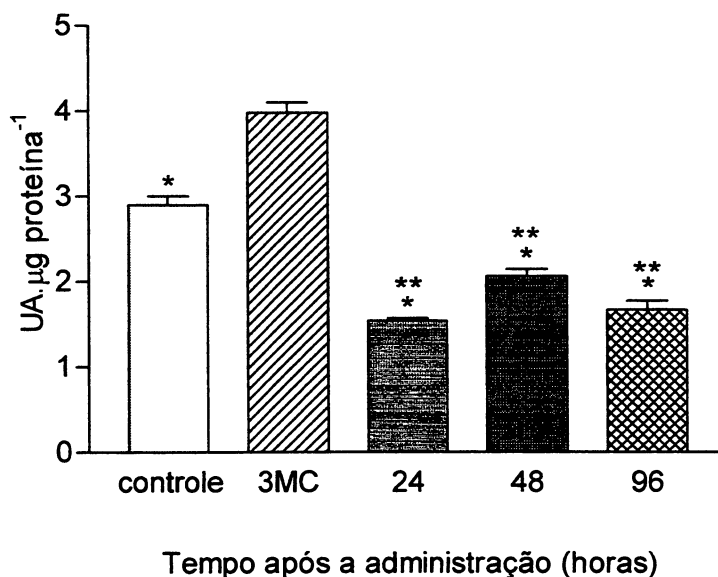


GRÁFICO 8 – Expressão da isoforma CYP1A em microssoma hepático de *Ancistrus* sp. tratados com endossulfano na dose de 4 mg/Kg por via intracelomática. O composto 3-metilcolantreno (3MC) foi usado como controle positivo (* $p < 0,001$ em comparação ao grupo 3MC; ** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle; ANOVA e Bonferroni; $n=2$).

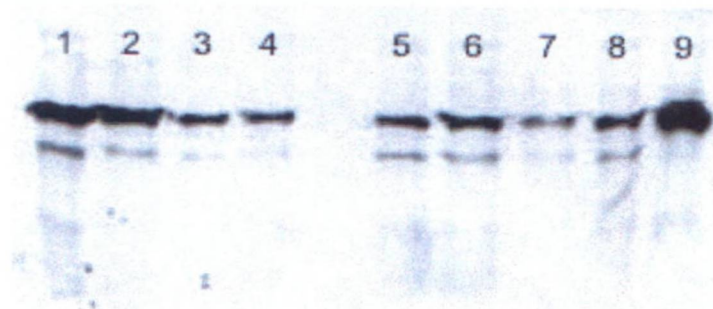


FIGURA 15 – Resultado do *western blot* (1- controle macho; 2- controle fêmea; 3- 24hs macho; 4- 24hs fêmea; 5- 48hs macho; 6- 48hs fêmea; 7- 96hs macho; 8- 96hs fêmea; 9- 3MC).

Os resultados do *western blot* demonstram que o composto 3MC (controle positivo) induziu a isoforma CYP1A, como era esperado (LANGE, 1996). O valor de 3.98 ± 0.12 UA. μ g prot⁻¹ obtido para este grupo foi significativamente superior ao grupo controle, que foi de 2.89 ± 0.10 UA. μ g prot⁻¹.

Os resultados apresentados pelos grupos tratados com endossulfano por 24 horas (1.53 ± 0.03 UA. μ g prot⁻¹), por 48 horas (2.06 ± 0.08 UA. μ g prot⁻¹) e por 96 horas (1.67 ± 0.10 UA. μ g prot⁻¹) foram significativamente inferiores ao grupo controle, corroborando a hipótese de que o endossulfano causa uma diminuição da concentração de citocromo P450 total.

Diversas enzimas podem sofrer inativação em decorrência da interação com elementos reativos provenientes do metabolismo de substratos endógenos e exógenos. Entre estes elementos pode-se citar: (i) os intermediários reativos provenientes do metabolismo de substratos como, por exemplo, o tetracloreto de carbono, derivados do acetileno e barbitúricos, e (ii) as formas reativas de oxigênio (H₂O₂, O₂⁻, ·OH) decorrentes de ciclos catalíticos incompletos das próprias enzimas. Em conjunto, estes elementos são chamados de radicais livres (MYERS, 1997).

STADTMAN e BERLETT (1997) afirmam que os radicais, através de modificações oxidativas nas moléculas, atuam como marcadores não seletivos para a ação de proteases endógenas. Estas, por sua vez, vão promover a degradação e remoção de proteínas intracelulares.

As isoformas do CYP450, responsáveis pelo metabolismo de diversos substratos no organismo, também estão susceptíveis à ação dos radicais livres. A inativação do CYP450, no entanto, parece ser uma reação muito específica. O processo de inativação do CYP450 se inicia com a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela degradação de um complexo peroxi no interior do centro catalítico da enzima. Esta reação parece ser o primeiro estágio do processo de declínio da concentração do CYP450 nas células e acontece sem conversão a CYP420. (KARUZINA e ARCHAKOV, 1994a; KARUZINA e ARCHAKOV, 1994b).

O H_2O_2 na presença do Fe^{2+} do grupamento heme gera radicais hidroxil ($\cdot OH$), que causam peroxidação de resíduos de aminoácidos que contém grupamentos $-SH$, incluindo a Cys 456, responsável pela ligação do grupamento heme à estrutura do CYP450. Como consequência, ocorre a perda deste grupamento além da oxidação de outros resíduos, levando a mudanças conformacionais na estrutura do CYP450. Estas mudanças, alteram as propriedades físico-químicas do mesmo, causando a agregação das moléculas. Já o H_2O_2 acumulado fora do centro catalítico do CYP450, proveniente da dismutação do ânion superóxido (O_2^-), é capaz de causar reações inespecíficas, como a degradação do heme liberado, removendo o Fe^{2+} deste grupamento e gerando também radicais $\cdot OH$. Estes promovem a ligação química entre as proteínas agregadas. A partir daí entram em ação proteases endógenas que vão remover este complexo de enzimas ligadas. Não foi descoberto até o momento, nenhum sistema proteolítico específico para a degradação das formas modificadas de CYP450. No entanto, o sistema proteolítico citosólico dependente de ATP-ubiquitina, e o sistema proteolítico ligado às membranas parecem participar intensivamente deste processo (KARUZINA et al., 1999).

A produção de oxigênio reativo pelas isoformas de CYP450 pode ocorrer mesmo na ausência de substratos. Dentre elas, o CYP2E1, induzido pelo etanol na espécie humana, é o que apresenta a maior taxa de ocorrência de

ciclos catalíticos incompletos com formação de oxigênio reativo (MYERS, 1997). Já o CYP1A é considerado mais estável à ação de radicais H_2O_2 formados durante o ciclo catalítico (KARUZINA e ARCHAKOV, 1994b).

SEVANIAN e McLEOD (1997) afirmam que o metabolismo de diversos xenobióticos pode gerar os radicais livres, tanto pela formação de metabólitos reativos como pelo surgimento de formas reativas de oxigênio. Estes radicais livres, por sua vez, podem contribuir para o início do processo de peroxidação lipídica.

Assim é importante recordar que, em geral, inseticidas OC são compostos lipossolúveis e esta característica lhes é importante no sentido de facilitar o seu acesso aos locais de ação (COATS, 1990).

COLVIN e PHILLIPS (1968), estudando os efeitos do OC endrin na modulação enzimática da espécie *Ictalurus melas*, sugeriram que este composto e seus análogos combinam-se com componentes ricos em lipídeos das organelas celulares. Do metabolismo destes compostos poderiam surgir radicais livres que, promovendo a peroxidação de estruturas lipídicas, afetariam a atividade de enzimas associadas a elas, especialmente quando a integridade destas estruturas é necessária para a atividade catalítica da enzima em questão. Este é o caso das isoformas do CYP450 que, estando ancoradas às membranas do retículo endoplasmático sofrem alterações quando da solubilização das mesmas, como foi observado por OMURA e SATO (1964).

GILL et al. (1990) consideraram esta hipótese para explicar a inibição da colinesterase cerebral causada pelo endossulfano na espécie *Puntius conchoniis*, uma vez que a AchE, assim como o CYP450, são proteínas ancoradas à membrana celular por uma porção hidrofóbica (GILES, 2002).

Segundo KARUZINA e ARCHAKOV (1994b), a possibilidade de auto-inativação do CYP450 deve ser levada em consideração em todos os casos de exposição a xenobióticos. Neste sentido, pode-se especular que a diminuição da concentração, tanto de CYP450 total como da isoforma CYP1A, observada neste trabalho, pode ser decorrente (i) da inibição autocatalítica de determinadas isoformas do CYP450 devido à ocorrência de ciclos catalíticos incompletos durante o metabolismo do endossulfano e da remoção destas moléculas das células hepáticas por enzimas proteolíticas, ou (ii) do processo de peroxidação de membranas lipídicas que pode ter sido desencadeado tanto

por formas reativas de oxigênio provenientes do primeiro processo, como por intermediários reativos provenientes do metabolismo do endosulfano.

A capacidade observada do endosulfano em causar inibição do CYP450 total pode ter efeitos importantes sobre populações expostas a uma mistura de diversos poluentes, situação bastante comum em condições de campo. Com a capacidade de detoxificação prejudicada pela ação do endosulfano sobre as enzimas de metabolização, a susceptibilidade dos organismos a efeitos tóxicos de outros contaminantes ambientais pode ficar aumentada. Uma diminuição da capacidade de biotransformação de algumas substâncias químicas levaria a um aumento na concentração e tempo de permanência deste composto dentro do organismo, acarretando uma maior toxicidade.

O estudo dos efeitos do endosulfano em laboratório sobre a expressão de biomarcadores é importante no sentido de se elucidar possíveis mecanismos de ação e contribuir para a interpretação de resultados obtidos em pesquisas de campo.

5) CONCLUSÕES

- o inseticida organoclorado endossulfano não causou inibição da atividade colinesterásica em músculo de *Ancistrus* sp. nas condições experimentais apresentadas;
- para melhor conhecimento das colinesterases em *Ancistrus* sp., a caracterização da AchE e da BchE frente aos substratos específicos AcSCh, BuSCh e acetil- β -metiltiocolina deverá ser realizada;
- devido à correlação negativa entre atividade colinesterásica e peso/comprimento dos peixes, o tamanho destes precisa ser padronizado no momento das coletas para avaliação da atividade colinesterásica no monitoramento aquático;
- a análise do CYP450 total deve ser precedida da avaliação de possíveis fatores que influenciem a sua quantificação, como a contaminação por hemoglobina e a variação de temperatura;
- o endossulfano assume importância ecotoxicológica por inibir o CYP450 total e o CYP1A, podendo aumentar a susceptibilidade dos peixes aos efeitos de outros poluentes ambientais;
- cada espécie animal a ser usada como bioindicadora em programas de monitorização ambiental deve ter as metodologias de avaliação dos diversos biomarcadores padronizadas previamente à sua aplicação;
- o uso de biomarcadores específicos e inespecíficos é imperativo na desenvolvimento de programas de monitoramento ambiental.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADAMS, H.R. Drogas que Atuam Sobre os Sistemas Nervosos Somático e Autonômico. In: BOOTH, N.H. e McDONALD, L.E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 1992. p. 57-109.

ANDERSON, B.C. Toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. **Sewage Works Journal**. v. 16, p. 1156-1165, 1944.

ANDERSON, R.L.; DeFOE, D.L. Toxicity and bioaccumulation of endrin methoxychlor in aquatic invertebrates and fish. **Environmental Pollution**. v. 22A, p. 111-121, 1980.

ASSUMPCÃO, R.; MORITA, T. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. Padronização, Preparação e Purificação. **Biblioteca de Ciências Biológicas – UFPR**. 1968.

BAINY, A.C.D.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-São Paulo, Brazil. **Aquatic Toxicology** v. 44, p. 289-305, 1999.

BRADBURY, S.P.; CARLSON, R.W; NIEMI, G.J.; HENRY, T.H. Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in identifying acute toxicity syndromes in fish: Part 4. Central nervous system seizure agents. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 10, p. 115-131, 1991.

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.

BUIKEMA, A. L.; Jr. NIEDERLEHNER, B.R.; CAIRNS, J. Biological monitoring. Part IV. Toxicity testing. **Water Research**. v. 16, p. 239-262, 1982.

BURTH, P. Dosagem de Citocromo P450 em Preparações Microssomais de Fígado de *H. punctatus* (Cascudo). **Monografia de Graduação**. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas. 1985.

BUTLER, G.C. **Principles of Ecotoxicology**. New York: Wiley, 1978.

CARLSON, R.W.; BRADBURY, S.P.; DRUMMOND, R.A.; HAMMERMEISTER, D.E. Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals. **Aquatic Toxicology**. v. 43, p. 51-68, 1998.

CARSON, R. **Silent Spring**. Boston: Houghton Mifflin, 1962.

COATS, J.R. Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. **Environmental Health Perspectives**. v. 87, p. 255-262, 1990.

COLVIN, H.J.; PHILLIPS, A.T. Inhibition of electron transport enzymes and cholinesterase by endrin. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 3, p. 106-113, 1968.

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.

DEUTCH, A.Y.; ROTH, R.H.. Neurotransmitters. in: ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRRE, L.R.. **Fundamental Neuroscience**. Academic Press, 1999.

DEVI, A.P.; RAO, D.M.R.; TILAK, K.S.; MURTY, A.S. Relative Toxicity of the Technical Grade Material, Isomers and Formulations of Endosulfan to the Fish *Channa punctata*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 27, p. 239-243, 1981.

DIAMANTINO, T.C.; GUILHERMINO, L.; ALMEIDA, E.; SOARES, A.M.V. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* straus evaluated in acute, chronic and acetylcholinesterase inhibition tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 45, p. 253-259, 2000.

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

DIZER, H.; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterase activity as a bioindicator for monitoring marine pollution in the Baltic Sea and the Mediterranean Sea. In: GARRIGUES, P.H.; BARTH, H.; WALKER, C.H.; NERBONNE, J.F. **Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach**. London: Elsevier Science, 2001.

DOROUGH, H.W.; HUHTANEN, K.; MARSHALL, T.C. Fate of endosulfan in rats and toxicological consideratons of apolar metabolites. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 8, n. 3, p. 241-252, 1978.

DROMMOND, R.A.; RUSSOM, C.L. Behavioral toxicity syndromes: A promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 9, p. 37-46, 1990.

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.

FENT, K. **Ökotoxikologie – Umweltchemie, Toxicologie und Ökologie**. Stuttgart: Thieme, 1998.

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.

GARCIA, L.M.; CASTRO, B.; RIBEIRO, R.; GUILHERMINO, L. Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its *in vitro* inhibition by environmental contamination. **Biomarkers**. v. 5, n. 4, p. 274-284, 2000.

GILES, K. **Cholinesterases**. Disponível em:

<http://www.weizmann.ac.il/Structural_Biology/Pages/Sussman/kurt//che.html>

Acesso em: 12 fev. 2002.

GILL, T.S; JAISHREE, P.; TEWARI, H. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon, and endosulfan in fish tissues. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 38, p. 231-244, 1990.

GOLDBERG, A.M.; FRAZIER, J.M. Alternatives to animals in toxicity testing. **Scientific American**. v. 261, n. 2, p. 24-30, 1989.

HERBERT, A., GUILHERMINO, L., SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.-D. Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. **Angew. Zool**. v. 3, p. 1-15, 1995.

HOGAN, J.W. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 5, n. 4, p. 347-352, 1970. apud 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.

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.

HUNN, J.B. **History of acute toxicity tests with fish, 1863-1987**. LaCrosse: U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, 1989.

INBARAJ, R.M.; HAIDER, S. Effect of malathion and endosulfan on brain acetylcholinesterase and ovarian steroidogenesis of *Chana punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 16, n. 2, p. 123-128, 1988.

IPCS-INCHEM – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY.

Endosulfan. Disponível em:

<<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v89pr08.htm>> Acesso em: 12 fev. 2002.

JOHANNESSEN, K.A.M.; DEPIERRE, J.W. Measurement of Cytochrome P450 in the Presence of Large Amounts of Contaminating Hemoglobin and Methemoglobin. **Analytical Biochemistry**. v. 86, p. 725-732, 1978.

JOHNSON, J.A.; WALLACE, K.B. Species-Related Differences in the Inhibition of Brain Acetylcholinesterase by Paraoxon and Malation. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 88, p. 234-241, 1987.

JONSSON, C.M.; TOLEDO, M.C.F. Bioaccumulation and Elimination of Endosulfan in the Fish Yellow Tetra (*Hyphessobrycon bifasciatus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 50, p. 572-577, 1993.

KARUZINA, I.I.; ARCHAKOV, A.I. The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 16, n. 1, p. 73-97, 1994a.

KARUZINA, I.I.; ARCHAKOV, A.I. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenase reactions. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 17, n. 6, p. 557-567, 1994b.

KARUZINA, I.I.; ZOGDA, V.G.; KUZNETSOVA, G.P.; SAMENKOVA, N.F.; ARCHAKOV, A.I. Heme and apoprotein modification of cytochrome P450 2B4 during its oxidative inactivation in monooxygenase reconstituted system. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 26, n. 5/6, p. 620-632, 1999.

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.

LANGE, U. Natürliche Variabilität des Schadstoffinduzierbaren Cytochroms P450 1A in der Leber von Klieschen (*Limanda limanda* [L.]) aus der Nordsee. **Berichte aus dem Zentrum für Meers- und Klimaforschung - ZMK**. Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft. Hamburg, 1996.

LEAVER, M.J. Principles governing the use of cytochrome P4501A1 measurement as a pollution monitoring tool in the aquatic environment. In: TAYLOR, E.W. **Society for Experimental Biology Seminar Series 57: Toxicology of Aquatic Pollution – Physiological, Molecular and Cellular Approaches**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 267-278.

LEITÃO, M.A.S.; AFFONSO, E.G.; da SILVA, M.F.E.; MEIRELLES, N.C.; RANTIN, F.T.; VERCESI, A.E.; JUNQUEIRA, V.B.C.; DEGTEREV, I.A. The liver monooxygenase system of brazilian freshwater fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 126, p. 29-38, 2000.

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 Biochemistry and Physiology**. v. 108C, n. 2, p. 187-194, 1994.

MALLIK, S.; PAL, A.K.; KUSHWAH, H.S.; KUSHWAH, A. Effects of endosulfan upon succinic dehydrogenase and cholinesterase activity in brain tissue of albino rats. **Indian Veterinary Medical Journal**. v. 24, n. 3, p. 207-210, 2000.

MANAHAN, S.E. **Toxicological Chemistry. A guide to toxic substances in chemistry**. Chelsea: Lewis Publishers, 1989.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E. VALLETTE, F-M. Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases. **Prog. Neurobiol**. v. 41, p. 31-91, 1993.

MATTHIESSEN, P.; FOX, P.J.; DOUTHWAITE, R.J.; WOOD, A.B. Accumulation of Endosulfan Residues in Fish and Their Predators After Aerial Spraying for the Control of Tsetse Fly in Botswana. **Pesticide Science**. v. 13, p. 39-48, 1982.

MYERS, C.R. Subcellular Sites of Xenobiotic-Induced Free-Radical Generation. In: **Free Radical Toxicology**. London: Taylor and Francis, 1997. p.25-46.

MOO, C.L. Epidemiologia das doenças infecciosas em animais silvestres e monitoramento ambiental. Apostila de curso realizado durante o **II Congresso e VII Encontro da Associação Brasileira da Veterinários de Animais Selvagens**. Foz do Iguaçu, 1998.

NAQVI, S.M.; VAISHNAVI, C. Bioaccumulative Potential and Toxicity of Endosulfan Insecticide to Non-Target Animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 105C, n. 3, p. 347-361, 1993.

NARBONNE, J.F.; GARRIDES, P.; RIBERA, D.; RAOUX, C.; MATHIEU, A.; LEMAIRE, P.; SALAUN, J.P.; LAFAURIE, M. Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: Field studies on the French coast of the Mediterranean see. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 100C, p. 37-42, 1991.

NUNN, J.W.; LIVINGSTONE, D.R.; CHIPMAN, J.K. Effect of genetic toxicants in aquatic organisms. In: TAYLOR, E.W. **Society for Experimental Biology Seminar Series 57: Toxicology of Aquatic Pollution – Physiological, Molecular and Cellular Approaches**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 225-251.

OLSSON, P.E. Metallothioneins in fish: induction and use in environmental monitoring. In: TAYLOR, E.W. **Society for Experimental Biology Seminar Series 57: Toxicology of Aquatic Pollution – Physiological, Molecular and Cellular Approaches**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 187-203.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Environmental Health Criteria 40 – Endosulfan**. Geneva: International Programme on Chemical Safety – IPCS, 1984.

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.

PAUL, V.; BALASUBRAMANIAM, E.; KAZI, M. The neurobehavioral toxicity of endosulfan in rats: A serotonergic involvement in learning impairment. **European Journal of Pharmacology**. v. 270, n. 1, p. 1-7, 1994.

PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**. v. 32, n.2, p. 225-231, 1996.

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, 1995. p. 3-67.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RHODES, C.; THOMAS, M.; ATHIS, J. Principles of testing for acute toxic effects. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T.; TURNER, P. (eds.) **General and Applied Toxicology, vol.1**. Macmillan Press, New York, p. 49-88, 1993.

RODRICKS, J.V. **Calculated Risks. Understanding the Toxicity and Human Health Risks of Chemicals in Our Environment**. Cambridge: University Press, 1992.

SALEH, M.A.; ABOU ZIED, M.; el-BAROTY, G.; ABDEL-REHEIM, E.; ABDEL-RAHMAN, F.; WALLACE, C.; el-SABAE, A.H.; BLANCATO, J.N. Gamma aminobutyric acid radioreceptor-assay a possible biomarker for human exposure to certain agrochemicals. **Journal of Environmental Science and Health. Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. v. 28, n. 6, p. 687-699, 1993.

SAWYER, C.H. Cholinesterase and the behavior problem in *Amblystoma*. III. The distribution of cholinesterase in nerve and muscle throughout development. **Journal of Experimental Zoology**. v. 94, p. 1-31, 1943.

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

SEVANIAN, A.; McLEOD, L. Formation and Biological Reactivity of Lipid Peroxidation Products. In: **Free Radical Toxicology**. London: Taylor and Francis, 1997. p. 47-70.

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

SILVER, A. **The Biology of Cholinesterases**. Amsterdam: North-Holland, 1974.

STADTMAN, E.R.; BERLETT, B.S. Free-radical-mediated modification of proteins. In: **Free Radical Toxicology**. London: Taylor and Francis, 1997. p. 71-88.

STANSLEY, W. Field results using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 25, p. 315-321, 1993.

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.

STEGEMAN, J.J. Cytochrome P450 Forms in Fish. In: SCHENKMAN, J.B.; GREIM, H. **Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 105 – Cytochrome P450**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993.

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.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**. v. 47, p. 389-398, 1999a.

STURM, A.; WOGRAM, J.; HANSEN, P.D.; LIESS, M. Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small streams: natural variability in Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.18, n.2, p.194-200, 1999b.

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.

SWARUP, P.A.; RAO, D.M.; MURTY, A.S. Toxicity of Endosulfan to the Freshwater Fish *Cirrhinus mrigala*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 27. p. 850-855, 1981.

SZABÓ, A.; NEMCSÓK, J.; ASZTALOS, B.; RAKONCZAY, Z.; KÁSA, P.; HIEU, L.H. The Effect of Pesticides on Carp (*Cyprinus carpio*). Acetylcholinesterase and Its Biochemical Characterization. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 23, p.39-45, 1992.

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 Biochemistry and Physiology**. v. 111C, p. 1-12, 1995.

TOLEDO, M.C.; JONSSON, C.M. Bioaccumulation and Elimination of Endosulfan in Zebra Fish (*Brachydanio rerio*). **Pesticide Science**. v. 36, p. 207-211, 1992.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology – a new branch of toxicology: a general survey of its aims, methods and prospects. In: McINTYRE, A.D.; MILLS, C.F. **Ecological Toxicology Research**. New York: Plenum, 1975. p. 3-24.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 1, p. 151-173, 1977.

USDIN, E. Reactions of Cholinesterases with substrates, inhibitors and reactivators. In: KARCZMAR, A.G. **Anticholinesterase Agents**. New York: Pergamon, 1970. p.47-354

VAN DER OOST, R.; HEIDA, H.; OPPERHUIZEN, A.; VERMEULEN, N.P.E. Interrelationships Between Bioaccumulation of Organica Trace Pollutants (PCBs, Organochlorine Pesticides and PAHs), and MFO-Induction in Fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 100C, n. 1/2, p. 43-47, 1991.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis, Bristol, PA 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**, 1958, Detroit. v. 31, n.5.

WELLS, P.G. History and practice of biological effects assessment for aquatic protection in Canada: a synopsis. In: DAY, K.E.; ONGLEY, E.D.; SCROGGINGS, R.P. EISENHAUER, H.R. **Biology in the New Regulatory Framework for Aquatic Protection. Proceedings of the Alliston Workshop.** Burlington: National Water Research Institute, 1989. p. 25-29.

ZAKRZEWSKI, S. **Principles of Environmental Toxicology.** Salem: American Chemical Society, 1991.

ZAPP Jr., J.A. Historical consideration of interspecies relationships in toxicity assessment. In: EATON, J.G.; PARRISH, P.R.; HENDRICKS, A.C. **Aquatic Toxicology.** Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1980. p. 2-10.

ZINKL, J.G.; LOCKHART, W.L.; KENNY, S.A.; WARD, F.J. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: **Cholinesterase Inhibiting Insecticides.** Ed. Mineau, p. 233-254. Elsevier, Amsterdam, Capítulo 10. 1991.