

Eliana Cristina Ventura

“Biomarcadores Bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes – Sciaenidae), coletados na costa sudeste brasileira”.

Dissertação apresentada ao programa de Pós –
Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal
de Santa Catarina, visando à obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy.

Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Risoleta Freire
Marques.

Florianópolis

2004

Ventura, Eliana Cristina

Biomarcadores Bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes – Sciaenidae) coletados na costa sudeste brasileira./ Eliana Cristina Ventura – Florianópolis, 2004.

115 f.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da, Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

1) Biomarcadores de contaminação aquática. 2) *Orthopristis ruber*. 3) *Micropogonias furnieri*. I. Título.

“Antes mesmo que um desequilíbrio ambiental possa ser observado a nível populacional, alterações biológicas a nível individual podem servir como indicadoras precoces de uma situação anormal”.

(Mosse et al., 1996).

Dedico este trabalho aos responsáveis pela minha existência nesta vida, meu pai Aristiliano e minha mãezinha Iliria. E é claro, às minhas amadas irmãs, amigas e companheiras, Iveriana e Irudí...

... amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Em geral, gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial, gostaria de agradecer:

Aos meus pais, pelo apoio e confiança depositados em mim ao longo de mais esta jornada na minha vida.

Ao meu orientador e amigo Prof. Afonso Celso Dias Bainy, pelo carinho, amizade e confiança dedicados a mim durante todos estes quase sete anos de convivência e aprendizado em seu laboratório.

À nossa mãe no laboratório, Profa. Maria Risoleta Freire Marques, pela minha co-orientação em mais este trabalho, pela competência e pela amizade demonstrada durante todos estes anos, e é claro, pela presença indispensável durante o primeiro ano deste curso.

A toda a “família” LABICAI: Pri, Dani, Bel, Jú, Ângelita, Taíse, Anna, Fê, Karin, Juliano, Guilherme, Igor, Jairo e Lucas, pelo companheirismo no ambiente de trabalho e fora dele. Foi muito bom trabalhar com pessoas como vocês. Que na minha carreira profissional eu encontre pessoas assim sempre, o que sei que não será fácil. Ah, não poderia esquecer da Dani e do Nathan é claro, que fizeram parte da família durante alguns meses.

À Joice, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela disposição, eficiência e paciência, nas questões burocráticas.

Às minhas irmãs de coração: Priscila, Ariane, Cláudia e Leandra, pela amizade sincera. Com certeza, cada uma de vocês foi e continua sendo muito importante para mim. Pri, muito obrigado por todas as conversas, apoio e companheirismo durante uma fase muito crítica da minha vida, onde quase desisti de tudo, obrigada mesmo, sem sua ajuda teria sido muito mais difícil. Cláudia e Leandra, obrigada pelos acampamentos em suas casas durante vários dias, pra chegar cedo no laboratório. Ari, obrigado por ser a amiga que você é, te admiro muito.

Ao Jurubeba, pelos momentos de descontração, pela amizade e por deixar a Ari mais calma com sua presença.

Às minhas irmãs Irudí e Iveriana, e meus cunhadinhos, Leonardo e Lincoln, pelas comidinhas gostosas e outras “cositas” mas. Sou muito privilegiada em ter quatro *chefs* particulares.

A Álvaro e Marli Lemos, por todo apoio prestado.

À Cecília Mendonça Xavier, uma pessoa que sempre me incentivou e quis o melhor pra mim. Obrigada por todo carinho e amizade.

À minha tia Irudí pelas sábias palavras nos momentos certos. Meus tios, Adair e Leodir, por todo apoio que me deram. Muito obrigada!

Ao Dr. Flávio da Costa Fernandes, ao M.Sc. Luiz Ricardo Gaelzer e M.Sc. Olga Maria Danelon, por toda ajuda prestada durante este trabalho.

A toda a equipe do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e ao próprio instituto, pelo apoio logístico prestado na realização das coletas de campo e pela confiança depositada em nosso grupo de pesquisa.

Ao Dr. John Joseph Stegeman, que cedeu gentilmente o anticorpo primário, fundamental para a realização dos experimentos de expressão da CYP1A.

À Lígia Maria Salvo, minha querida amiga e toda a sua família.

À minha mais nova amiga Graziela, pela paciência com meus ataques de bobeira nestes últimos dias.

À CAPES, pelo pagamento da bolsa, pois sem ela não teria condições de permanecer no Programa.

Enfim, à pessoa que ocupa e sempre ocupará um lugar muito especial no meu coração. Mesmo com muita dor você me ensinou certos valores que carregarei o resto da minha vida. Amei, amo e se continuarei amando, só o tempo dirá.

RESUMO

A zona costeira brasileira possui vários ecossistemas extremamente produtivos, mas com grande sensibilidade e susceptibilidade à degradação ambiental. O aumento do aporte antrópico causado principalmente pela crescente concentração populacional e sistemas deficientes de tratamento de efluentes, tem impactado estes ambientes. Os contaminantes podem provocar uma série de distúrbios metabólicos aos organismos e causar uma diminuição dos estoques pesqueiros, da qualidade dos recursos vivos, podendo alterar a cadeia trófica dos oceanos. O Conselho Internacional para a Exploração do Mar (ICES) tem recomendado que programas de monitoramento do ambiente marinho passem a utilizar metodologias complementares que possam expressar o grau de exposição e de efeito causado pelos poluentes aos organismos, associados às análises químicas tradicionalmente realizadas. Para melhor entender a situação atual da poluição da costa brasileira, assim como os efeitos tóxicos provocados pelos principais poluentes lançados neste meio, foi iniciado um Programa Nacional de Monitoramento do Ambiente Marinho, coordenado pelo Instituto de Estudo do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM- Ministério da Marinha), da qual nosso grupo de pesquisa está participando desde sua implantação (Outubro de 1996). Amostras de fígado de peixes das espécies *Orthopristis ruber* e *Micropogonias furnieri* foram coletadas em diferentes pontos da costa Sudeste brasileira. Após biometria dos animais, amostras de fígado foram retiradas, homogeneizadas e centrifugadas para a obtenção das frações sobrenadante e microsomal. Na primeira foi analisada a atividade das enzimas Glutathione S-transferase (GST), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx) e Glutathione reductase (GR) e na última, a expressão da isoforma de Citocromo P450 (CYP1A) através de *Dot* e *Slot-blotting*. Os animais de ambas espécies coletados na Baía da Guanabara (BG) apresentaram uma expressão elevada da CYP1A, no entanto os animais dos demais locais também apresentaram níveis detectáveis desta proteína, sugerindo que estes animais também foram expostos a contaminantes do tipo indutor do receptor Ah. Os sistemas de defesas antioxidantes estiveram ativos na grande maioria dos animais analisados, sendo que em alguns foi detectada uma possível condição de estresse oxidativo. O sistema de conjugação de xenobióticos esteve mais ativo nos animais coletados na BG e em São Sebastião (SS), na espécie *M. furnieri* e em Arraial do Cabo (AC), na espécie *O. ruber*, o que sugere que os metabólitos produzidos durante a fase I de biotransformação, estariam sendo mais eficientemente conjugados pela GST destes animais, o que aumentaria a excreção dos mesmos. Os dados apresentados mostraram algumas variações na expressão e/ou atividade de biomarcadores bioquímicos em peixes coletados no litoral do Rio de Janeiro e São Paulo, que possivelmente estavam associados a um maior ou menor grau de exposição a contaminantes no ambiente. Propomos que estudos futuros incluam a análise destes parâmetros aliadas a determinação quali-quantitativa dos principais compostos tóxicos nestes animais.

Palavras-chave: Biomarcadores de Contaminação Aquática; *Orthopristis ruber*; *Micropogonias furnieri*; Enzimas antioxidantes; CYP1A; Glutathione S-transferase; Brasil.

ABSTRACT

The Brazilian coastal zone has several highly productive ecosystems, but sensitive and susceptible to environmental degradation. The increase in the anthropic input caused mainly by the growing population density and inefficient effluent treatment system, has impacted these ecosystems. The contaminants can cause several metabolic disorders on the organisms, decrease in the fisheries stock and quality of living resources, which may alter the food chain in the ocean. The International Council for the Exploitation of the Sea (ICES) has recommended that marine environmental programs adopt complementary methodologies that may express the degree of exposure and effect caused by pollutants to the organisms, associated with chemical analysis traditionally employed. In order to better comprehend the present situation of coastal pollution in the Brazilian coast, as well as the toxic effects induced by the main contaminants, a National Marine Monitoring Program (MoMAM) coordinated by the Instituto de Estudo do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM- Ministério da Marinha) was established in October 1996 and since then, our research group has been involved. Liver samples of *Orthopristis ruber* and *Micropogonias furnieri* were collected in different sites of the Brazilian southeast coast. The animals were measured and the liver samples were excised, homogenized and centrifuged to prepare the supernatant and microsomal fractions. The activity of enzymes Glutathione S-transferase (GST), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx) and Glutathione reductase (GR) was analyzed in the former and in the last the expression of Cytochrome P450 isoform (CYP1A) using Dot and Slot-blotting. Fish from both species caught at Guanabara Bay (BG) showed an elevated CYP1A expression, however, organisms from other areas also showed significant levels of CYP1A suggesting that these animals were also exposed to Ah receptor inducers. The antioxidant defenses were more active in most of the analyzed organisms, and in some cases we were able to detect an indication of oxidative stress condition. In *M. furnieri*, the xenobiotic conjugating system was more activated in fish sampled in BG and São Sebastião (SS) and in *O. ruber* from Arraial do Cabo (AC), which suggests that the metabolites produced during Phase I metabolism might be more efficiently conjugated by GST in these animals, which would increase their excretion rates. The data showed some changes in the expression and/or activity of some biochemical biomarkers in fish caught on the coast of Rio de Janeiro and São Paulo, which possibly were associated to different degrees of exposure to contaminants. We propose that future studies include analysis of these parameters, together with quali-quantitative chemical analysis of main contaminants in these animals.

INTRODUÇÃO

- Figura 1:** Esquema geral mostrando a seqüência de eventos de formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos celulares.....15
- Figura 2:** Localização das áreas de coleta. **2A-** Mapa do Brasil com as respectivas figuras ilustrativas da parte Norte e Sul do litoral sudeste; **2B-** fotos ilustrativas de Arraial do cabo; **2C-** fotos ilustrativas da Baía da Guanabara; **2D-** foto ilustrativa de Sepetiba; **2E-** fotos ilustrativas de Angra dos Reis; **2F-** foto ilustrativa de São Sebastião.....22
- Figura 3:** Aspecto externo das espécies estudadas. **A)** *Orthopristis ruber* (Família: HAEMULIDAE); **B)** *Micropogonias furnieri* (Família: SCIAENIDAE).....25

CAPÍTULO 1

Biomarcadores Bioquímicos em corcoroca (*Orthopristis ruber*) (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae), coletadas na costa do Rio de Janeiro, Brasil

- Figura 1:** Mapa do Brasil e da parte Norte e Sul da costa Sudeste, mostrando os locais de coleta no Estado do Rio de Janeiro. 1 – Arraial do Cabo e 2 – Baía da Guanabara.....58
- Figura 2:** Análise da expressão da CYP1A (A), da atividade da glutathione S-transferase (B), superóxido dismutase (C), catalase (D), glutathione peroxidase (E) e glutathione reductase (F), nas amostras de fígado de *Orthopristis ruber* coletados na Baía da Guanabara e em Arraial do Cabo.....59

CAPÍTULO 2

Biomarcadores bioquímicos em corvina (*Micropogonias furnieri*) (Desmarest, 1823) (Perciformes – Sciaenidae), coletadas no litoral Sudeste do Brasil

- Figura 1:** Mapa do Brasil e da costa dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, mostrando os diferentes locais de coleta. 1- Baía da Guanabara, 2- Sepetiba, 3- Angra dos Reis e 4- São Sebastião.....96

Figura 2: Análise da expressão da CYP1A (A) e da atividade das enzimas glutathione S-transferase (B), superóxido dismutase (C), catalase (D), glutathione peroxidase (E) e glutathione reductase (F), nas amostras de fígado de *Micropogonias furnieri* coletadas na Baía da Guanabara, Sepetiba, Angra dos Reis e São Sebastião.....97

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Principais defesas antioxidantes nos sistemas biológicos.....14

CAPÍTULO 1

**Biomarcadores Bioquímicos em corcoroca (*Orthopristis ruber*) (Cuvier, 1830)
(Perciformes – Haemulidae), coletadas na costa do Rio de Janeiro, Brasil**

Tabela 1: Parâmetros físicos e químicos da água nos locais de coleta e biológicos dos peixes amostrados.....60

CAPÍTULO 2

**Biomarcadores bioquímicos em corvina (*Micropogonias furnieri*) (Desmarest, 1823)
(Perciformes – Sciaenidae), coletadas no litoral Sudeste do Brasil**

Tabela 1: Parâmetros físicos e químicos da água nos locais de coleta e biológicos dos peixes amostrados.....98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Arraial do Cabo
Ag	Prata
Ah	Aril hidrocarboneto
AhR	Receptor aril hidrocarboneto
Al	Alumínio
AR	Angra dos Reis
BCPs	Bifenilas policloradas
BG	Baía da Guanabara
BSA	Soro albumina bovina
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
CDNB	1- cloro, 2,4, dinitrobenzeno
Cr	Cromo
CSS	Canal de São Sebastião
Cu	Cobre
Cu, Zn-SOD	Cobre, Zinco – Superóxido Dismutase
CYPs	Citocromo P450
CYP1A	Citocromo P450 isoforma 1A
DDT	1,1,1 tricloro 2,2 (<i>p</i> -clorofenicol) etano
DDPC	Dibenzodioxinas policloradas
DFPC	Dibenzofuranos policlorados
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTNB	5,5'- ditiobis- (2,4 nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EROD	Etoxiressorufina- <i>O</i> -deetilase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
Fe-SOD	Ferro – Superóxido dismutase
GB	“Guanabara Bay”
GR	Glutathiona redutase
GST	Glutathiona <i>S</i> -transferase
GSH	Glutathiona reduzida

GS-X	Conjugado do xenobiótico com a glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
G6PDH	Glutationa 6-fosfato desidrogenase
H	Molécula de hidrogênio
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Hg	Mercúrio
HSD	“Honest Standard Desviation”
HSP 90	Proteína de choque térmico de 90 KDa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O	Fórmula molecular da água
ICES	International Council for the Explotation of the Sea
IEAPM	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
IgG	Imunoglobulina G
KCl	Cloreto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
MED-POL	Programa de Biomonitoramento do Mediterâneo Nordeste
MFO	Oxidases de função mixta
Mn	Manganês
MOMAM	Monitoramento do Ambiente Marinho
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
O ₂ ^{·-}	Radical ânion superóxido
·OH	Radical hidroxil
O ₂	Oxigênio molecular
Pb	Chumbo
PETROBRAS	Petróleo brasileiro S.A
P450e	Citrocromo P450, isoforma E
pH	Potencial hidrogênionico
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
POCs	Pesticidas organoclorados
PR	Paraná
RJ	Rio de Janeiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase – Trancryptase reversa

SOD	Superóxido dismutase
SS	São Sebastião
SEP	Sepetiba
TBS	Tris tampão salino
UDPGTSs	UDP glucoronil transferase
X	Xenobiótico
X.	Radical derivado do xenobiótico
X-OH	Xenobiótico hidroxilado
Zi	Zinco

SUMÁRIO

Página

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas e Siglas	xii
Introdução Geral	1
Características das Áreas de Estudo	19
Biologia das Espécies Estudadas	23
Objetivo Geral	26
Objetivos Específicos	26
<u>Capítulo 1</u>	27
Biomarcadores Bioquímicos em corcoroca (<i>Orthopristis ruber</i>) (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae), coletadas na costa do Rio de Janeiro, Brasil	
Abstract.....	28
Resumo.....	29
1- Introdução.....	30
2- Materiais e Métodos.....	34
2.1 Reagentes.....	34
2.2 Material Biológico.....	34
2.3 Preparação das Amostras.....	35
2.4 Análises Bioquímicas.....	35
2.4.1 “Dot-Blot”.....	35
2.4.2 Glutathione S-transferase (GST).....	36
2.4.3 Superóxido Dismutase (SOD).....	36
2.4.4 Catalase (CAT).....	37
2.4.5 Glutathione Peroxidase (GPx).....	37
2.4.6 Glutathione Redutase (GR).....	38
2.5 Determinação da Concentração de Proteínas Totais.....	38
2.6 Análise Estatística.....	39
3- Resultados.....	40

3.1 Dados Físicos e químicos.....	40
3.2 Dados Biológicos.....	40
3.3 Expressão da CYP1A.....	40
3.4 Análises Enzimáticas.....	41
4- Discussão.....	43
Referências Bibliográficas.....	48
Figura 1.....	58
Figura 2.....	59
Tabela 1.....	60
<u>Capítulo 2</u>	61
Biomarcadores bioquímicos em corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>) (Desmarest, 1823) (Perciformes – Sciaenidae), coletadas no litoral Sudeste do Brasil	
Abstract.....	62
Resumo.....	63
1- Introdução.....	64
2- Materiais e Métodos.....	68
2.1 Reagentes.....	68
2.2 Material Biológico.....	68
2.3 Preparação das Amostras.....	69
2.4 Análises Bioquímicas.....	69
2.4.1 “Slot-Blot”.....	70
2.4.2 Glutathione S-transferase (GST).....	70
2.4.3 Superóxido Dismutase (SOD).....	71
2.4.4 Catalase (CAT).....	71
2.4.5 Glutathione Peroxidase (GPx).....	72
2.4.6 Glutathione Redutase (GR).....	72
2.5 Determinação da Concentração de Proteínas Totais.....	73
2.6 Análise Estatística.....	73
3- Resultados.....	74
3.1 Dados Físicos e químicos.....	74
3.2 Dados Biológicos.....	74
3.3 Expressão da CYP1A.....	75
3.4 Análises Enzimáticas.....	75

4- Discussão.....	77
Referências Bibliográficas.....	85
Figura 1.....	96
Figura 2.....	97
Tabela 1.....	98
Considerações Finais.....	99
Bibliografias Consultadas.....	102

INTRODUÇÃO

O planeta que habitamos, tal como as fotografias tiradas por satélites ilustram, mais do que "TERRA" dever-se-ia chamar "MAR", pois 71% da sua superfície terrestre é recoberta por água, sendo que deste percentual, 97,2 % corresponde aos oceanos. Portanto, o ambiente marinho constitui-se em uma parte essencial da biosfera. De acordo com o Capítulo 17 da Agenda 21 (1992), "O ambiente marinho, incluindo os oceanos e todos os mares, bem como as zonas costeiras adjacentes, forma um todo integrado que é um componente essencial do sistema que possibilita a existência de vida sobre a Terra, além de ser uma riqueza que oferece possibilidades para um desenvolvimento sustentável". O direito internacional, como consta das disposições da Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar, mencionadas no item 17.21 da Agenda 21 (1992), estabelece os direitos e as obrigações dos Estados bem como as medidas em que devem se basear as atividades voltadas para a proteção e o desenvolvimento sustentável do ambiente marinho e costeiro, bem como de seus recursos. Neste contexto, novas abordagens integradas de gerenciamento e desenvolvimento marinho e costeiro nos planos nacionais, sub-regionais, regionais e mundial, devem auxiliar nas decisões sobre o manejo e conservação, que se caracterizem pela antecipação, mais do que pela reação.

A zona costeira do Brasil possui um grande potencial de recursos costeiros e marinhos, além de abrigar vários ecossistemas de alta relevância ambiental como os mangues, restingas, estuários, recifes de corais, dentre outros. Tais ecossistemas

são extremamente produtivos e apresentam ao mesmo tempo grande sensibilidade e susceptibilidade à degradação de origem antropogênica (TOMASI, 1998).

No Brasil, a zona costeira prolonga-se em uma faixa de 7.367 Km de extensão, o que equivale a 5% do território nacional. Conforme dados do Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Governo Federal, mais da metade da população brasileira reside a menos de 200 Km de distância do mar (MDC/MMA, 1996), distribuindo-se, portanto, de modo desigual no país (ROSA *et al.*, 1997).

O crescimento desordenado da população e o adensamento dos núcleos urbanos nas regiões costeiras observados hoje em nosso território ocorrem desde o início de sua colonização, visto que a ocupação do território brasileiro ocorreu no sentido dos núcleos costeiros para a hinterlândia. Estas áreas foram alvos de um processo de ocupação acelerado que teve como vetores básicos a urbanização, o turismo e a industrialização. (MDC/MMA, 1996).

A intensa ocupação urbana associada à atividade humana resulta em uma exploração irracional dos recursos e a conseqüente degradação do ambiente costeiro (PATIN, 1982). Com o surgimento de grandes centros urbanos próximos à faixa litorânea têm-se observado mudanças significativas na qualidade das águas costeiras e estuários, principalmente em função do despejo de esgotos domésticos e industriais não tratados, diretamente nos corpos d'água (ENGLISH & KROSS, 2000). A proteção natural da maior parte destas áreas contra ventos e ondas transformou-os também em locais ideais para a instalação de complexos portuários industriais, assim como de grandes concentrações humanas atraídas pelo seu desenvolvimento (So, 1978). De toda a população que habita a zona costeira, apenas 20% dispõe de

sistemas de coleta e tratamento de esgoto, sendo que cerca de 90% do lixo coletado é encaminhado para aterros sanitários a céu aberto, que em sua grande maioria, encontram-se próximos ao mar, rios, lagoas ou áreas de preservação ambiental (MDC/MMA, 1996).

Uma ampla variedade de compostos químicos ocorre naturalmente no ambiente produzidos através do metabolismo de plantas, toxinas animais e hidrocarbonetos naturais, no entanto, os xenobióticos produzidos pelo homem têm crescido diariamente tanto em sua variedade quanto em quantidade (LIVINGSTONE, 1998; CAJARAVILLE *et al.*, 2000). Segundo o "Chemical Abstract Service's Registry of Chemicals" (CAS, 2003), existem mais de 20 milhões de substâncias químicas registradas, sendo que cerca de 4 mil são registradas a cada dia. O rápido avanço do desenvolvimento industrial em todo o mundo tem contribuído para o grande aporte de contaminantes ao ambiente oceânico, afetando não apenas a vida aquática como também provocando sérias ameaças a toda a vida no planeta (NIYOGI *et al.*, 2001).

Segundo Walker *et al.* (1996), podemos dividir os xenobióticos em duas grandes classes, sendo elas:

- **inorgânicos:** em sua grande maioria metais (cátions) ou ânions. Os ânions como os nitratos e os fosfatos, geralmente utilizados na forma de fertilizantes, não são considerados tóxicos, no entanto, podem causar sérios problemas ambientais (eutrofização), se utilizados em grandes quantidades ou então quando liberados através dos esgotos não tratados. Os metais, tais como o cobre (Cu), o chumbo (Pb), o manganês (Mn), o zinco (Zn), o estanho (Sn), o alumínio (Al), a prata (Ag), o cádmio (Cd), o mercúrio (Hg), o cromo (Cr) e o ferro (Fe) (tanto em sua forma iônica

quanto associados a radicais orgânicos e inorgânicos), possuem conhecida toxicidade nos sistemas biológicos.

- **orgânicos:** são aqueles compostos formados por esqueletos de carbono, dentre eles podemos citar: os hidrocarbonetos em geral (alifáticos, ramificados, cíclicos e aromáticos), as bifenilas policloradas (BPCs), os dibenzofuranos policlorados (DFPC) e as dibenzodioxinas policloradas (DDPC), os organoclorados (inseticidas de primeira geração, DDT e compostos relacionados), os organofosforados e carbamatos (inseticidas de segunda geração), os piretróides (inseticidas de terceira geração), clorofenóis e outras classes de compostos utilizados como herbicidas, detergentes e rodenticidas.

Os xenobióticos orgânicos são mais freqüentes e mais disponíveis nos ecossistemas aquáticos, em comparação aos inorgânicos. Por terem características apolares, tais compostos são absorvidos facilmente pelos organismos presentes (por via hídrica e/ou via trófica), atravessam as membranas biológicas passivamente e são distribuídos para os tecidos através dos fluídos corpóreos geralmente associados a lipoproteínas (HODGSON & LEVI, 1994).

Ao longo da Zona Costeira do Brasil existem vários relatos de casos de contaminação ambiental **aguda**, como por exemplo, os derramamentos de petróleo na Baía de Guanabara (RJ) e em Araucária (PR) no ano de 2000, ou de lançamento de esgotos domésticos, onde o aporte de poluentes ou matéria orgânica é tão intenso que provoca mortalidades massivas de animais aquáticos. Nestas situações fica evidente a fonte poluidora e as conseqüências destas descargas para o meio ambiente. Entretanto, o tipo mais comum de poluição, observado em nosso litoral, é

o **sub-crônico**, caracterizado por descargas periódicas de efluentes de origem doméstica e/ou industrial, em rios e estuários, que comprometem o equilíbrio deste ecossistema de uma forma, por vezes menos evidente, mas nem por isso, menos tóxica.

Segundo Adams *et al.* (1989), Timbrell (1991) e Stegeman *et al.* (1992), os contaminantes lançados no ecossistema podem provocar uma série de distúrbios metabólicos nos organismos expostos, tais como neurotoxicidade, infertilidade, disfunções imunológicas, diminuição do desenvolvimento e reprodução, alterações genéticas, susceptibilidade a doenças e incidência de patologias e que podem levar à morte dos indivíduos. Isso pode se refletir em uma diminuição dos estoques pesqueiros, diminuição da qualidade dos recursos vivos, bem como alterar toda a cadeia trófica dos oceanos. Além disso, muitas substâncias poluidoras causam problemas particulares ao ambiente marinho devido a sua toxicidade, persistência e bioacumulação na cadeia alimentar (AGENDA 21, 1992). Deste modo, a saúde da população humana pode ser comprometida pela ingestão de organismos contaminados (DE FLORA *et al.*, 1991; GOUVEA *et al.*, 1994).

A necessidade de detectar e avaliar o impacto de poluentes sobre a qualidade ambiental, particularmente quando presentes em baixas concentrações, tem levado ao desenvolvimento de diferentes metodologias.

Tradicionalmente, os programas de avaliação e monitoramento da contaminação aquática têm analisado os níveis dos principais tipos de poluentes (metais pesados, hidrocarbonetos, organoclorados, organofosforados, radionuclédeos, compostos organoestênicos, entre outros) na água, no sedimento e em alguns organismos de importância econômica para a região de estudo. Sem

dúvida, este tipo de informação é fundamental, sob o ponto de vista social e econômico, pois são sensíveis e específicas. Por outro lado, análises químicas não evidenciam as conseqüências toxicológicas destas substâncias na biota (FENT, 2003). Além disso, os valores de bioacumulação nos animais não necessariamente refletem o estado de saúde dos mesmos (PELLERIN-MASSICOTTE, 1994). Por esse motivo, o Conselho Internacional para a Exploração do Mar (International Council for the Exploitation of the Sea, ICES) tem recomendado que os novos programas de monitoramento ambiental marinho utilizem análises de biomarcadores como metodologias complementares que possam expressar o grau de toxicidade causado pelos contaminantes aos organismos (BURGEOT *et al.*, 1996).

Quando expostos aos agentes estressores ambientais, os organismos respondem através da modificação de diferentes biomarcadores a nível molecular, histológico, imunológico, fisiológico e populacional, antes do aparecimento de doenças ou mesmo da morte (SHUGART, 1994). Assim sendo, **Biomarcadores** são, por definição, alterações bioquímicas e moleculares que indicam a exposição à determinada classe de xenobióticos (biomarcador de exposição) e/ou que indicam os efeitos dos contaminantes sobre os organismos (biomarcador de efeito) (WALKER *et al.*, 1996; LOPES-BAREA & PUEYO, 1998; CAJARAVILLE *et al.*, 2000; KURELEC *et al.*, 2000; REGOLI *et al.*, 2002). Apesar do fato de os efeitos tóxicos dos contaminantes serem melhores entendidos no nível celular, extrapolações destas alterações bioquímicas sobre as populações, e até mesmo sobre os ecossistemas ainda são incertas e difíceis de serem analisadas. Deste modo, as alterações bioquímicas e/ou moleculares utilizadas como biomarcadores devem estar relacionadas com outros parâmetros que reflitam modificações deletérias no organismo, como por exemplo,

alterações nas taxas de alimentação e crescimento, ou na população, como modificações na reprodução, padrão de migração ou viabilidade da prole (LUOMA, 1996; KURELEC *et al.*, 2000).

A análise de biomarcadores pode auxiliar na detecção precoce da existência de alterações no ambiente por substâncias tóxicas biologicamente significativas, antes da ocorrência de danos irreversíveis ao ecossistema. Da mesma forma, pode contribuir para identificar espécies ou populações em risco de contaminação, avaliar a contaminação, e o que é fundamental, determinar o grau de severidade dos efeitos causados pelos xenobióticos (HUGGETT *et al.*, 1992; STEGEMAN *et al.*, 1992; DE CAPRIO, 1997; VAN DER OOST, BEYER & VERMEULEN, 2003).

Para melhor entender a situação atual da poluição da costa brasileira, assim como os efeitos tóxicos provocados pelos principais poluentes lançados neste meio, foi iniciado um Programa Nacional de Monitoramento do Ambiente Marinho, coordenado pelo Instituto de Estudo do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM-Ministério da Marinha), do qual nosso grupo de pesquisa está participando desde sua implantação (Outubro de 1996), com o objetivo de preservar a qualidade dos recursos vivos dos ecossistemas costeiros brasileiros, bem como da qualidade de vida da população.

Neste programa, estão sendo realizadas análises químicas na água de superfície e fundo, assim como nos sedimentos (metais pesados, hidrocarbonetos, organoclorados, radionuclédeos). Além disso, amostras de fígado de peixes bentônicos estão sendo coletadas para a realização de análises bioquímicas em nosso laboratório. Segundo Hodgson & Levi (1994) e Van der Oost, Beyer & Vermeulen (2003), o fígado é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos.

Este projeto, denominado MOMAM (Monitoramento do Ambiente Marinho) segue as recomendações do Conselho Internacional para a Exploração do Mar (International Council for the Exploitation of the Sea, ICES).

Diferentes tipos de biomarcadores podem ser analisados nos animais expostos a agentes estressores presentes no ambiente, entretanto, para um estudo deste tipo, devem ser selecionados aqueles que expressam a presença de diferentes classes de contaminantes (orgânicos e inorgânicos). De acordo com Van der Oost, Beyer & Vermeulen (2003), é possível avaliar o impacto de xenobióticos tóxicos em peixes, utilizando-se vários tipos de biomarcadores de exposição e efeito. Geralmente, os mais sensíveis biomarcadores de efeito, são alterações nos níveis e na atividade de enzimas de biotransformação, sendo que em peixes, a atividade destas enzimas pode ser induzida ou inibida frente à exposição a xenobióticos (BUCHELI & FENT, 1995).

Dentre os biomarcadores de compostos orgânicos, o sistema multienzimático microsomal citocromo P450 ou sistema das oxidases de função mista (MFO), possui papel de destaque (NIYOGI *et al.*, 2001; VAN DER OOST; BEYER & VERMEULEN, 2003). Este sistema exerce função central no metabolismo de compostos endógenos (esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas) e exógenos (químicos naturais, vários hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policlorados (BPCs), inseticidas, drogas e agentes terapêuticos, químicos carcinogênicos), catalisando tanto reações de detoxificação quanto de bioativação destes compostos, freqüentemente determinando a sua toxicidade (STEGEMAN, WOODIN & SMOLOWITZ, 1990; STEGEMAN, 1993; VROLIJK, TARGETT & GERHART, 1994; KLOEPPER-SAMS & STEGEMAN,

1994; MIRANDA *et al.*, 1994; , JOSEPHY, 1997; SNYDER, 2000; TERAMITSU *et al.*, 2000; ØSTBY & KROKJE, 2002).

O processo de detoxificação destes xenobióticos envolve uma seqüência metabólica complexa, a qual é mediada por duas fases: fase I (assintética) e fase II (sintética). As reações de biotransformação de fase I são catalisadas pelo sistema citocromo P450 e compreendem hidroxilações aromáticas e alifáticas, N-oxidações, sulfoxidações, epoxidações, N-S e O-dealquilações, peroxidações, desaminações e desalogenações, produzindo assim, metabólitos mais hidrofílicos. No entanto, alguns produtos deste metabolismo podem se tornar ainda mais reativos, ocasionando danos celulares e em certos casos iniciando um processo carcinogênico (HONG & YANG, 1997). Deste modo, estes metabólitos necessitam passar por uma segunda fase de biotransformação (fase II), quando serão conjugados a moléculas endógenas de baixo peso molecular, resultando em substâncias mais hidrossolúveis e, conseqüentemente mais fáceis de serem excretadas (BUCHELI & FENT, 1995; BUHLER & WANG-BUHLER, 1998; VAN DER OOST, BEYER & VERMEULEN, 2003). Assim, na presença de contaminantes pode ocorrer uma indução na síntese do citocromo P450, a qual tem sido muito utilizada para expressar o nível de contaminação as quais os animais estão expostos no ambiente (Figura 1).

As isoformas do citocromo P450 (CYPs) incluem uma única superfamília de hemoproteínas de membrana, encontrados predominantemente no retículo endoplasmático dos hepatócitos (STEGEMAN *et al.*, 1992). Esta família de proteínas, composta por várias subfamílias, é classificada de acordo com a composição, seqüência e peso molecular dos aminoácidos e é amplamente distribuída em todos os organismos eucariotos e procariotos (BUHLER & WANG-BUHLER, 1998; SNYDER, 2000;

MILLER, ADDISON & BANDIERA, 2003). Dentre estas, a subfamília que tem sido mais estudada é a CYP1A (BAINY, WOODIN & STEGEMAN, 1999). Em animais aquáticos, a indução da subfamília CYP1A em fígado de peixes tem sido utilizada extensivamente como um primeiro sinal altamente sensível para a detecção indireta da presença e do efeito de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policlorados (BPCs), dioxinas e compostos relacionados (STEGEMAN *et al.*, 1987; ADDISON & EDWARDS, 1988; COLIER *et al.*, 1992; BEYER & GOKSØYR, 1993; FÖRLIN & CELANDER, 1993; LINDSTRÖM-SEPPÄ, FARMANFARMAIAN & STEGEMAN, 1993; LIVINGSTONE *et al.*, 1993; ADDISON, WILLIS & ZINCK, 1994; HOLDWAY, BRENNAN & AHOKAS, 1994; MONOSSON & STEGEMAN, 1994; RICE & SCHLENK, 1995; SPIES *et al.*, 1996; AAS *et al.*, 2000; CAJARAVILLE *et al.*, 2000; STEPHENSEN *et al.*, 2000; TERAMITSU *et al.*, 2000; AL-ARABI & GOKSØYR, 2002; WEBER *et al.*, 2002). Existem evidências de que a indução (assim como a atividade específica) da CYP1A em peixes expostos a tais contaminantes no ambiente, ocorre de maneira dose-dependente (STEGEMAN & LECH, 1991).

A indução da CYP1A pela presença de xenobióticos, envolve a síntese de RNAm com posterior aumento na produção dessa proteína. Esse mecanismo em peixes está relacionado com receptores intracelulares, entre eles, uma proteína tetramérica de 300 KDa localizada no citosol das células, denominada de receptor aril hidrocarboneto (AhR), (GOKSØYR & FÖRLIN, 1992). Tal indução, pode ser detectada através da atividade da enzima etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) ou por imunodeteção através do uso de anticorpos específicos (STEGEMAN, KLOPPER-SAMS & FARRINGTON, 1986; STEGEMAN & LECH, 1991; COUSINOU *et al.*, 2000; SCHLEZINGER & STEGEMAN, 2001; WILSON, KRUYNSKI & ADDISON, 2001). Segundo Miller *et al.* (1999) e Cousinou *et al.* (2000), a técnica de RT-PCR para o gene *cyp1A* também pode ser

utilizada com esta finalidade em programas de monitoramento. No presente trabalho, para quantificação de CYP1A foram utilizadas as técnicas de imunodeteção. O "North Sea Task Force Monitoring Master Plan" e o "National Status & Trends Program" na Europa e nos Estados Unidos respectivamente e o programa de biomonitoramento do Mediterrâneo Nordeste (MED-POL), em países como Espanha, Itália e França, são exemplos de programas de monitoramento ambiental que analisaram este biomarcador em animais destes locais, correlacionando com respostas de contaminantes do tipo HPAs, BPCs, dioxinas, dentre outros, detectados nestas áreas (GOKSØYR & FÖRLIN, 1992; RATTNER *et al.*, 1993; BURGEOT *et al.*, 1996; CAJARAVILLE *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001).

Outros tipos de biomarcadores propostos pelo ICES e MED-POL, importantes de serem analisados em programas de monitoramento aquático, são as enzimas de defesa antioxidante e de conjugação de xenobióticos, pois fornecem informações importantes a respeito da capacidade de defesa contra a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como da capacidade de excreção dos compostos tóxicos pelos organismos (BURGEOT *et al.*, 1996; STEPHENSEN *et al.*, 2000). Durante a biotransformação de xenobióticos pela CYP1A, pode ocorrer a formação metabólitos eletrofílicos, tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) que podem reagir com as biomoléculas, promovendo alterações bioquímicas que, por sua vez, desencadeiam processos como a lipoperoxidação, oxidação de bases de DNA, inativação de enzimas e degradação de proteínas, culminando em lesão celular e, até mesmo, na morte do organismo (TIMBREL, 1991; LIVINGSTONE *et al.*, 1992; SIES, STAHL & SUNDQUIST, 1992; ACETO *et al.*, 1994).

A extensão do dano causado por estes compostos vai depender da eficiência dos sistemas de defesa antioxidante e de conjugação de xenobióticos (WINSTON, LIVINGSTONE & LIPS, 1990). Os sistemas antioxidantes de defesa celular podem ser enzimáticos e não-enzimáticos (Tabela 1), e atuam na prevenção da formação das espécies reativas de oxigênio (ERO), inativação das reações oxidativas e reparação do dano causado (SIES, 1993). Dentre os sistemas enzimáticos, os mais importantes são as enzimas superóxido dismutase (SOD) (E.C.:1.15.1.1), catalase (CAT) (EC: 1.11.1.6) e a glutathiona peroxidase (GPx) (E.C.: 1.11.1.9) (HEBBEL, 1986; SIES, 1993). Outra enzima relacionada com as defesas antioxidantes é a glutathiona redutase (GR) (E.C.: 1.6.4.2).

As superóxido dismutase (SOD) são um grupo de metaloenzimas essenciais peça chave ao sistema de defesa antioxidante, pois catalisam a dismutação do radical superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio, através da seguinte reação: $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (MC CORD & FRIDOVICH, 1969; STEGEMAN *et al.*, 1992) (Figura 1). Existem três formas conhecidas de SOD: a Cu, Zn-SOD, forma citosólica dos eucariontes, a Mn-SOD, de bactérias e mitocôndrias e a Fe-SOD, encontrada apenas em bactérias (WANDERS & DENIS, 1992; PEDRAJAS, PEINADO & LÓPEZ-BAREA, 1995). A catalase (CAT) por sua vez, participa dos sistemas de defesa contra as ERO catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, através da seguinte reação: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ (atividade de catalase) (Figura 1). Entretanto, esta enzima também catalisa a oxidação de doadores de H como fenóis, etanol, metanol e ácido fórmico, com o consumo de um mol de peróxido: $ROOH + AH_2 \rightarrow H_2O + ROH + A$ (atividade de peroxidase). A reação predominante depende da concentração de doadores de H e da concentração ou taxa de produção de H_2O_2

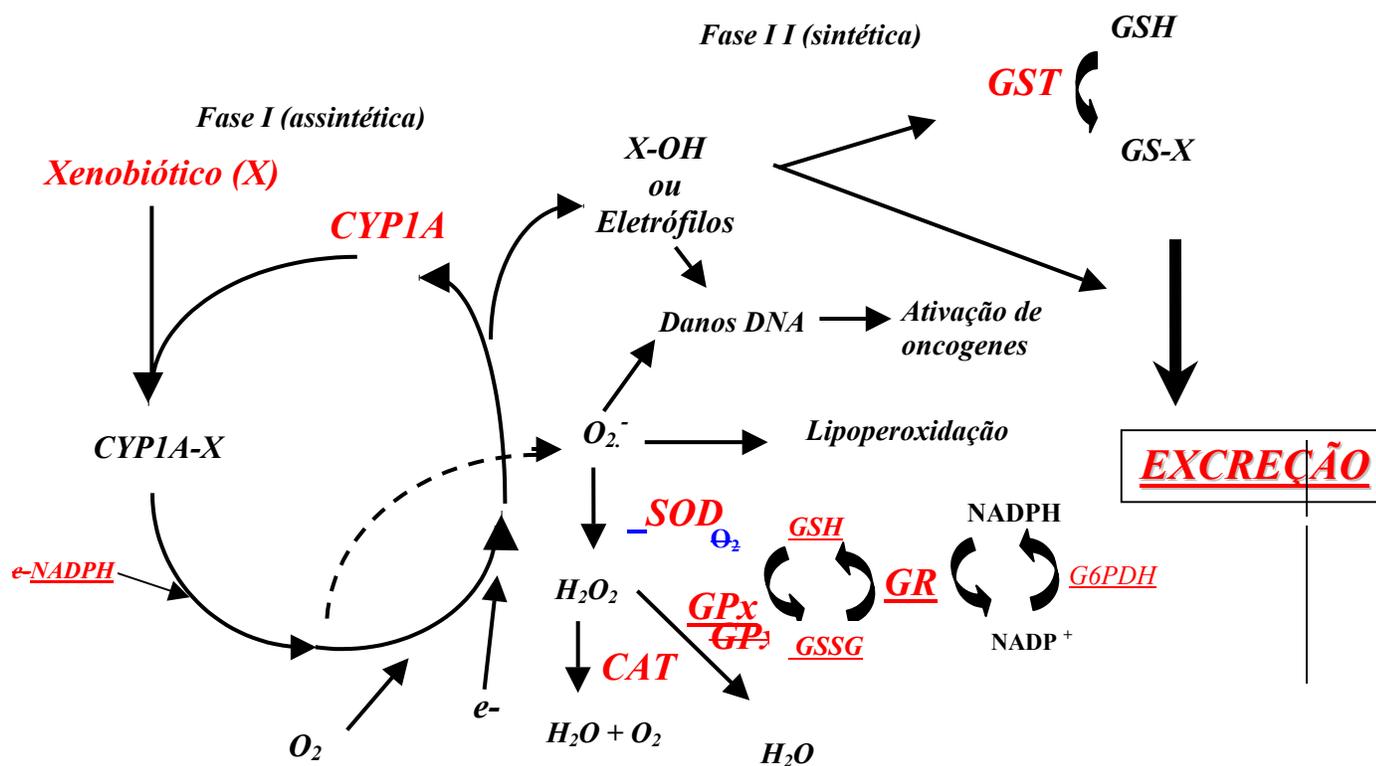
no sistema. Entretanto, enquanto a reação peroxidativa é relativamente lenta, a decomposição do H_2O_2 ocorre rapidamente (AEBI, 1984; WILHELM-FILHO, 1996).

Dentre as peroxidases, a de maior relevância é a GPx. Esta enzima possui selênio no seu sítio catalítico e utiliza o tripeptídeo tiólico glutationa (GSH) como doador de elétrons para fazer a redução do H_2O_2 a água e outros peróxidos orgânicos, tais como os lipoperóxidos provenientes da peroxidação lipídica, impedindo assim a fase de propagação deste processo (KEELING & O'BRIEN, 1982; OTTO & MOON, 1996; VAN DER OOST, BEYER & VERMEULEN, 2003), conforme a equação: $H_2O_2 + RH_2 \rightarrow 2H_2O + R$ (substrato). Durante o processo catalisado pela GPx ocorre a oxidação da glutationa. Assim, é importante que a relação da concentração entre GSH/GSSG seja elevada para a manutenção do poder redutor intracelular (KAPPUS, 1987). Nas células normais isto ocorre pela presença de enzimas acessórias como a glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e GR, as quais fornecem os co-substratos NADPH e GSH, respectivamente, necessários para o funcionamento do sistema de defesa celular contra o estresse oxidativo (REED, 1994) (Figura 1).

Caso a atividade destas enzimas, juntamente com a de outras enzimas antioxidantes, estejam baixas, pode ser estabelecido um desequilíbrio pró-oxidativo denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo está associado a vários processos mutagênicos e carcinogênicos, que podem ser deletérios para a célula, e assim comprometer o metabolismo dos organismos aquáticos (DI GIULIO *et al.*, 1989; SIES, STAHL & SUNDQUIST, 1992).

Tabela 1: Principais defesas antioxidantes nos sistemas biológicos (SIES, 1993).

Sistema	Função
Não Enzimáticos	
α -Tocoferol	Intercepta reações de lipoperoxidação
β -Caroteno	<i>Quencher</i> (anulador) de oxigênio singlete
Licopeno	<i>Quencher</i> de oxigênio singlete
Ubiquinol 10	Sequestrador (<i>Scavenger</i>) de radicais
Ácido ascórbico (vitamina C)	Inúmeras funções anioxidantes
Ácido úrico	Seqüestrador (<i>Scavenger</i>) de radicais
Glutationa	Inúmeras funções antioxidantes
Bilirubina	Antioxidante plasmático
Flavonóides	Antioxidante em plantas (rutina, etc)
Proteínas plasmáticas	Ligantes à metais (ceruloplasmina, etc)
Químicos	Aditivos alimentares, drogas
Enzimáticos	
Superóxido dismutase	Reações de dismutação do $O_2^{\cdot -}$
Catalase	Catalisa reação sobre H_2O_2
Glutationa peroxidase	Catalisa reação sobre peróxidos
Enzimáticos auxiliares	
Enzimas de conjugação	Glutationa S-transferase, UDP-Glucoronil transferase
Glutationa redutase	Mantém os níveis de GSH
NADPH	Para atividade da GSSG redutase
Sistemas de reparo	Sistemas de reparo de DNA, “Turnover” de proteínas oxidadas “Turnover” de fosfolípidios oxidados



Modificado de HODGSON & LEVI, 1994

Figura 1: Esquema geral mostrando a seqüência de eventos de formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos celulares.

Legenda: CYP1A, isoforma de citocromo P4501A; SOD, superóxido dismutase; GPx, glutaciona peroxidase; GR, glutaciona redutase; CAT, catalase; GST, glutaciona-S-transferase; GSH, glutaciona reduzida; GSSG, glutaciona oxidada; GS-X, conjugado de xenobiótico com glutaciona; CYP1A-X, conjugado de xenobiótico com isoforma de citocromo P4501A; X-OH, xenobiótico hidroxilado; e⁻, elétron molecular; O₂, oxigênio molecular; O₂⁻, radical ânion superóxido; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; H₂O, molécula de água; X, xenobiótico; nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada); NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida).

Como mencionado anteriormente, durante a biotransformação de xenobióticos, são produzidos compostos derivados que podem causar sérios danos às células e/ou biomoléculas. Tais compostos necessitam então ser conjugados a

moléculas endógenas, tais como acetato, sulfato, ácido glucurônico, glutatona, entre outros, através de reações de conjugação para aumentar a hidrossolubilidade e, dessa maneira, facilitar sua excreção. Dentre as enzimas mais importantes neste processo, também proposta como biomarcador pelo ICES e MED-POL, está a família de enzimas glutatona-S transferase (GST) (EC: 2.5.1.18), envolvidas na reação de conjugação de uma variedade de metabólitos eletrofílicos, tais como os epóxidos produzidos pelo citocromo P450, com o tripeptídeo glutatona (GSH) (SOLÉ *et al.*, 1996; JOSEPHY, 1997; FITZPATRICK *et al.*, 1997) (Figura 1). As GSTs são uma superfamília multigênica de enzimas diméricas, multifuncionais, preferencialmente solúveis e bem distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos desde bactérias até mamíferos, onde são mais estudadas (FITZPATRICK & SHEEHAN, 1993; HENSON, SHEEHY & GALLANGHER, 2000). As GSTs desempenham um papel importante no processo de biotransformação de compostos derivados dos xenobióticos como: antibióticos, vasodilatadores, herbicidas, inseticidas, analgésicos, agentes anticancerígenos e carcinogênicos (HODGSON & LEVI, 1994). Baseado em certas propriedades como, especificidade pelo substrato, reatividade imunológica e seqüência de aminoácidos, as GSTs podem ser agrupadas em quatro classes: α , μ , π e θ ; sendo principalmente localizadas na fração citosólica do fígado. A maioria dos estudos deste tipo utilizam a atividade da GST total usando o substrato artificial 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB), o qual é conjugado pelas isoformas de GST, com exceção da classe θ (VAN DER AAR *et al.*, 1996). Um aumento na atividade da GST hepática tem sido relatado em vários estudos, em peixes expostos a HPAs, BPCs, e DDPCs (VAN DER OOST, BEYER & VERMEULEN, 2003).

No Brasil, é relativamente recente a preocupação com a proteção de ecossistemas marinhos e existem poucos grupos voltados para a avaliação do impacto biológico de poluentes lançados no mar.

A escassez de dados ecotoxicológicos para espécies características da costa brasileira limita o gerenciamento adequado de seus ecossistemas marinhos e estuarinos. Os padrões de emissão de substâncias tóxicas e as concentrações máximas permitidas (CMP) em ambientes aquáticos são baseadas em padrões americanos estabelecidos a partir de pesquisas científicas realizadas por órgãos de proteção ambiental dos Estados Unidos. Uma vez que nossas condições ambientais são bem diferentes daquelas regiões, é imprescindível que sejam realizados estudos sobre os efeitos dos poluentes com espécies nativas para adequar a legislação à realidade brasileira (MORAES, 2001).

Existe uma carência de estudos que evidenciem a contaminação, bem como as respostas bioquímicas dos peixes presentes na costa brasileira causadas pela contaminação aquática. Estudos realizados por Bainy *et al.* (1996) evidenciaram que peixes presentes na Represa Billings (São Paulo) estão sofrendo sérios danos bioquímicos, provavelmente como decorrência do grau de contaminação daquele local. Torres *et al.* (1997), estudaram alguns parâmetros bioquímicos em *Merluccius hubbsi* (Merluza) e *Lophius gastrophysus* (Peixe-sapo) coletados na região de Arraial do Cabo. Kehring, Malm & Moreira (1998), analisaram os níveis de mercúrio no tecido muscular branco de *Micropogonias furnieri* coletados na Baía da Guanabara, Baía de Sepetiba, Baía de Ilha Grande e Lagoa de Conceição e Costa, Paiva & Moreira (2000), analisaram os níveis totais deste mesmo metal em mexilhões da espécie *Perna perna* na Baía da Guanabara durante 1988 e 1998.

CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

Segundo o (MDC/MMA, 1996) o litoral dos estados brasileiros é dividido em zonas distintas de acordo com suas características geográficas e populacionais.

No presente trabalho foi realizado um estudo em locais pertencentes a duas zonas costeiras do litoral brasileiro: a zona costeira do estado do Rio de Janeiro (regiões de Arraial do Cabo, Baía da Guanabara, Baía de Sepetiba e Angra dos Reis) e a zona costeira do estado de São Paulo (região de São Sebastião). Todas estas regiões, estão localizadas no sudeste da costa brasileira, entre a Serra do Mar e o oceano Atlântico.

Arraial do Cabo localizada ao norte da costa do estado do Rio de Janeiro (região dos lagos) (Figuras 2A e 2B), é uma região com grande vocação para o turismo, atualmente não impactada, mas que vem sofrendo grande especulação imobiliária e ocupação indiscriminada, o que tem gerado vários problemas sanitários nos últimos anos. Possui principalmente atividades voltadas ao ecoturismo, que envolvem a utilização de barcos para passeio, pescarias e mergulhos. Destaca-se também, o cultivo de bananas e uma fábrica de soda cáustica e carbonato (TANIGUCHI, 2001). Nesta região é onde se encontra a área de maior ressurgência da costa brasileira.

A Baía da Guanabara (Figuras 2A e 2C) é uma área costeira de grande importância econômica no sudeste da costa brasileira, possuindo uma área total de 384 Km², incluindo 59 Km² de ilhas (KEHRING, MALM & MOREIRA, 1998; XAVIER DE BRITO, BRÜNING & MOREIRA, 2002). É rodeada por três grandes cidades, dentre elas, Rio de

Janeiro, a segunda maior cidade do país, São Gonçalo e Niterói, perfazendo um total de cerca de 11 milhões de habitantes (XAVIER DE BRITO, BRÜNING & MOREIRA, 2002). A Baía da Guanabara apresenta graves problemas ambientais, sendo que a poluição de suas águas por descargas de matéria orgânica doméstica e industrial tem tido grande atenção nas últimas décadas (SILVA *et al.*, 2003), que tornou necessário o constante monitoramento de sua contaminação (REZENDE & LACERDA, 1986). Particularmente na Baía da Guanabara existem diversas indústrias de grande impacto ao meio ambiente, tais como os terminais de dutos de petróleo, complexos químicos e metal-mecânica e estaleiros navais (FEEMA, 1998). Além disso, existe a estimativa de que mais de 470 toneladas de matéria orgânica proveniente de descargas domésticas (90% não tratadas), são despejadas diariamente na baía (SILVA *et al.*, 2003). Outro grande impacto que a baía vem sofrendo de forma episódica está relacionado com o derramamento de petróleo em suas águas, como no caso do acidente ocorrido na refinaria de Duque de Caxias (PETROBRAS) em 18 de Janeiro de 2000, onde aproximadamente 1.300 m³ de óleo cru (cerca de 340.000 galões) foram derramados dentro da baía (GABARDO, MENICOMI & FALCÃO, 2001; MENICOMI *et al.*, 2001).

Na região de Sepetiba (Figuras 2A e 2D) aproximadamente a 60 Km ao sul da cidade do Rio de Janeiro, localiza-se a Baía de Sepetiba. As atividades econômicas principais desta região estão associadas a indústria pesqueira e atividades turísticas, sendo que um projeto de instalação de um complexo petroquímico tem sido muito discutido e alguns estudos foram realizados para determinar os níveis de poluentes em vários locais da região (KAREZ *et al.*, 1994), especialmente com relação aos níveis de metais pesados (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2002). Segundo Pessanha & Araújo (2003), nas últimas décadas, esta região tem sofrido um crescente processo de degradação

devido às descargas industriais e municipais que chegam no local, pelos rios e canais de dragagem que percorrem a cidade do Rio de Janeiro.

Na região de Angra dos Reis (Figuras 2A e 2E) podem ser observadas algumas reservas importantes da Mata Atlântica, com várias regiões de manguezais e restingas. Algumas áreas degradadas que apresentam risco a população podem ser observadas nesta região, particularmente na Usina Nuclear de Angra dos Reis, além de um terminal de petróleo na Baía de Ilha Grande.

Na região norte da zona costeira do estado de São Paulo localiza-se São Sebastião (Figuras 2A e 2F), onde existe uma intensa urbanização que ocupa grande parte desta região. As atividades econômicas predominantes são o turismo, o comércio industrial e complexo portuários (ZANARDI *et al.*, 1999).

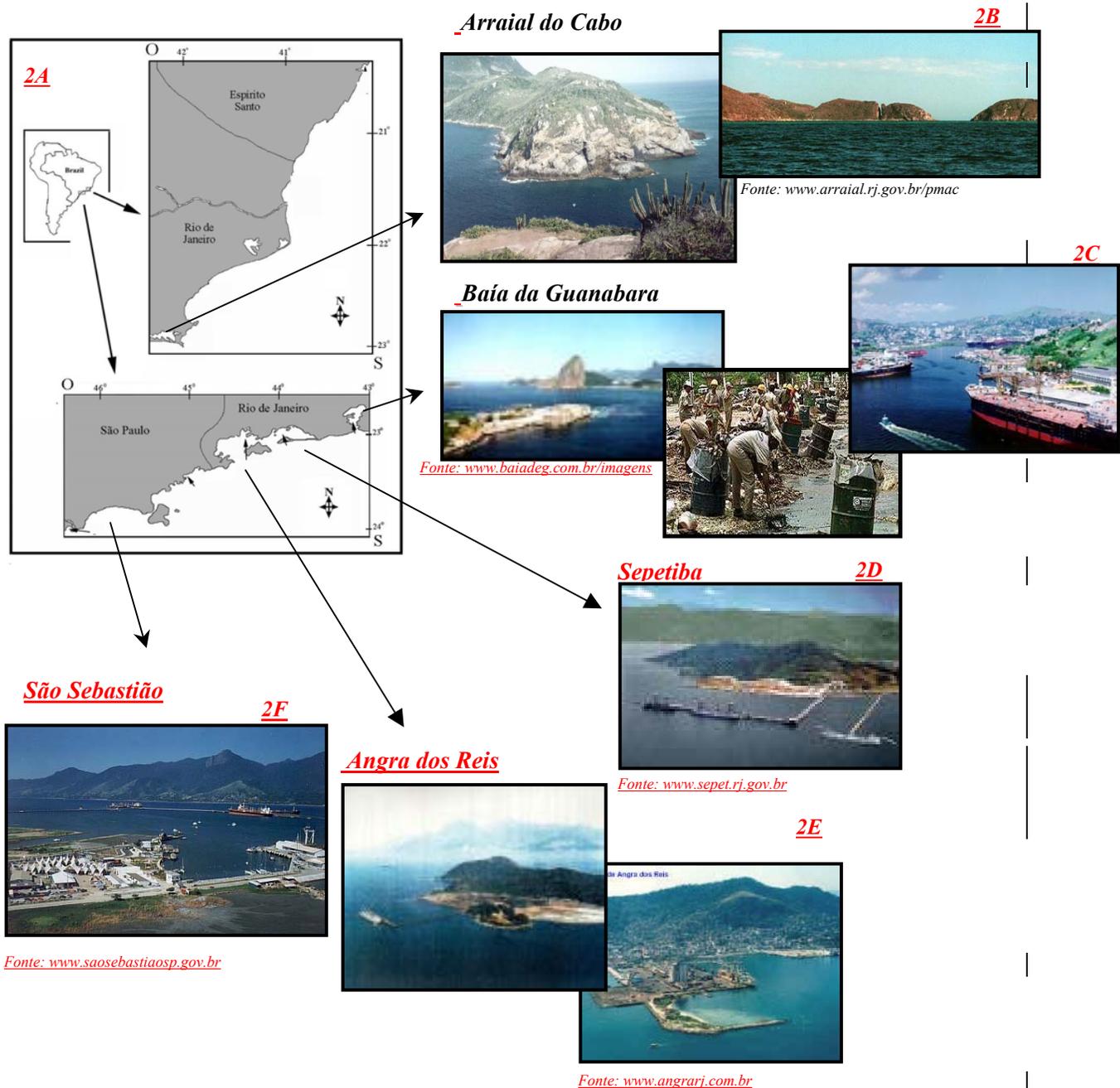


Figura 2: Localização das áreas de coleta. **2A-** Mapa do Brasil com as respectivas figuras ilustrativas da parte Norte e Sul do litoral sudeste; **2B-** fotos ilustrativas de Arraial do cabo; **2C-** fotos ilustrativas da Baía da Guanabara; **2D-** foto ilustrativa de Sepetiba; **2E-** fotos ilustrativas de Angra dos Reis; **2F-** foto ilustrativa de São Sebastião.

BIOLOGIA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

Devido ao fato de se tratar de um dos principais componentes da cadeia alimentar aquática e uma importante fonte de alimento para os humanos, peixes têm sido muito utilizados em programas de monitoramento (TANIGUCHI, 2001).

Neste trabalho foram analisadas amostras de fígados de peixes pertencentes às famílias HAEMULIDAE (*Orthopristis ruber*) e SCIAENIDAE (*Micropogonias furnieri*).

Orthopristis ruber (Cuvier, 1830) (Figura 3A), é conhecido popularmente como corcoroca, corcoroca-de-pedra, corcoroca-de-lama, corcoroca-legítima e corcoroca-verdadeira. Possui distribuição no Atlântico Ocidental, sul do Caribe ao Rio Grande do Sul, no Brasil. São peixes que habitam zonas costeiras, em águas rasas de baías, praias, lagoas salobras, estuários, canais, de 2 a 200 metros de profundidade, sobre fundos de areia, lama, cascalho e rochas (FIGUEIREDO, 1977). Formam cardumes numerosos e eventualmente migratórios na época da reprodução, que ocorre nos meses mais quentes nas regiões tropicais e na primavera nas regiões temperadas. Esta espécie prefere as águas túrbidas, às claras. Os jovens são vistos em pequenos cardumes, entre algas, junto a ouriços e sobre o fundo de areia próximo a costões. Quando retirados da água, emitem um ronco ao atritar seus ossos da faringe, que ressoam pela bexiga natatória (CARVALHO-FILHO, 1994). Segundo Menezes & Figueiredo (1980), espécimes de *O. ruber* aparecem com frequência em arrastões de praia e com redes de porta, mas, apesar de relativamente abundantes, possuem baixo valor comercial.

Com o nome popular de Corvina, *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Figura 3B), é abundante em ambientes variados, sobre fundos de areia, lodo e

cascalho, em estuários, baías e ao longo da costa entre 1 e 100 metros de profundidade, sendo mais comuns a profundidade de 30 metros. São peixes que formam grupos e cardumes, por vezes muito numerosos. Alimentam-se de invertebrados bêmtonicos como crustáceos, moluscos e vermes, além de pequenos peixes. Reproduzem-se no inverno, quando assumem a cor dourada a bronzeada em geral e o olho torna-se amarelo. Nesta época, formam então enormes concentrações em águas estuarinas (mais calmas) e podem ingressar nos rios, utilizando estes ambientes para alimentação e crescimento. Os ovos, centenas de milhares, são flutuantes e, juntamente com as larvas e jovens, são presas constantes de peixes. Os jovens alimentam-se de zooplâncton, ocorrendo de preferências em águas salobras e estuarinas (CARVALHO-FILHO, 1994). Existem dados sobre seu crescimento que mostram que estes animais podem atingir 35cm e migram para águas mais salinas com cerca de 1 ano de idade, morrendo com aproximadamente 4 anos de idade, após o segundo ano de reprodução (MENEZES & FIGUEIREDO, 1980). Ocorre desde as Antilhas e América Central (Costa Rica), até o sul da Argentina e é uma espécie com bom valor de mercado no litoral sudeste brasileiro, pois constitui uma parcela bastante significativa do pescado desembarcado nos portos de toda a região (MENEZES & FIGUEIREDO, 1980; CARVALHO-FILHO, 1994).

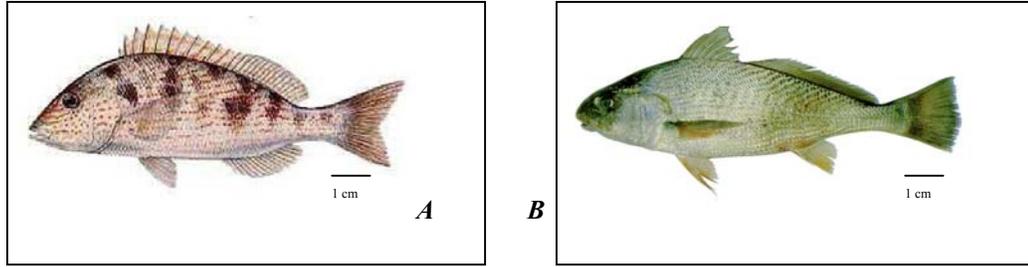


Figura 3: Aspecto externo das espécies estudadas. **A)** *Orthopristis ruber* (Família: HAEMULIDAE);
B) *Micropogonias furnieri* (Família: SCIAENIDAE). Fonte: www.fishbase.org

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar alguns *biomarcadores* bioquímicos recomendados pelo ICES e MED-POL em fígado de peixes coletados no litoral sudeste brasileiro dentro do Programa Brasileiro de Monitoramento do Ambiente Marinho (MOMAM). Desta forma, estabelecer uma metodologia que possa ser utilizada durante todo o desenvolvimento deste programa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar a expressão da isoforma do citocromo P450 (CYP1A) em amostras de microsoma de fígado de peixes das espécies *Orthopristis ruber*, coletados na Baía da Guanabara e Arraial do Cabo e *Micropogonias furnieri*, coletados na Baía da Guanabara, Sepetiba, Angra dos Reis e São Sebastião;
- Analisar a atividade das enzimas GST, SOD, CAT, GPx e GR em amostras de sobrenadante de fígado de peixes das espécies *Orthopristis ruber*, coletados na Baía da Guanabara e Arraial do Cabo e *Micropogonias furnieri*, coletados na Baía da Guanabara, Sepetiba, Angra dos Reis e São Sebastião.

Biomarcadores Bioquímicos em corcoroca (*Orthopristis ruber*) (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae) coletadas na costa do Rio de Janeiro, Brasil

Eliana C. Ventura^a, Maria R. F. Marques^a, Luiz R. Gaelzer^b, Afonso C. D. Bairy^{a*}

^aLaboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Depto. Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, SC, Brazil

^bInstituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, Ministério da Marinha, Arraial do Cabo, 28930-000, RJ, Brasil

***Autor para correspondência: Afonso C. D. Bairy, Depto. Bioquímica, CCB, UFSC, Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil Fax: 55-48-3319672 e-mail: bairy@mbox1.ufsc.br FAX + 55 48 331 9672**

ABSTRACT

*The initial sampling in Marine Monitoring Program (MOMAM), coordinated by the Ministry of Marine Affairs (IEAPM), was performed along the coast of Rio de Janeiro State in Brazil. Along the Brazilian coastal zone, there have been several reports of contamination, particularly in the southeast region, where high population density and industrial activity exist. In this work, the expression of cytochrome P450 (CYP1A), as well as the activity of glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), were analyzed in liver of *Orthopristis ruber* caught at Guanabara Bay (GB) and Arraial do Cabo (AC) on 1999, 2000, 2001 and 2002. Liver samples were homogenized and centrifuged in order to obtain the microsomal and cytosolic fractions. In the former, the expression of CYP1A was analyzed using immunoblot method, while in the last the enzyme activity was measured by conventional spectrophotometric techniques. Fish sampled at BG showed higher CYP1A expression than in AC on 2000, suggesting that these organisms were exposed to higher levels of Ah receptor agonists in this year at BG. In both periods of collection, fish from AC showed higher GST activity, compared to the organisms sampled at BG, which implies that the former had better detoxification response. In general, fish caught at AC also showed higher activity of antioxidant enzymes evidencing a more efficient antioxidant defense capacity against oxyradicals formation, corroborating that the fish from AC were facing better environmental quality than BG.*

*Key words: *Orthopristis ruber*; Biomarkers; Antioxidant enzymes; CYP1A; Catalase; Glutathione S-transferase; Brazil.*

RESUMO

*A amostragem inicial dentro do Programa de Monitoramento Marinho (MOMAM), coordenado pelo Ministério da Marinha (IEAPM), foi feita na costa do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Ao longo da zona costeira do Brasil, existem vários relatos de contaminação, particularmente na região sudeste, onde existe uma alta concentração populacional e industrial. Neste trabalho, a expressão da proteína citocromo P450 (CYP1A), bem como a atividade das enzimas glutatona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) and glutatona redutase (GR), foram analisadas no fígado de *Orthopristis ruber* coletados na Baía da Guanabara (BG) e Arraial do Cabo (AC) nos anos de 1999, 2000, 2001 e 2002. As amostras de fígado foram homogeneizadas e centrifugadas para a obtenção das frações microsomal e citosólica. Na primeira foi analisada a expressão de CYP1A através do método de dot-blotting e na segunda, foi dosada a atividade das enzimas através de técnicas espectrofotométricas convencionais. Os peixes coletados na BG apresentaram uma expressão mais elevada da CYP1A em comparação aos coletados em AC no ano de 2000, sugerindo uma maior concentração de compostos agonistas do receptor Ah neste ano, na BG. Os animais coletados em AC nos dois anos tiveram uma atividade da GST mais elevada, apresentando uma melhor resposta do sistema de detoxificação de xenobióticos. Os peixes coletados em AC também apresentaram uma maior atividade das enzimas antioxidantes evidenciando uma melhor capacidade de defesa contra espécies reativas de oxigênio, o que corrobora o fato de que estes animais se encontravam em uma região com uma melhor qualidade ambiental do que BG.*

Palavras-chave: *Orthopristis ruber*; Biomarcadores; Enzimas antioxidantes; CYP1A; Catalase; Glutaciona S-transferase; Brasil.

1 – Introdução

Nos últimos anos, os níveis de contaminantes nos ecossistemas costeiros marinhos em todo o mundo têm aumentado drasticamente como consequência de atividades antropogênicas. O comprometimento da qualidade das águas e dos sedimentos pode acarretar uma diminuição dos recursos naturais (Cajaraville et al., 2000). Muitos xenobióticos são lançados direta, ou indiretamente ao ambiente, em quantidades que podem afetar processos vitais, ameaçando a qualidade deste ambiente. Tais contaminantes podem ser detectados associados aos sedimentos, dissolvidos na água e acumulados em vários organismos, incluindo animais marinhos consumidos pelo homem (Hahn, 2001). Tanto organismos como populações inteiras podem responder aos estressores ambientais através da alteração de diversos parâmetros em diferentes níveis de organização (comportamental, fisiológica, bioquímica, molecular, entre outras) (López-Barea & Pueyo, 1998; Cousinou et al., 2000). Tais parâmetros, denominados *Biomarcadores*, podem ser definidos como alterações na resposta biológica do organismo, às quais expressam a exposição e/ou os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente (Walker et al., 1996), podendo assim, serem utilizados para avaliar o “status” de saúde dos organismos expostos, proporcionando uma resposta precoce de um possível risco ambiental (Van der Oost et al., 1996).

Considerando que estudos que utilizam apenas análises químicas não fornecem dados sobre as consequências toxicológicas dos contaminantes na biota (Fent, 2003), o uso de biomarcadores têm sido extensivamente utilizado em ecossistemas aquáticos na América do Norte e na Europa (Burgeot et al., 1996). Entretanto, estudos de respostas biológicas induzidas por poluentes nas águas da costa brasileira são muito escassos, apesar de terem sido relatados vários casos de contaminação por metais pesados e compostos orgânicos, tais como bifenilas policloradas (BPCs), pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos (HPAs) (Rezende & Lacerda, 1986; Karez et al., 1994; Kehig et al., 1998; Zanardi et al., 1999; Avelar et al., 2000; Baptista Neto et al., 2000; Lacerda et al., 2000; Amado Filho et al., 2001; Gabardo et al., 2001; Kehrig et al., 2002; Lima Júnior et al., 2002; Machado et al., 2002 a,b; Menicomi et al., 2002; Silva et al., 2003; Yogui et al., 2003).

A indução das enzimas de fase I (monooxigenases) e II (conjugação) da biotransformação de xenobióticos, juntamente com as enzimas de defesa antioxidantes têm sido sugeridas como sensíveis biomarcadores de contaminação aquática por muitos autores (Roy et al., 1995; Otto et al., 1996; Van der Oost et al., 2003).

Citocromo P540 é uma família de hemoproteínas que catalisam reações de fase I do metabolismo de xenobióticos. A isoforma mais estudada de CYP em peixes pertence à subfamília CYP1A (Buhler & Wang-Buhler, 1998; Snyder, 2000; Miller et al., 2003). A CYP1A é amplamente utilizada como biomarcador de contaminação aquática, pois sua síntese é induzida por exposição a compostos altamente tóxicos, tais como BPCs planares, HPAs (Stegeman et al., 1987; Livingstone et al., 1993; Monosson & Stegeman, 1994), 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofuran (TCDF) (Bucheli & Fent, 1995).

Entre as enzimas de fase II de biotransformação está a glutathione *S*-transferase (GST), uma família multigênica de proteínas responsável pela conjugação do tripeptídeo glutathione (GSH) ao centro eletrofílico de uma ampla variedade de compostos xenobióticos (Bainy et al., 2000), bem como aos intermediários reativos produzidos durante o estresse oxidativo (Solé et al., 1996; Henson et al., 2000). Estes são produzidos quando os sistemas de defesa antioxidantes atuam de maneira ineficiente. Neste sistema participa a enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (McCord & Fridovich, 1969). Este, por sua vez é decomposto até oxigênio molecular (O_2) e H_2O , pela catalase (CAT) (Aebi, 1984), ou até H_2O pela glutathione peroxidase (GPx),

envolvendo a oxidação concomitante da glutathiona reduzida (GSH) produzindo glutathiona oxidada (GSSG). A glutathiona redutase (GR) é responsável pela redução de GSSG em GSH em uma reação dependente de NADPH mantendo níveis adequados na proporção GSH/GSSG (Otto & Moon, 1996). Diferentes espécies de peixes podem apresentar grandes variações na atividade das enzimas antioxidantes e assim, a maior ou menor susceptibilidade ao estresse oxidativo (Hasspieler et al., 1994).

Em 1997, um programa de monitoramento marinho foi estabelecido no sudeste da costa do Brasil (Projeto MOMAM: Monitoramento do Ambiente Marinho) coordenado pelo Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM - Ministério da Marinha). Neste projeto, amostras de peixes foram coletados em 1999, 2000, 2001 e 2002 na Baía da Guanabara (BG) e em Arraial do Cabo (AC) para análises bioquímicas (Figura 1). A BG, localizada entre as latitudes 22°40' - 23°00'S e longitudes 43°00' - 43°18'W no centro da região metropolitana do Rio de Janeiro, constitui-se em um dos mais importantes estuários do sudeste da costa brasileira, ocupando uma área total de 346 Km², incluindo 59 Km² de ilhas (Feema, 1998). Ao longo de toda a baía existem vários focos de impacto ambiental, principalmente causados por óleo proveniente dos terminais e refinarias de petróleo, complexos químicos e metal-mecânica, dos estaleiros navais, portos comerciais, além de grande aporte de matéria orgânica oriunda de esgotos domésticos e industriais não tratados (Costa et al., 2000; Xavier de Brito et al., 2002). AC, localizada ao norte da costa do estado do Rio de Janeiro, é uma região com grande vocação para o ecoturismo que vem sofrendo grande especulação imobiliária e ocupação indiscriminada, o que tem gerado grandes problemas sanitários nos últimos anos. Esta região possui plantações de bananas, uma fábrica de soda cáustica e carbonato e é a área de maior ressurgência da costa brasileira (Taniguchi, 2001).

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão da proteína CYP1A e a atividade de enzimas antioxidantes e de conjugação no fígado de corcoroca (*Orthopristis ruber*) coletados na BG e em AC.

2 - Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram da marca Sigma-Aldrich. Para a detecção da proteína CYP1A foi utilizado o anticorpo monoclonal 1-12-3 anti-*scup* (P450E) doado gentilmente pelo Dr. J. J. Stegeman, Wood Hole Oceanographic Institution. O anticorpo secundário utilizado foi o de cabra contra imunoglobulina (IgG) de camundongo conjugada a peroxidase da marca Amersham Pharmacia Biotech. Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) e filmes autoradiográficos Kodak X-OMAT foram utilizados para visualização das proteínas.

2.2 Material Biológico

Machos e fêmeas de corcoroca (*O. ruber*), identificados pelo M. Sc. Luiz Ricardo Gaelzer (IEAPM), segundo Figueiredo & Menezes (1978, 1980, 2000), Fischer (1978), Menezes & Figueiredo (1980, 1985) e Cervigón et al. (1993) foram coletados nos anos de 1999, 2000, 2001 e 2002 à bordo do Av. Pq. Oc. Diadorim do IEAPM. Os peixes foram coletados através de arrasto de fundo com rede de portas ('otter-trawl') com 10 metros de comprimento por 10 metros de abertura de boca, com malha de 20 milímetros, durante 20 minutos, em locais da BG e AC, no Estado do Rio de Janeiro (Figura 1). Os peixes foram separados e mantidos vivos em uma caixa de isopor com capacidade para 100 litros, contendo água do mar, até a decapitação, que ocorreu o mais rápido possível. De cada animal coletado foram registrados os parâmetros biológicos: comprimento (cm), com um ictiômetro, peso (g), com uma balança eletrônica, sexo e estágio de maturação gonadal, analisados macroscopicamente. Após a decapitação dos peixes, o fígado foi removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido (-185°C). Em laboratório, os tecidos foram estocados a temperatura de -85°C.

Em cada ponto de coleta, amostras de água também foram coletadas com garrafa de

Nansen com termômetro de inversão e garrafa de van Dorn, com o intuito de verificar, na superfície e fundo, as seguintes variáveis: temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido.

2.3 Preparação das Amostras

As amostras foram descongeladas sobre gelo, pesadas e homogeneizadas em quatro vezes o volume de tampão de homogeneização Tris-HCl 50 mM, KCl 0,15 M, pH 7,4 contendo PMSF 0,1 mM, utilizando homogeneizador Tissue tearor (Biospec Prod. INC.). O homogeneizado foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado a 9,000 xg por 21 minutos a 4°C. A fração sobrenadante foi submetida a uma centrifugação de 38,900 xg por 70 minutos a 4°C, para obtenção das frações citosólica (análises enzimáticas) e microsomal (expressão da CYP1A). Aliquotas da fração citosólica foram separadas e o pellet microsomal foi ressuspenso em 200 µL de tampão de microsoma contendo Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 0,1 M, 20% glicerol, pH 7,6 e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Este procedimento foi realizado a 4°C.

2.4 Análises Bioquímicas

2.4.1 “Dot-Blot”

As análises de “Dot-blot” foram realizadas de acordo com McDougal et al. (1983). Amostras de 15 µg da fração microsomal foram solubilizadas em tampão de microsoma (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 0,1 M, 20% glicerol, pH 7,6) e cada amostra foi então aplicada diretamente sobre uma membrana de nitrocelulose utilizando-se um sistema de vácuo contínuo. As ligações não específicas na membrana foram bloqueadas durante a noite a 4°C em solução de bloqueio (5% leite em pó desnatado diluído em uma solução contendo 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,5 e 0,05 % Tween-20). Após o bloqueio as membranas foram lavadas e tratadas durante 90 minutos com anticorpo monoclonal 1-12-3 contra CYP1A(1) de *scup* (P450E) diluído 100 µg/ml em solução de bloqueio (Park et al., 1986). Após nova

lavagem, as membranas foram incubadas por 90 minutos com anticorpo secundário de cabra contra imunoglobulina (IgG) de camundongo conjugada a peroxidase diluído 1:1000 em solução de bloqueio. Cada um das bandas de CYP1A reconhecidas foram detectadas com a utilização de reagentes para detecção de “western blotting”, contidos no kit ECL, seguido pela visualização por Quimioluminescência em filmes autoradiográficos. Após a detecção e visualização, as imagens dos filmes foram digitalizadas e a intensidade das bandas foi determinada através de densitometria de vídeo-imagem utilizando-se o software SCION Image, e a quantidade de proteínas imunoreativas foram expressas em termos relativos de unidades de densidade óptica.

2.4.2 Glutathione S-Transferase (GST) (E.C.:2.5.1.18)

A atividade da GST foi determinada na fração citosólica pelo método de Keen et al. (1976) que se baseia na substituição do cloro da molécula de 1-cloro-2,-dinitrobenzeno (CDNB) pelo ânion tiol da glutathione através de uma reação de substituição nucleofílica que é monitorada a 340 nm durante 2 minutos. A amostra (10 µL - 10%), foi adicionada ao meio de reação contendo 0,1 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, 100 mM de glutathione reduzida (GSH), 100 mM de CDNB em um volume final de 1 ml. A atividade enzimática foi expressa em U/min/mg de proteína, onde uma unidade da enzima corresponde a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de produto por minuto por miligrama de proteína. Para o cálculo da atividade utilizou-se um coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4.3 Superóxido Dismutase (SOD) (E.C.: 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente nas frações citosólicas de fígado, através da inibição da redução do citocromo c pelo radical ânion superóxido (O_2^-) produzido pelo sistema xantina/xantina oxidase, medindo-se o aumento de absorbância em 550 nm a

25°C, como descrito por McCord & Fridovich (1969). A adição da SOD promove uma inibição na velocidade de redução do citocromo *c*, uma vez que esta compete com o citocromo pelo O_2^- , dismutando-o a H_2O_2 . O meio de reação continha 10 μ M citocromo *c*, 50 μ M xantina, 0,1 mM EDTA, 20 μ M KCN e 50 mM tampão fosfato de potássio, pH 7,8. Uma unidade (U) de SOD foi definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da redução do citocromo *c*, por minuto, em pH 7,8 a 25°C e os resultados foram expressos como U/min/mg proteína.

2.4.4 Catalase (CAT) (E.C.:1.11.1.6)

A atividade da CAT foi analisada na fração citosólica de acordo com o método descrito por Beutler (1975), o qual mede o decréscimo de absorvância a 240 nm associado a velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O meio de reação consistiu de uma mistura de 10 mM H_2O_2 , 0,5 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) e 10 μ L (10%) de amostra em um volume final de 1 ml. Todas as análises foram realizadas em duplicatas e o decréscimo de absorvância medido a 240 nm, foi registrado durante 1 minuto. A atividade da catalase foi expressa em unidades (U) por mg de proteína. Uma unidade de CAT corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ M H_2O_2 por minuto, a 25°C, em pH 8,0. Para o cálculo da atividade enzimática utilizou-se um coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a 0,04 mM⁻¹.cm⁻¹.

2.4.5 Glutathione Peroxidase (GPX) (E.C.: 1.11.1.9)

A atividade da GPx foi analisada na fração citosólica de acordo com o método descrito por Sies et al. (1979), que quantifica o decréscimo de absorvância durante a redução da glutathione oxidada (GSSG) pela glutathione redutase (GR) na presença do NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional a velocidade de produção de GSSG a partir de glutathione reduzida (GSH), na presença de peróxido catalisada pela GPx. O meio de reação consistiu de

uma mistura de 0,1 M de tampão fosfato de potássio pH 7,0, 0,5 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 0,1 U/mL GR e 1 mM de glutatona reduzida. A oxidação do NADPH foi registrada espectofotometricamente a 340 nm a uma temperatura de 25°C. A atividade enzimática específica da GPx foi calculada em nmol de NADPH oxidado por minuto e expressa em U/min/mg de proteína, utilizando-se um coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

2.4.6 Glutathione Redutase (GR) (E.C.:1.6.4.2)

A atividade da GR foi analisada na fração citosólica de acordo com Sies et al. (1979). O meio de reação continha 0,1 M de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, 0,5 mM EDTA, 1 mM glutatona oxidada (GSSG), 0,2 mM NADPH e quantidades variáveis de amostras. Os ensaios foram feitos em duplicatas e a atividade enzimática da GR foi quantificada a 25°C através da oxidação de NADPH registrada em um comprimento de onda de 340 nm. A atividade específica da enzima foi calculada em nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína e expressa em unidade (U) de GR por mg de proteína, onde uma unidade de GR foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de oxidar 1nmol de NADPH por minuto, em pH 7,0 a 25°C. Para o cálculo da atividade da GR foi utilizado um coeficiente de extinção molar (ϵ) de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

2.5 Determinação da Concentração de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais presentes tanto na fração citosólica quanto na fração microsomal foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) modificado por Peterson (1977), utilizando-se o reagente de Folin e soro albumina bovina (BSA) como padrão.

2.6 Análise Estatística

A normalidade dos dados bioquímicos obtidos foi analisada estatisticamente através do teste Análise de Variância (ANOVA). Diferenças significantes entre as médias, com p variável, foram determinadas utilizando-se o teste complementar de Tukey HSD para tamanhos amostrais diferentes. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statistica for Windows[®] 5.1. Todos os valores estão mostrados como média \pm desvio padrão (tamanho amostral, n).

3 – Resultados

3.1 Dados Físicos e Químicos

Os dados físicos e químicos podem ser observados na Tabela 1. A temperatura da água na superfície nos diferentes pontos de coleta da BG e AC variou de 19°C a 25,5°C e no fundo de 17,7°C a 23,2°C, nos anos de 1999, 2000 e 2001. Os maiores valores de salinidade e oxigênio dissolvido foram encontrados nas amostras de água de AC na coleta de 2000, sendo respectivamente 35,97‰ na superfície, 36,17‰ no fundo e 6,31 ml/l na superfície, 5,27 ml/l no fundo. Por outro lado, os menores valores de salinidade foram encontrados na coleta realizada na BG em 2000 (31,09‰ na superfície e 33,99‰ no fundo) e com relação ao oxigênio dissolvido, no mesmo local, na coleta feita no ano de 2002.

3.2 Dados Biológicos

O comprimento total ($25,25 \pm 3,7$ cm; n= 13) e o peso total ($238,61 \pm 70,78$ g; n= 13) dos peixes coletados na BG na coleta de 2001 foram maiores que dos peixes coletados nos outros anos de coleta neste mesmo local (Tabela 1). Em AC, não se observou nenhuma variação no comprimento, nem no peso dos animais coletados em 2000 e em 2002. No entanto, estes obtiveram valores menores que os da BG, coletados nos mesmos anos (Tabela 1). O estágio de maturação gonadal variou bastante entre os indivíduos, sendo que na BG a maioria dos animais encontrava-se no estágio intermediário (B) e em AC no estágio inicial (A) (Tabela 1).

3.3 Expressão da CYP1A

Bandas imunoreativas da proteína CYP1A foram detectadas nas amostras de microsoma de fígado de peixes coletados nos dois locais, nos diferentes anos de coleta. Contudo, a expressão desta proteína nos peixes coletados na BG na coleta feita no ano de 2000 (Figura 2A), foi significativamente maior apenas, em comparação aos peixes coletados em AC neste mesmo

ano. Nenhuma alteração significativa dos níveis de CYP1A foram observadas nos animais coletados na BG nos diferentes anos.

3.4 Análises Enzimáticas

Nenhuma diferença estatística foi observada na atividade da enzima GST nos peixes coletados nos diferentes anos, respectivamente em cada local de coleta. No entanto, os peixes coletados em AC apresentaram uma atividade maior da GST em relação aos animais da BG em 2000 e 2002 (Figura 2B).

A atividade da SOD apresentou um padrão de resposta semelhante ao obtido pela enzima GR, onde os peixes coletados no ano de 2000 em AC foram os que apresentaram a atividade mais elevada. Tal atividade foi significativamente maior que a dos peixes coletados no ano de 2002 em AC, bem como dos peixes coletados no mesmo ano na BG (Figura 2C). Comparando-se as coletas realizadas nos diferentes anos dentro da BG, a atividade da SOD foi maior nos peixes coletados no ano de 2001.

Os peixes coletados em AC em 2000 e 2002 apresentaram uma alta atividade da CAT, no entanto nenhuma diferença neste parâmetro foi observada entre os dois períodos amostrais. Os peixes coletados na BG em 2000 apresentaram uma atividade da CAT estatisticamente menor que os peixes coletados em 2002, bem como dos peixes coletados em AC no mesmo período (Figura 2D). Os peixes coletados em AC em 2002, apresentaram uma atividade da GPx hepática significativamente maior que os peixes coletados em 2000 neste local, assim como dos peixes coletados na BG neste mesmo ano (Figura 2E). Nenhuma diferença na atividade desta enzima foi observada no fígado dos peixes coletados na BG nos diferentes períodos amostrais. A enzima GR apresentou um padrão de resposta diferente da GPx. A atividade da GR nos peixes coletados em AC em 2000 foi maior que a dos coletados em 2002 neste mesmo local, e dos peixes coletados neste mesmo ano na BG (Figura 2F). Na BG, as amostras

de 2001 foram as que apresentaram a maior atividade da GR, sendo que essa diferença apenas não foi maior que daqueles coletados no ano de 2002.

4 – Discussão

Preocupados com a degradação ambiental e com o significado da contaminação que vem ocorrendo nos ecossistemas costeiros ao redor do mundo, alguns programas de monitoramento, realizados em diversos países, como por exemplo, nos Estados Unidos, Canadá, Suécia e Espanha, passaram a incorporar análises de biomarcadores bioquímicos e moleculares em organismos marinhos (Stegeman & Lech, 1991; Stegeman et al., 1992; Burgeot et al., 1996). O uso desta ferramenta possibilita uma quantificação do real impacto dos contaminantes sobre os organismos expostos (McCarthy & Shugart, 1990), permitindo seu controle precoce, antes da ocorrência de danos irreversíveis (De Caprio, 1997). Assim, programas de biomonitoramento que se baseiam no uso de biomarcadores permitem avaliar a interação entre os contaminantes tóxicos e o organismo biológico.

No presente trabalho biomarcadores de contaminação aquática foram analisados em fígado de peixes da espécie *Orthopristis ruber*, coletados na BG durante quatro anos consecutivos (1999, 2000, 2001 e 2002) e em AC em dois anos intercalados (2000 e 2002).

Os exemplares coletados na BG no ano de 2000 apresentaram uma expressão mais elevada da proteína CYP1A e uma menor atividade da GST em comparação aos coletados em AC no mesmo ano. Possivelmente estes organismos foram expostos a concentrações maiores de compostos agonistas do receptor Ah (BPCs, HPA, dioxinas entre outros), que os demais. De acordo com Gabardo et al. (2001), em Janeiro de 2000 ocorreu um grave acidente envolvendo um dos terminais de petróleo da PETROBRAS na refinaria de Duque de Caxias, na BG, onde aproximadamente 340.000 galões (aproximadamente 1.300 m³) de óleo cru vazaram nas águas da baía. Segundo Menicomi et al. (2001) e Menicomi et al. (2002), os níveis de HPAs aumentaram drasticamente após este acidente. Tal aumento na concentração destes compostos pode ter ocasionado uma indução um pouco mais elevada na expressão da

proteína CYP1A nos animais coletados neste ano, em comparação aos coletados nos demais anos neste local. Outros autores também têm observado níveis elevados de compostos deste tipo em estudos realizados nesta baía. Tanigushi (2001), em amostras de sedimento detectou níveis de HPAs totais e seus congêneres a uma concentração de $4.155,82 \text{ ng.g}^{-1}$ de peso seco e de BPCs a uma concentração de $185,7 \text{ ng.g}^{-1}$. Em um estudo recente, Silva et al. (2003) encontraram níveis de BPCs variando de 31,2 a 115,8 ng/g de peso úmido em amostras de músculo de *Micropogonias furnieri* e *Centropomus parallelus*. Silva et al. (2001) encontraram níveis de BPCs entre 2,62 a 8,99 $\mu\text{g/g}$ de peso úmido em amostras de tecido adiposo de cetáceos da BG.

O aumento observado da CYP1A poderia provocar uma maior taxa de formação de metabólitos radicais nos animais da BG, que justamente foram aqueles que apresentaram uma menor atividade da GST, indicando uma menor capacidade de conjugação destes metabólitos. Assim, os animais da BG estariam enfrentando uma situação de desequilíbrio no sistema de biotransformação dos xenobióticos o que aumentaria a possibilidade de danos à célula. Por outro lado, os animais de AC estariam em uma melhor condição de defesa, uma vez que a atividade da enzima de conjugação GST estava maior, em relação aos níveis de CYP1A, comparativamente aos animais da BG.

Uma atividade menor da GST também foi observada nos animais da BG coletados no ano de 2002 comparando-se com aqueles de AC, no entanto, neste caso não foi observado um aumento dos níveis da proteína CYP1A hepática.

Cabe ressaltar, que o tamanho médio dos animais coletados na BG foram maiores que aqueles oriundos de AC, nos dois períodos e, que em 2000, a grande maioria dos animais eram machos em estágio de maturação intermediário, enquanto que os de AC eram em sua maioria fêmeas imaturas (Tabela 1). Desta forma, não se pode descartar a possibilidade de que estes parâmetros biológicos tenham influenciado as respostas bioquímicas observadas. No

entanto em estudo paralelo realizado com a espécie *Micropogonias furnieri*, tal influência não foi observada (Ventura et al., submetido).

O fato dos animais da BG em 2000 terem apresentado uma expressão da CYP1A mais elevada, não significa que os demais não foram expostos a contaminantes deste tipo, uma vez que níveis desta proteína também foram detectados nos animais coletados nos outros anos em AC e na própria BG. Ventura et al. (2002), observaram que peixes da espécie *O. ruber* coletados na BG apresentaram os maiores níveis da proteína CYP1A hepática quando comparados aos coletados em outras baías do estado do Rio de Janeiro. Da mesma forma, Parente et al. (2004) observaram em tilápias coletadas na foz do Rio Guandu que deságua na BG, uma atividade elevada de EROD (atividade específica da CYP1A) em comparação a peixes de um local referência.

Muitos dos poluentes ambientais são capazes de induzir o estresse oxidativo em peixes (DiGiulio et al., 1989). Esse estresse resulta no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio produzidas durante a biotransformação de xenobióticos. A análise de parâmetros pró e antioxidantes pode fornecer informações complementares na avaliação e monitoramento da qualidade ambiental (Livingstone, 1993). No presente estudo, de modo geral, os animais coletados em AC apresentaram uma maior capacidade de defesa antioxidante que os animais da BG. A atividade da SOD estava elevada no fígado dos animais coletados em AC no ano de 2000, em comparação aos coletados no mesmo ano na BG, e neste mesmo local, no ano de 2002. Os animais coletados na BG em 2001 também apresentaram uma maior atividade em comparação aos coletados nos demais anos. A etiologia desta atividade maior não está clara, no entanto, possivelmente está associada a um aumento na produção do radical ânion superóxido (O_2^-) (Wanders & Denis, 1992). Também não fica claro se a idade, o sexo e o estágio de maturação gonadal interferem nestas respostas, uma vez que os animais coletados em BG em 2001 apresentaram o maior tamanho médio e uma prevalência de animais no

estágio bem maduro. Por outro lado, o outro grupo que também apresentou uma maior atividade da SOD (AC/ 2000) apresentou animais com comprimentos menor e uma prevalência de fêmeas no estágio imaturo.

A atividade da CAT foi maior nos animais de AC do que na BG em 2000. Segundo Mather-Mihaich & DiGiulio (1991), o aumento da atividade da CAT em peixes pode estar relacionado à proliferação peroxisomal como um mecanismo de defesa contra a produção de oxirradicais gerados pela biotransformação destes compostos. O aumento da atividade da CAT em fígado de peixes que estejam sofrendo algum tipo de estresse ambiental é relatado em vários trabalhos (Livingstone et al., 1993; Peters et al., 1994; Burgeot et al., 1996; Stephensen et al., 2000), enquanto a sua diminuição tem sido proposta como uma resposta transitória frente a uma poluição aguda (Regoli & Principato., 1995). Taniguchi (2001) verificou níveis de HPAs (44,98 – 115,87 ng.g⁻¹ de peso seco) e BPCs (47,7 – 141,7 ng. g⁻¹ de peso seco) em tecidos de mexilhões coletados em AC, que corresponderam, segundo a autora, a um nível de poluição médio. Apesar de AC estar localizado em uma região menos impactada que a BG, AC é um município voltado para o turismo, onde existem vários barcos de pesca e de passeio, que podem causar um aumento no aporte de hidrocarbonetos e outros contaminantes. A região sofre uma influência dos esgotos urbanos e da circulação de pequenas embarcações voltadas para a pesca e para o turismo. É uma região sujeita ao fenômeno de ressurgência, onde ocorre a ascensão da massa d'água profunda ressuspendendo os sedimentos finos já depositados em áreas mais profundas. É possível que a atividade catalásica elevada nos peixes provenientes de AC possa estar relacionada a uma maior exposição destes peixes a compostos proliferadores de peroxisoma, que poderiam estar presentes nos sedimentos desta região.

O padrão de resposta da GR seguiu o padrão apresentado pela SOD, sendo os animais coletados em AC no ano de 2000, aqueles que tiveram a maior atividade desta enzima. Uma baixa atividade da GR, enzima auxiliar que da suporte a GPx (Reed, 1993), favorece um

status oxidativo nos animais coletados na BG em 1999 e 2000. O aumento da atividade da GPx hepática nos animais de AC no ano de 2002, pode estar indicando um mecanismo compensatório para, assim como a CAT, evitar a elevação dos níveis de H₂O₂, uma vez que essa enzima, também desempenha a função de reduzir este composto a água, utilizando GSH como doador de elétrons.

Os dados apresentados mostraram algumas variações na expressão e/ou atividade de biomarcadores bioquímicos em peixes coletados no litoral do Rio de Janeiro, que possivelmente estavam associadas a um maior ou menor grau de exposição a contaminantes no ambiente. Propomos que estudos futuros incluam a análise destes parâmetros aliadas a determinação quali-quantitativa dos principais compostos tóxicos nestes animais.

Referências Bibliográficas

- Aebi, H., 1984. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis. London: Academic Press. v. 105, pp. 121-126.
- Amado Filho, G. M., Salgado, L. T., Rezende, C. E., Pfeiffer, W. C., 2001. Concentração de metais pesados em populações da macrófita marinha *Halodule wrightii* Aschers, provenientes da Baía de Todos os Santos – BA. In: Moraes, R. B. C., Crapez, M. A. C., Pfeiffer, W. C., Farina, M., Teixeira, V. L., Bainy, A. C. D. *Efeito dos Poluentes em Organismos Marinhos*. 1, pp. 285.
- Avelar, W. E. P., Mantelatto, F. L. M., Tomazelli, A. C., Silva, D. M. L., Shuhama, T., Lopes, L. C., 2000. The marine mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) as an indicator of contamination by heavy metals in the Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Water, Air and Soil Poll.* 118, 65-72.
- Bainy, A. C. D., Almeida, E. A., Muller, I. C., Ventura, E. C., Medeiros, I. D., 2000. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar. Environ. Res.* 0, 1-6.
- Baptista Neto, J. A., Smith, B. J., McAllister, J. J., 2000. Heavy metal concentration in surface sediments in a nearshore environment, Jurujuba Sound, Southeast Brazil. *Environ. Poll.* 109, 1-9.
- Beutler, E., 1975. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. Grune & Stratton, New York.
- Bucheli, T. D., Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25, 201-268.

- Buhler, D. R., Wang-Buhler, J., 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.* 121C, 107-137.
- Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimmet, J., Santella, R. M., Dimeet, J., Santella, R. M., Garcia de la Parra, L. M., Pftol-Leszkowicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 125-141.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environmental of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Tot. Environ.* 247, 295-311.
- Costa, M., Paiva, E., Moreira, I., 2000. Total mercury in *Perna perna* from Guanabara Bay – 10 years later. *Sci. Tot. Environ.* 261, 69-73.
- Cousinou, M., Nilsen, B., López-Barea, J., Dorato, G., 2000. New methods to use fish cytochrome 1A to assess marine organic pollutants. *Sci. Tot. Environ.* 247, 213-225.
- De Caprio, A. P., 1997. Biomarkers: coming age for environmental health and risk assessment. Critical review. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1837-1848.
- Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W., Jewell, C. S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.
- Feema., 1998. Qualidade das águas da Baía da Guanabara. Programa de despoluição da Baía da Guanabara – Programas Ambientais Complementares, Rio de Janeiro.
- Fent, K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. Lett.* 140-141, 353-365.

- Figueiredo, J. L., Menezes, N. A., 1978. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II Teleostei (1). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brasil, pp. 110.
- Figueiredo, J. L., Menezes, N. A., 1978. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II Teleostei (2). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brasil, pp. 110.
- Figueiredo, J. L., Menezes, N. A., 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II Teleostei (2). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brasil, pp. 90.
- Figueiredo, J. L., Menezes, N. A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI Teleostei (5). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brasil, pp. 116.
- Fischer, W., 1978. FAO species identification sheets for fishery proposes. Western Central Atlantic (Fishing Área 31). Roma, FAO, I-VII.
- Gabardo, I. T., Menicomi, F. G., Falcão, L. V., Carreira, R. S., 2001. Hydrocarbon and ecotoxicity in seawater and sediment samples of Guanabara Bay after the oil spill in January 2000. *International Oil Spill Conference*. March 26-29, 2001. Tampa, Flórida – EUA.
- Hahn, M. E., 2001. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *Sci. Tot. Environ.* v. 289, p. 49-69.
- Hasspieler, B. M., Behar, J. V., Carlson, D. B., Watson, D. E., DiGiulio, R. T., 1994. Susceptibility of channes catfish (*Ictalurus punctatus*) and brow bullhead (*Ameriurus nebulosus*) to oxidative stress: a comparative study. *Aquat. Toxicol.* 28 (1-2), 53-64.
- Henson, K. L., Sheehy, K. M., Gallangher. E. R., 2000. Conservation of a glutathione S-transferase in marine and freshwater fish. *Mar. Environ. Res.* 50,17-21.

- Kares, C. S., Magalhaes, V. F., Pfeiffer, W. C., 1994. Trace metal accumulation by algae in Sepetiba Bay, Brazil. *Environ. Pollut.* 83, 351-356.
- Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B., 1976. Mechanism for several activities of the Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- Kehrig, H. A., Malm, O., Moreira, I., 1998. Mercury in a widely consumed fish *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) from four main Brazilian estuaries. *Sci. Tot. Environ.* 213, 263-271.
- Kehrig, H. A., Costa, M., Moreira, I., Malm, O., 2002. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. *Mar. Poll. Bull.* 44, 1018-1023.
- Lacerda, L. D., Paraquetti, H. H. M., Marins, R. V., Rezende, C. E., Zalmon, I. R., Gomes, M. P., Farias, V., 2000. Mercury content in shark species from the south-eastern Brazilian coast. *Rev. Bras. Biol.* 60(4), 571-576.
- Lima Júnior, R. G. S., Araújo, F. G., Maia, M. F., Pinto, A. S. S. B., 2002. Evaluation of heavy metal in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Res. Section A.* 89, 171-179.
- Livingstone, D. R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environmental. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57, 195-211.
- Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L., Bucke, D., Law, R. J., 1993. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresoufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar. Poll. Bull.* 26(11), 602-606.
- López-Barea, J., Pueyo, C., 1998. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat. Res.* 399, 3-15.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 256.

- Machado, W., Moscatelli, M., Rezende, L. G., Lacerda, L. D., 2002a. Mercury, zinc, and copper accumulation in mangrove sediments surrounding a large landfill in southeast Brazil. *Environ. Poll.* 120, 455-461.
- Machado, W., Silva-Filho, E. V., Oliveira, R. R., Lacerda, L. D., 2002b. Trace metal retention in mangrove ecosystems on Guanabara Bay, SE Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 44, 1277-1280.
- Mather-Mihaich., Di Giulio, R. T., 1991. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached mill effluent. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 391-397.
- McCarthy, J. F., Shugart, L. R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J. F., Shugart, L. R., Editors. *Biom. of Environ. Cont.* Boca Raton, FL: Lewis Publishers, pp3-14. *apud* Cajaraville, M. P., Bebiani, M. J., Blasco, J., Porte, C., Saraquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environment of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Tot. Environ.* 247, 295-311.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Mc Dougal, J. S., Browning, S. W., Kennedy, S., Moore, D., 1983. Immunodot assay for the determining the isotype and light chain of murine monoclonal antibodies in unconcentrated hybridoma culture supernatants. *J. Immunol. Meth.* 63, 281-290.
- Menezes, N. A., Figueiredo, J. L., 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II Teleostei (3). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, pp. 96.
- Menezes, N. A., Figueiredo, J. L., 1985. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II Teleostei (4). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, pp. 105.
- Menicomi, M. F. G., Santos, A. F., Salmito, T. M. C., Romão, C. M., Moreira, I. M. N. S., Scofield, A. L., Azevedo, L. A. C., Machado, G. A. W. C., 2001. Fisheries safety

- monitoring in the Guanabara Bay, Brazil following a marine fuel oil spill. *International Oil Spill Conference*. March 26-29, Tampa, Florida – EUA.
- Menicomi, M. F. G., Gabardo, I. T., Carneiro, M. E. R., Barbanti, S. M., Silva, G. C., Massone, C. G., 2002. Brazilian oil spills chemical characterization – Case Studies. *Environ. Forensics*. 3, 303-321.
- Miller, K. A., Addison, R. F., Bandiera, S.M., 2003. Hepatic CYP1A levels and EROD activity in English sole: biomonitoring of marine contaminants in Vancouver Harbour. *Mar. Environ. Res.* 57, 37-54.
- Monosson, E., Stegeman, J.J., 1994. Induced cytochrome P4501A in Winter Flounder, *Pleuronectes americanus*, from offshore and coastal sites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 933-941.
- Otto, D. M. E., Buttner, J. K., Aequette, D. M., Moon, T. W., 1996. Impaired inducibility of xenobiotic and antioxidant responses in rainbow trout exposed to polychlorinated biphenyl contaminated sediments in the St. Lawrence river. *Chemosph.* 33, 2021-2032.
- Otto, D. M. E., Moon, T. W., 1996. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 141-147.
- Parente, T. E. M., De-Oliveira, A. C. A. X., Silva, I. B., Araujo, F. G., Paumgarten, F. J. R., 2004. Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosph.* 54, 1613-1618.
- Park, S. S., Miller, H., Klotz, A. V., Kloepper-Sams, P. J., Stegeman, J. J., Gelboin, H. V., 1986. Monoclonal antibodies to liver microsomal cytochrome P450E of marine fish *Stenotomus chrysops* (scup): Cross-reactivity with 3-methylcholanthrene induced rat cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 339-350.

- Peters, L. D., Porte, C., Albaigés, J., Livingstone, D. R., 1994. 7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidants enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the North coast of Spain. *Mar. Poll. Bull.* 28, 299-304.
- Peterson, G. L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Reed, D. J., 1986. Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 35, 7-13.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals in different field and laboratory conditions: implication for a proper use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143-164.
- Rezende, C. E., Lacerda, L. D., 1986. Metais pesados em mexilhões (*Perna perna*) no litoral do Estado do Rio de Janeiro. *Ver. Brasil. Biol.* 46(1), 239-247.
- Roy, S., Lindström-Seppä, P., Häänninen, O., 1995. Biotransformation and antioxidant enzymes in aquatic organisms as bioindicators of pollution. *Europ. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* Special Issue, 49-51.
- Sies, H., Koch, O. R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287-290.
- Silva, A. M. F., Lemes, V. R. R., Barretto, H. H. C., Oliveira, E. S., Alleluia, I. B., 2001. Contaminação por bifenilas policloradas (PCBs) em pequenos cetáceos da espécie *Sotalia fluviatilis* da Baía da Guanabara. In: Moraes, R. B. C., Crapez, M. A. C., Pfeiffer, W. C., Farina, M., Bainy, A. C. D., Teixeira, V. L., 2001. *Efeitos de poluentes e organismos marinhos*. Arte & Ciência. São Paulo, SP. Brasil, pp. 285.
- Silva, A. M. F., Lemes, V. R. R., Barreto, H. H. C., Oliveira, E. S., Alleluia, I. B., Paugmgarten, F. J. R., 2003. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in

- edible fish species and dolphins from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 1151-1157.
- Snyder, M. J., 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquat. Toxicol.* 48, 529-547.
- Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C. L., Chipman, J. K., Livingstone, D. R., Albaiges, J., 1996. Effects of the "Aegean Sea" oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 113(C), 257-265.
- Stegeman, J. J., Teng, F. Y., Snowberger, E., 1987. Induced cytochrome P450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 1270-127.
- Stegeman, J. J., Lech, J. J., 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspect.* 90, 101-109.
- Stegeman, J. J., Brower, M., Di Giulio, R. T., Förlin, L., Fowler, B. A., Sanders, B. M., Van Veld, P. A., 1992. Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P., Bergman, H .L. Eds. Lewis Publishers. Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., Förlin, L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbor on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48, 431-442.

- Taniguchi, S., 2001. Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do estado do Rio de Janeiro. 160f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências – Área de Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.
- Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N. P. E., 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat. Toxicol.* 36, 189-222.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* 13, 57-149.
- Ventura, E.C., Gaelzer, L.R., Zanette, J., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2002. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. *Mar. Environ. Res.* 54, 775-779.
- Ventura, E. C., Marques, M.R.F., Gaelzer, L.R., Bainy, A.C.D. Biomarcadores bioquímicos em corvina (*Micropogonias furnieri*) (Desmarest, 1823) coletadas no litoral Sudeste do Brasil. *Chemosph.* (submetido).
- Xavier de Brito, A. P., Brüning, I. M. R. A., Moreira, I., 2002. Chlorinated pesticide in mussels from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 44, 71-81.
- Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., Peakal, D. B., 1996. Principles of ecotoxicology. School of Animal and Microbial Science, University of Reading Taylor & Francis Ltd, London, pp. 321.
- Wanders, R. J. A., Denis, S., 1992. Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1115, 259-262.
- Yogui, G. T., Santos. M. C. O., Montone, R. C., 2003. Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananéia estuary, southeastern Brazil. *Sci. Tot. Environ.* 312, 67-78

Zanardi, E., Bicego, M. C., Miranda, L. B., Weber, R. R., 1999. Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 38, 261-267.

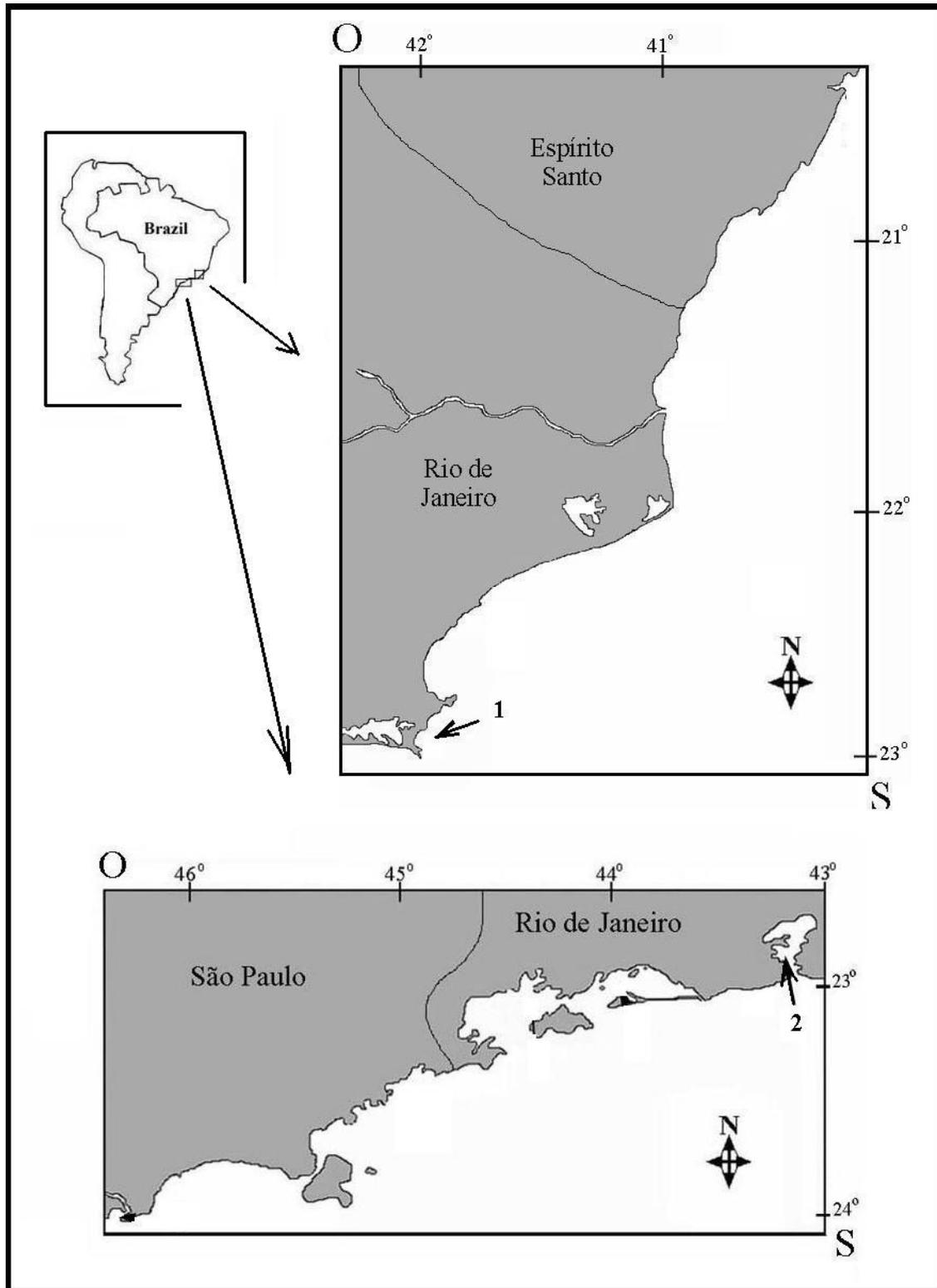


Figura 1. Mapa do Brasil e da parte Norte e Sul da costa Sudeste, mostrando os locais de coleta no Estado do Rio de Janeiro. 1 – Arraial do Cabo e 2 – Baía da Guanabara.

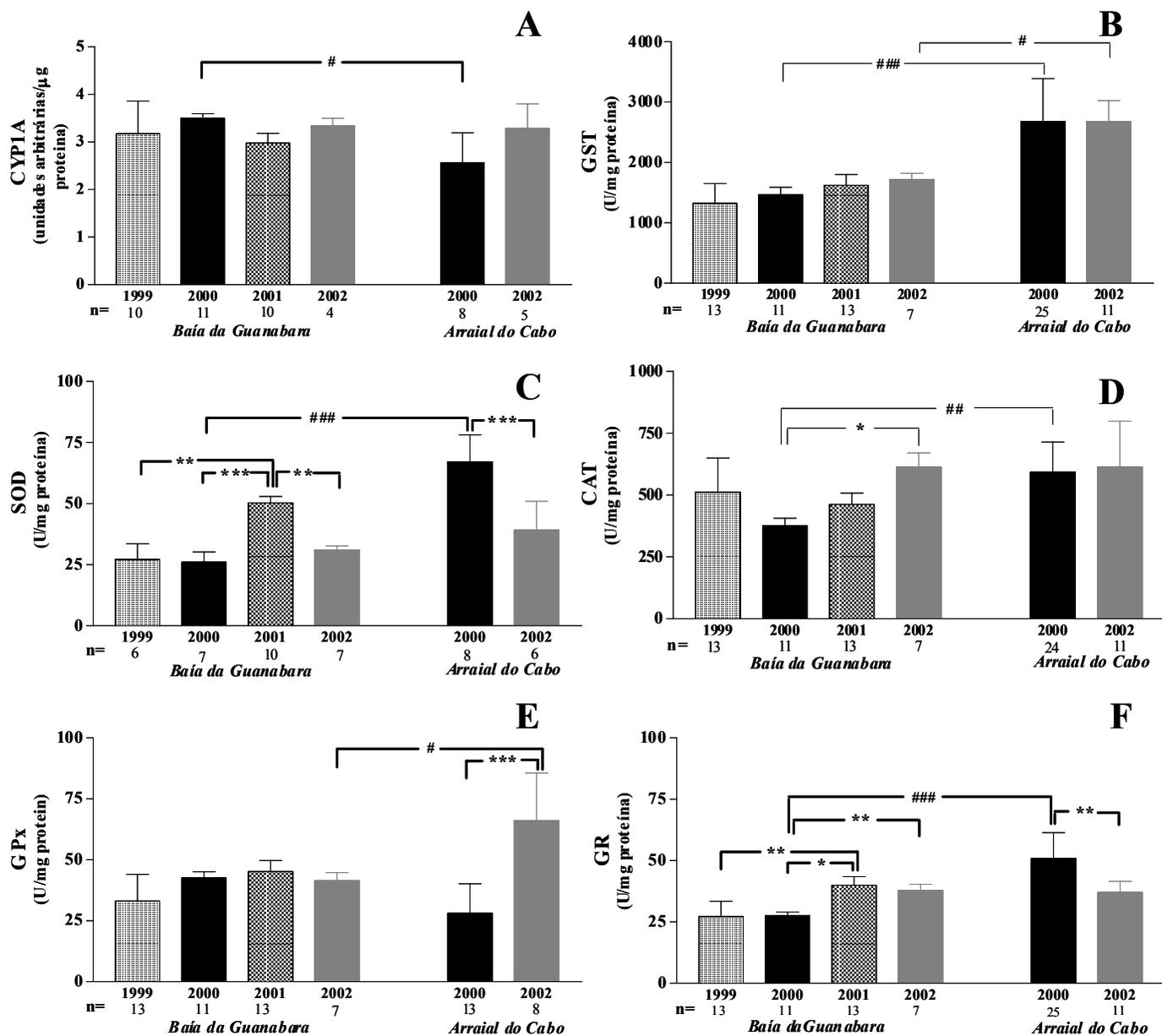


Figura 2. Análise da expressão da CYP1A (A), da atividade da glutiona *S*-transferase (B), superóxido dismutase (C), catalase (D), glutiona peroxidase (E) e glutiona redutase (F) nas amostras de fígado de *Orthopristis ruber* coletados na Baía da Guanabara e em Arraial do Cabo. “n” indica o número de amostras analisadas. *, ** e *** indicam diferenças entre os anos dentro de um mesmo local de coleta, com $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$ respectivamente. #, ## e ### indicam diferenças entre os diferentes locais no mesmo ano de coleta, com $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$ respectivamente.

Tabela 1
Parâmetros físicos e químicos da água nos locais de coleta e biológicos dos peixes amostrados.

<i>Locais*</i> (Mês/ano)	<i>Lat.</i>	<i>Long.</i>	<i>Temp. (°C)</i> (Sup ^{**} .-Fundo)	<i>Sal.</i> (Sup.-Fundo)	<i>O.D</i>	<i>Comprimento</i> (cm) ^{***}	<i>Peso</i> (g) ^{***}	<i>Sexo</i> [#] M - F	<i>Est. Mat</i> ^{##} A - B - C
BG 09/1999	22°55',260"S	043°09,412"W	22,1 – 21,9	33,88 – 33,55	4,98 – 5,26	18,27 ± 2,71 ^c	95,68 ± 30,42 ^b	6 - 7	4 - 3 - 6
BG 12/ 2000	22°55',141"S	043°09,513"W	25,5 – 23,2	31,09 – 33,99	4,51 – 4,82	23,54 ± 1,22 ^{b/A}	162,77 ± 26,88 ^c	10 - 1	0 - 11 - 0
BG 12/2001	22°55',191"S	043°09,611"W	19,0 – 17,7	34,13 – 34,75	4,50 – 4,80	25,25 ± 3,70 ^{a b}	238,61 ± 70,78 ^a	7 - 6	1 - 4 - 8
BG 03/2002	23°58',324"S	043°09,005"W	24,4 – 24,0	34,72 – 35,14	4,26 – 4,71	24,16 ± 3,11 ^{a b/A}	152,57 ± 66,48 ^{b c}	3 - 4	0 - 7 - 0
AC 08/2000	22°58',500"S	045°59,400"W	20,8 – 20,0	35,97 – 36,17	6,31 – 5,27	18,66 ± 3,60 ^B	101,97 ± 74,35	8 - 16	19 - 1 - 4
AC 05/2002	22°58',324"S	043°00,044"W	24,5 – 23,5	34,67 – 35,15	5,16 – 4,71	19,21 ± 2,79 ^B	107,00 ± 49,74	5 - 6	9 - 2 - 0

* BG= Baía da Guanara; AC= Arraial do Cabo.

Parâmetros físico-químicos: Latitude (Lat.), Longitude (Long.), Temperatura (Temp), Salinidade (Sal.), Oxigênio dissolvido (DO).

** Sup = Superfície

*** Parâmetros biológicos: diferentes letras indicam diferenças significativas entre os anos de coleta dentro de um mesmo local (^a, ^b e ^c) e diferenças significantes entre os locais de coleta em um mesmo ano (^A e ^B), com $P \leq 0,05$.

Sexo: M = macho; F = Fêmea.

Est. Mat= Estágio de maturação; A= imaturo, B= Intermediário, C= maturo.

Biomarcadores bioquímicos em corvina (*Micropogonias furnieri*) (Desmarest, 1823) (Perciformes – Sciaenidae), coletadas no litoral Sudeste do Brasil

Eliana C. Ventura^a, Maria R. F. Marques^a, Luiz R. Gaelzer^b, Afonso C. D. Bairy^{a*}

^aLaboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Depto. Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, SC, Brazil

^bInstituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, Ministério da Marinha, Arraial do Cabo, 28930-000, RJ, Brasil

*Autor para correspondência: Afonso C. D. Bairy, Depto. Bioquímica, CCB, UFSC, Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil Fax: +55-48-3319672. e-mail: bairy@mbox1.ufsc.br

ABSTRACT

*Along the Brazilian coastal zone, there have been several reports of contamination, particularly in the southeast region, where high populational density and industrial activity is observed. A Marine Monitoring Program (MOMAM), coordinated by the Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM, Ministry of Marine Affairs), was performed on the coast of Rio de Janeiro and São Paulo States in Brazil to evaluate biochemical biomarkers in fishes that occurs at these areas. Cytochrome P450 (CYP1A) expression, as well as glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activities were analyzed in liver samples of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) caught at Guanabara Bay (GB), Sepetiba (SEP), Angra dos Reis (AR) the Rio de Janeiro coast and São Sebastião (SS), on the São Paulo coast, in 2000, 2001 and 2002. Liver samples were homogenized and centrifuged in order to obtain the microsomal and cytosolic fractions. In the microsomal fraction, CYP1A expression was analyzed using slot-blot and the enzyme activities were measured by conventional spectrophotometric techniques in the cytosolic fraction. Fish sampled in 2001 at BG and AR showed higher CYP1A expression, which suggests that these organisms were exposed to greater amounts of Ah receptor agonists. The activity of antioxidant and conjugation enzymes in the liver of fish collected at different sites did not show a consistent pattern of responses. However, fish caught at BG and SS showed higher GST activity along the years, which might be related to higher contaminant input caused by industrial and domestic effluents.*

*Key words: *Micropogonias furnieri*; Biomarkers; Antioxidant enzymes; CYP1A; Catalase; Glutathione S-transferase ; Brazil.*

RESUMO

*Ao longo da zona costeira brasileira existem vários relatos de contaminação ambiental, particularmente na região sudeste onde existe uma elevada densidade populacional e industrial. O Programa de Monitoramento Marinho (MOMAM), coordenado pelo Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM – Ministério da Marinha) foi realizado ao longo da costa dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil, com o objetivo de avaliar biomarcadores bioquímicos em peixes encontrados nestas áreas. A expressão do citocromo P450 (CYP1A), a atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) foram analisadas em amostras de fígado de corvinas (*Micropogonias furnieri*) coletadas nos anos de 2000, 2001 e 2002 na Baía da Guanabara (BG), Sepetiba (SEP), Angra dos Reis (AR), no litoral do Rio de Janeiro e São Sebastião (SS), no litoral de São Paulo. As amostras de fígado foram homogeneizadas e centrifugadas para obtenção das frações citosólica e microsomal. Na fração microsomal, a expressão da CYP1A foi analisada através de “slot-blot” e a atividade das enzimas foram medidas por espectrofotometria convencional na fração citosólica. A expressão da CYP1A foi maior nos peixes coletados em 2001, na BG e AR, o que sugere que estes animais foram expostos a uma maior concentração xenobióticos agonistas do receptor Ah. A atividade das enzimas antioxidante e de conjugação de xenobióticos não apresentaram um padrão variado de resposta. Os peixes coletados na BG e em SS nos diferentes anos de coleta, apresentaram as maiores atividades da GST, o que pode estar relacionado um maior aporte de contaminantes de origem industrial e doméstica no ambiente.*

*Palavras-chave: *Micropogonias furnieri*; Biomarcadores; Enzimas antioxidantes; CYP1A; Glutathione S-transferase; Brasil.*

1 – Introdução

A poluição do ambiente marinho não afeta apenas a vida aquática, mas também constitui uma séria ameaça a toda vida no planeta. Atualmente milhares de contaminantes orgânicos, tais como bifenilas policloradas (BPC), pesticidas organoclorados (POCs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), dibenzofuranos policlorados (DFPCs) e dibenzo-*p*-dioxinas (DDPCs) têm sido produzidos e, em parte, alcançam os oceanos (Van der Oost et al., 2003). Estes contaminantes podem ser encontrados associados aos sedimentos, dissolvidos na água e em diversos organismos, incluindo aqueles utilizados na dieta humana e de outras espécies marinhas (Hahn, 2001).

Os contaminantes podem causar neurotoxicidade, problemas reprodutivos, danos no desenvolvimento, bem como, disfunções imunológicas, câncer e, em casos extremos, a morte dos organismos expostos (Adams et al., 1989; Stegeman et al., 1992). Estudo com biomarcadores em peixes que indicam que o organismo tenha sido exposto ao poluente (biomarcadores de exposição) e/ou a magnitude desta resposta ao poluente (biomarcadores de efeito), que respondem a certas classes de contaminantes, podem servir como uma ferramenta complementar nas decisões de manejo ambiental (Van der Oost et al., 1996).

A análise de biomarcadores bioquímicos foi incorporada em programas de monitoramento ambiental na Europa e nos Estados Unidos (por exemplo o “North Sea Task Force Monitoring Master Plan” e o “National Status and Trends Program”) (Cajaraville et al., 2000). Entretanto, estudos de biomarcadores em peixes coletados no Atlântico sudoeste ainda são muito escassos.

A expressão e atividade das enzimas de biotransformação de fase I e II, associadas com a análise de enzimas de defesas antioxidantes em fígado de peixes têm sido propostas como

biomarcadores de contaminação aquática por diversos autores (Roy et al., 1995; Otto et al., 1996).

O citocromo P450 (CYP450) é uma família de proteínas que contém o grupamento heme em sua estrutura e são responsáveis por catalisar os primeiros passos da biotransformação de uma variedade de xenobióticos. Estas proteínas são encontradas tanto em organismos eucariontes, como procariontes. (Buhler & Wang-Buhler, 1998; Jokanovic, 2001; Miller et al., 2003). A análise da expressão da subfamília CYP1A tem sido amplamente utilizada como biomarcador de contaminação por compostos de origem orgânica (Stegeman et al., 1987; Livingstone et al., 1993; Monosson & Stegeman, 1994).

Glutathione *S*-transferase (GST) é uma família de enzimas responsáveis pela conjugação do tripeptídeo glutathione (GSH) com o centro eletrofílico de uma ampla variedade de compostos xenobióticos (Bainy et al., 2000), tanto como de intermediários reativos produzidos durante o estresse oxidativo (Henson et al., 2000). Durante a biotransformação de xenobióticos, espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas através do ciclo redox ou reações desacopladas dependente de CYP, os quais podem causar sérios danos às biomoléculas dos organismos expostos. Sistemas de defesa celular atuam prevenindo e inativando estas espécies reativas. Dentre estes sistemas podemos incluir a superóxido dismutase (SOD), que dismuta o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (McCord and Fridovich, 1969). O H_2O_2 pode ser então decomposto à oxigênio molecular (O_2) e água, pela ação da enzima antioxidante catalase (CAT) (Aebi, 1984); ou então decomposto diretamente à água através da ação da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx), que concomitantemente oxida o tripeptídeo glutathione (GSH), o qual é reduzido pela glutathione redutase (GR), com a utilização de NADPH (Otto and Moon, 1996).

Desde 1997, o Programa de Monitoramento Marinho vem ocorrendo no sudeste da costa brasileira (Projeto MOMAM: Monitoramento do Ambiente Marinho) sob coordenação do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM- Ministério da Marinha). Como parte deste programa, amostras de água, sedimento e peixes coletados em 2000, 2001 e 2002 provenientes da Baía da Guanabara (BG), Sepetiba (SEP), Angra dos Reis (AR) e São Sebastião (SS) (Figura 1) foram coletadas para análises químicas e bioquímicas.

A BG é um dos estuários mais produtivos do Sudeste da costa brasileira. É rodeada por três grandes cidades (Rio de Janeiro, São Gonçalo e Niterói), que são responsáveis pelo despejo de mais de 470 toneladas de matéria orgânica provenientes de esgotos domésticos de mais de 11 milhões de pessoas (Silva et al., 2003). Episódios de contaminação por óleo cru provenientes das atividades portuárias, refinarias e terminais de petróleo, também ocorrem nesta região (Costa et al., 2000). SEP, localizada aproximadamente a 60 Km ao Sul da cidade do Rio de Janeiro, tem como principal atividade econômica a pesca, o turismo (Karez et al., 1994), e uma diversidade de indústrias que ameaçam a qualidade ambiental da região (Lima Júnior et al., 2002). Engloba um estuário formado por dois importantes rios que constituem 75% de toda a demanda de água, recebendo todo despejo proveniente de um grande parque metalúrgico, o qual contribui com a maior quantidade de metais pesados nesta parte da zona costeira (Kehrig et al., 1998). Um ambiente similar, no entanto menos impactado, é a região de AR. Possui uma área total de 79,3 Km² e não recebe descargas de origem industrial e urbana. É uma ambiente de condições oligotróficas e até o presente, é considerada uma área não contaminada. Possui um estuário (Baía de Ilha Grande) que é uma das áreas recreacionais mais importante do Estado do Rio de Janeiro (Kehrig et al., 1998). SS é uma Baía com importante atividade turística e portuária que recebe grande quantidade de despejos que chegam pelo canal de São Sebastião, o qual é considerado o centro de atividades, principalmente na estação do verão. É na costa marítima da cidade que está

localizado o mais importante terminal de óleo do Brasil, assim como o porto de São Sebastião, que possui também uma das maiores atividades pesqueiras do país (Zanardi et al., 1999).

O objetivo do presente estudo foi o de analisar alguns biomarcadores bioquímicos em fígados de peixes da espécie *Micropogonias furnieri* coletados em diferentes pontos do Sudeste da costa do Brasil. A escolha desta espécie se deveu a grande frequência de ocorrência nos locais de coleta e também por ser uma das espécies que apresenta uma alta taxa de bioacumulação de BPCs (Silva et al., 2003).

2 - Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram da marca Sigma-Aldrich. Para a detecção da proteína CYP1A foi utilizado o anticorpo monoclonal 1-12-3 anti-*scup* (P450E) doado gentilmente pelo Dr. J. J. Stegeman, Wood Hole Oceanographic Institution. O anticorpo secundário utilizado foi o de cabra contra imunoglobulina (IgG) de camundongo conjugada a peroxidase da marca Amersham Pharmacia Biotech. Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) e filmes autoradiográficos Kodak X-OMAT foram utilizados para visualização das proteínas.

2.2 Material Biológico

Corvinas (*M. furnieri*) machos e fêmeas identificadas pelo M. Sc. Luiz Ricardo Gaelzer (IEAPM), segundo Figueiredo & Menezes (1978, 1980, 2000), Fischer (1978), Menezes & Figueiredo (1980, 1985) e Cervigón et al. (1993) foram coletadas nos anos de 2000, 2001 e 2002 a bordo do Av. Pq. Oc. Diadorim do IEAPM. Os peixes foram coletados através de arrasto de fundo com rede de portas ('otter-trawl') com 10 metros de comprimento por 10 metros de abertura de boca, com malha de 20 milímetros, durante 20 minutos, em pontos da BG, SEP, AR, no litoral do Estado do Rio de Janeiro e em SS, no litoral de São Paulo, Sudeste da costa brasileira (Figura 1). Após os arrastos, os peixes foram separados e mantidos vivos em uma caixa de isopor com capacidade para 100 litros, contendo água do mar, até a decapitação, o que ocorreu imediatamente. De cada animal coletado foram registrados os parâmetros biológicos de comprimento (cm) com um ictiômetro, peso (g), com uma balança eletrônica, sexo e estágio de maturação gonadal, analisados macroscopicamente. O fígado de cada indivíduo foi removido e

imediatamente congelado em nitrogênio líquido (-185°C). Em laboratório, os tecidos foram mantidos a temperatura de -85°C.

Amostras de água também foram coletadas com garrafa de Nansen com termômetro de inversão e garrafa de van Dorn, com o intuito de verificar, na superfície e fundo, as seguintes variáveis: temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido.

2.3 Preparação das Amostras

As amostras foram descongeladas sobre gelo, pesadas e homogeneizadas em quatro vezes o volume de tampão de homogeneização Tris-HCl 50 mM, KCl 0,15 M, pH 7,4 contendo PMSF 0,1 mM, utilizando homogeneizador Tissue tearor (Biospec Prod. INC.). O homogeneizado foi centrifugado a 9,000g por 21 minutos a 4°C. A fração sobrenadante foi submetida a uma centrifugação de 38,900g por 70 minutos a 4°C, para obtenção das frações citosólica (análises enzimáticas) e microsomal (expressão da CYP1A). Aliquotas da fração citosólica foram estocadas a -85°C até as análises enzimáticas, o pellet microsomal foi ressuscitado em 200 µL de tampão de microsoma contendo Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 0,1 M, 20% glicerol, pH 7,6 e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Este procedimento foi realizado a uma temperatura de 4°C.

2.4 Análises Bioquímicas

2.4.1 “Slot-Blot”

As análises de “Slot blot” foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Slott (1989). Amostras de 30 µg da fração microsomal foram solubilizadas em tampão de microsoma (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 0,1 M, 20% glicerol, pH 7,6) e cada amostra

foi então aplicada diretamente sobre uma membrana de nitrocelulose utilizando-se um sistema de vácuo contínuo. As ligações não específicas na membrana foram bloqueadas durante a noite a 4°C em solução de bloqueio (5% leite em pó desnatado diluído em uma solução contendo 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,5 e 0,05 % Tween-20). Após o bloqueio as membranas foram lavadas e tratadas durante 90 minutos com anticorpo monoclonal 1-12-3 contra CYP1A(1) de *scup* (P450E) diluído 100 µg/ml em solução de bloqueio (Park et al., 1986). Após nova lavagem, as membranas foram incubadas por 90 minutos com anticorpo secundário de cabra contra imunoglobulina (IgG) de camundongo conjugada a peroxidase diluído 1:1000 em solução de bloqueio. A expressão de CYP1A foi analisada utilizando o kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech), seguido pela visualização por Quimioluminescência em filmes autoradiográficos Kodak X-OMAT. Após a detecção e visualização, os filmes foram digitalizados e a intensidade das bandas foi determinada através de densitometria de vídeo-imagem utilizando-se o software SCION Image, e a quantidade de proteínas imunoreativas foram expressas em termos relativos de unidades de densidade óptica.

2.4.2 Glutathione S-Transferase (GST) (E.C.:2.5.1.18)

A atividade da GST foi determinada na fração citosólica pelo método de Keen et al. (1976) o qual é baseado na substituição do cloro da molécula de CDNB pelo ânion tiol da glutathione através de uma reação de substituição nucleofílica, a qual provoca mudanças na absorbância registrada a 340 nm durante 2 minutos. A amostra (10 µL - 10%), foi adicionada ao meio de reação contendo 0,1 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, 100 mM de glutathione reduzida (GSH), 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em um volume final de 1 ml. A atividade enzimática foi expressa em U/min/mg de proteína, onde uma unidade da enzima corresponde a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de produto por minuto

por miligrama de proteína. Para o cálculo da atividade utilizou-se um coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4.3 Superóxido Dismutase (SOD) (E.C.: 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente nas frações citosólicas de fígado, através da inibição da redução do citocromo *c* pelo radical ânion superóxido (O_2^-) produzido pelo sistema xantina/xantina oxidase, medindo-se o aumento de absorbância em 550 nm a 25°C (McCord & Fridovich, 1969). A adição da SOD promove uma inibição na velocidade de redução do citocromo *c*, uma vez que esta compete com o citocromo pelo O_2^- , dismutando-o a H_2O_2 . O meio de reação continha 10 μM citocromo *c*, 50 μM xantina, 0,1 mM EDTA, 20 μM KCN em 50 mM tampão fosfato de potássio, pH 7,8. Uma unidade (U) de SOD foi definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da redução do citocromo *c*, por minuto, em pH 7,8 a 25°C e os resultados foram expressos como U/min/mg proteína.

2.4.4 Catalase (CAT) (E.C.:1.11.1.6)

A atividade da CAT foi analisada na fração citosólica de acordo com o método descrito por Beutler (1975), que quantifica o decréscimo de absorbância a 240 nm associado à velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O meio de reação consistiu de uma mistura de 10 mM H_2O_2 , 0,5 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) e 10 μL (10%) de amostra em um volume final de 1 ml. Todas as análises foram realizadas em duplicatas e o decréscimo de absorbância foi quantificado a 240 nm (UV) durante 1 minuto. A atividade da CAT foi expressa em unidades (U) por mg de proteína. Uma unidade de CAT corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μM H_2O_2 por minuto, a 25°C, em pH 8,0. Para o cálculo da atividade enzimática utilizou-se um coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a $0,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4.5 *Glutathione Peroxidase (GPx) (E.C.: 1.11.1.9)*

A atividade da GPx foi analisada na fração citosólica de acordo com o método descrito por Sies et al. (1979), a qual é quantificada pelo decréscimo de absorvância durante a redução da glutathione oxidada (GSSG) pela glutathione redutase (GR) na presença do NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional a velocidade de produção de GSSG a partir de glutathione reduzida (GSH), na presença de peróxido catalisada pela GPx. O meio de reação consistiu de uma mistura de 0,1 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0 contendo 0,5 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 0,1 U/mL GR e 0,1M glutathione reduzida. A oxidação do NADPH foi registrada espectrofotometricamente a 340 nm a 25⁰C. A atividade enzimática específica da GPx foi calculada em nmol de NADPH oxidado por minuto e expressa em U/min/mg de proteína, utilizando-se um coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹

2.4.6 *Glutathione Redutase (GR) (E.C.:1.6.4.2)*

A atividade da GR foi analisada na fração citosólica de acordo com Sies et al. (1979). O meio de reação continha 0,1 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, 0,5 mM EDTA, 1 mM glutathione oxidada (GSSG), 0,2 mM NADPH e quantidades variáveis de amostras. Os ensaios foram realizados em duplicatas e a atividade enzimática da GR foi quantificada a 25°C através do desaparecimento de NADPH a um comprimento de onda de 340 nm. A atividade específica da enzima foi calculada em nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína e expressa em unidade (U) de GR por mg de proteína, onde uma unidade de GR foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de oxidar 1nmol de NADPH por minuto, em pH 7,0 a 25°C. Para o cálculo da atividade da GR foi utilizado um coeficiente de extinção molar (ϵ) de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

2.5 Quantificação da Concentração de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais presente nas frações citosólica e microsomal foi determinada de acordo com o protocolo de Lowry et al. (1951) modificado por Peterson (1977), utilizando-se o reagente de Folin e albumina sérica bovina como padrão.

2.6 Análise Estatística

A normalidade dos dados bioquímicos obtidos foi analisada estatisticamente através do teste de Plotagem da Probabilidade Normal. Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste complementar de Tukey HSD para tamanhos amostrais diferentes, adotando-se um $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica for Windows[®] 5.1. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (tamanho amostral, n).

3 - Resultados

3.1 Dados Físicos e Químicos

Os dados físicos e químicos podem ser observados na Tabela 1. A temperatura da água superficial registrada nos diferentes pontos de coleta variou de 19°C a 27,8°C e da água de fundo, de 14,5 °C a 24,5°C. As maiores salinidades foram encontradas em SS no ano de 2001 (35,14‰ na superfície e 35,47‰ no fundo) e as menores em SEP no ano de 2000 (30,84‰ na superfície e 32,98‰ no fundo). O menor teor de oxigênio dissolvido na água de superfície foi encontrado nas amostras da BG no ano de 2002 (4,26 ml/l) e na água de fundo foi em AR (4,20 ml/l). Os maiores valores de OD foram detectados na SEP tanto na superfície como no fundo na coleta realizada em 2001 (5,30 ml/l na superfície e 5,20 ml/l no fundo).

3.2 Dados Biológicos

Os peixes coletados em SEP em 2001 apresentaram comprimento ($43,8 \pm 7,3$ cm; $n= 5$) e peso ($790,9 \pm 469,4$ g; $n= 5$) significativamente maiores do que os animais coletados nos demais locais e neste mesmo local em 2000 (Tabela 1). Neste grupo de animais foi observada uma predominância de machos em estágio intermediário de maturação. Na BG os peixes coletados no ano de 2000 apresentaram um tamanho maior que aqueles coletados no ano de 2002 (Tabela 1). No entanto, em ambas coletas houve uma predominância de fêmeas em estágio inicial de maturação (Tabela 1). Os animais coletados em AR e SS não apresentaram diferença significativa no peso e comprimento tendo havido também uma predominância de animais em estágio inicial de maturação gonadal (Tabela 1).

3.3 Expressão da CYP1A

Uma expressão significativamente maior da CYP1A foi observada no fígado dos peixes coletados em 2001 na BG e AR, em relação aos animais coletados em 2000, respectivamente nas mesmas regiões (Figura 2A). Os animais coletados em 2001 em AR também apresentaram níveis significativamente maiores de CYP1A que os animais de SEP e SS neste mesmo ano (Figura 2A). Apesar dos níveis de CYP1A no fígado dos peixes coletados em SS no ano de 2001 terem sido comparativamente menores aos da BG e AR, estes foram significativamente maiores aos encontrados nos peixes coletados neste local no ano de 2000.

3.4 Análises Enzimáticas

Os animais de SEP coletados em 2000 e 2001 apresentaram baixos valores de atividade de GST comparados com os animais oriundos da BG e SS. Os animais da BG e de AR coletados em 2000 apresentaram uma maior atividade da GST que os animais de 2001. Este perfil foi invertido nos animais de SEP, onde a maior atividade desta enzima foi observada em 2001 (Figura 2B).

Os resultados obtidos com relação à atividade da enzima SOD podem ser observados na Figura 2C. Os peixes amostrados em SS e em AR no ano de 2001 apresentaram uma atividade significativamente maior da SOD hepática que os coletados no ano de 2000, respectivamente em ambos locais. Os peixes coletados na BG no ano de 2000 tiveram uma atividade da SOD significativamente maior em comparação aos coletados em AR e SS, neste mesmo ano. Da mesma forma, os animais de SEP apresentaram uma maior atividade da SOD que os animais de SS em 2000.

A atividade da CAT nos peixes coletados em AR no ano de 2000 foi significativamente maior que no ano de 2001 (Figura 2D). Os peixes coletados em BG, SEP e SS não apresentaram nenhuma variação da atividade da CAT em relação aos diferentes períodos de amostragem. Os peixes coletados em SEP apresentaram uma baixa atividade da CAT, quando comparados aos animais da BG e SS, tanto em 2000, quanto em 2001 (Figura 2D). A atividade da CAT nos peixes provenientes de SS foi maior que a dos peixes provenientes de AR apenas no ano de 2001.

A atividade da enzima GPx se manteve homogênea em praticamente todos os locais de coleta em todos os anos, a exceção dos peixes coletados em 2001 em AR. Estes foram os animais que apresentaram a maior atividade média de GPx, sendo significativamente diferente dos peixes coletados em 2000 neste local, e em 2001 na BG e SEP (Figura 2E).

A atividade da GR nos diferentes locais de coleta foi consistentemente maior nos peixes coletados no ano de 2001 quando comparados com aqueles coletados no ano anterior. Os animais coletados em SS em 2001 apresentaram uma atividade 1,8 vez maior que em 2000 e nos de SEP esta diferença chegou a mais de 5 vezes (Figura 2F). Os animais coletados em SEP no ano de 2000 apresentaram uma atividade significativamente menor do que os animais da BG, SS e AR, coletados neste mesmo ano (Figura 2F).

4 - Discussão

Existe uma carência de dados sobre a contaminação e seus efeitos sobre organismos marinhos na costa brasileira. Alguns trabalhos têm relatado casos de contaminação por petróleo e seus derivados (Silva et al., 1997; Zanardi et al., 1999a,b; Menicomi et al., 2002; Xavier de Brito et al., 2002; Yogui et al., 2003) por mercúrio (Malm et al., 1995; Moreira, 1996; Kehrig et al., 1998; Costa et al., 2000; Lacerda et al., 2000) e outros metais pesados (Rezende & Lacerda., 1986; Karez et al., 1994; Perin et al., 1997; Amado Filho et al., 1999; Avelar et al., 2000; Baptista Neto et al., 2000; Lima Júnior et al., 2002; Machado et al., 2002a,b). Entretanto, tais estudos analisam a presença de contaminantes a nível de ecossistema, ou mesmo da biota, sem focar aspectos relacionados com a toxicidade destes compostos nos diferentes níveis tróficos.

No presente trabalho foram analisados alguns biomarcadores bioquímicos de contaminação aquática (CYP1A, GST, SOD, CAT, GPx e GR) em fígado de peixes da espécie *M. furnieri* coletados em determinados locais da costa Sudeste do Brasil.

Neste trabalho, o sexo e o estágio de maturação dos peixes parecem não ter influenciado nas respostas bioquímicas analisadas, uma vez que nenhuma relação significativa foi observada entre os parâmetros bioquímicos analisados e estes dados biológicos (dados não apresentados).

Os animais coletados na BG e em AR no ano de 2001 apresentaram uma maior expressão da proteína CYP1A hepática do que os coletados em 2000, o que sugere, que tanto na BG quanto em AR, neste ano, possivelmente estes animais podem ter sido expostos a uma concentração mais elevada de contaminantes agonistas do receptor Ah (Aril hidrocarbono). Entre estes, podemos destacar as bifenilas policloradas planares (BPCs), os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), dioxinas, entre outros compostos comumente presentes em poluentes industriais, que além de serem eficientes indutores da CYP1A, também estão associados à atividade enzimática desta

proteína (Stegeman et al., 1994). Tais contaminantes ligam-se ao receptor Ah e a uma proteína HSP 90 (*heat-shock protein 90* KDa) no citoplasma da célula hepática formando um complexo que, quando translocado para dentro do núcleo promove a transcrição do RNAm e conseqüente síntese da proteína CYP1A. Assim, a expressão desta proteína é aumentada quando os animais são expostos a esta classe de contaminantes (Stegeman et al., 1997). A BG sofre um grande impacto ambiental causado principalmente por despejos de efluentes industriais e domésticos, dos terminais de petróleo, dos estaleiros navais e outras fontes provenientes da região (MDC/MMA, 1996). De acordo com Stringer et al. (2000), amostras de sedimento coletadas em Agosto de 2000 na BG e em alguns rios que desembocam nela, apresentaram níveis altos de hidrocarbonetos e 1,4 diclorobenzeno, assim como compostos organo-estânicos e contaminantes metálicos, especialmente o Cu, o Pb e o Zn. Tanigushi (2001), também detectou níveis elevados de hidrocarbonetos alifáticos totais ($62,98 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco), HPAs totais ($4155,82 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco) e seus congêneres, como BPCs ($185,7 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) em amostras de sedimento desta baía. Em um estudo recente, Silva et al. (2003) encontraram níveis de BPCs que variaram de 31,2 a 115 ng/g de peso úmido em amostras de músculo de *M. furnieri* coletados em 1999 e Silva et al. (2001) encontraram níveis destes mesmos compostos, variando de 2,62 a 8,99 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso úmido em amostras de tecido adiposo de cetáceos da espécie *Sotalia fluviatis* coletados em 1996 na BG. De acordo com estes autores, as concentrações de tais compostos encontradas nos animais desta baía, são comparáveis, de modo geral, às encontradas em organismos marinhos de outras regiões gravemente impactadas. Níveis similares de BCPs foram detectados em tilápias coletadas em uma região contaminada na Represa Billings, São Paulo. Bainy et al. (1999) e Leitão et al. (2000). Rocha-e-Silva et al. (*no prelo*), observaram que peixes coletados nesta represa apresentaram uma alta expressão e atividade enzimática da proteína CYP1A hepática. Níveis

elevados de mercúrio foram observados por Kehrig et al. (1998) e Kehrig et al. (2002) em amostras de *M. furnieri*, e por Costa et al. (2000) em mexilhões *Perna perna*, mesmo sendo em alguns casos, abaixo do máximo permitido para consumo pela legislação brasileira.

Embora os animais coletados na BG em 2000 terem apresentado uma menor expressão da proteína CYP1A em relação aos coletados no ano seguinte, não necessariamente significa que os mesmos não foram expostos a concentrações elevadas destes compostos. Pelo contrário, segundo Gabardo et al. (2001) e Menicomi et al. (2002), as concentrações destes contaminantes estiveram bastantes elevados neste ano, principalmente em decorrência do acidente ocorrido nos terminais de petróleo da PETROBRAS, na refinaria Duque de Caxias no mês de Janeiro de 2000. Segundo Brammell et al. (2004), algumas espécies de peixes podem apresentar uma diminuição ou até mesmo a falta de resposta desta proteína quando expostos a contaminação crônica por compostos deste tipo. Apesar de terem estudos sobre biologia e distribuição desta espécie, não existe até o momento nenhum trabalho deste tipo que tenha sido feito com a mesma, principalmente com relação a respostas de biomarcadores.

Kehrig et al. (1998) verificaram também, que amostras de tecido muscular de *M. furnieri* coletados na Baía de Ilha Grande (região de AR) apresentaram concentrações de mercúrio tão elevadas quanto às observadas nos animais da BG. Lima-Júnior et al. (2002) encontraram níveis altos de metais pesados (Cu, Fe, Cr, Zn, Cd, Pb) em fígado de peixes coletados nesta baía e na Baía de Sepetiba. Taniguchi (2001) verificou a presença de hidrocarbonetos alifáticos totais em amostras de mexilhões *P. perna* da Ilha Grande, indicando a introdução de hidrocarbonetos de petróleo que pode ser proveniente da vila de moradores existente naquela região, além da provável influência das pequenas embarcações, tanto de turistas, como de pescadores, que circulam pela região. Ventura et al. (2002) observaram níveis similares de CYP1A em fígados de peixes coletados em Setembro de 1999 na IG e BG.

Os peixes coletados nos demais locais, com exceção dos coletados em São Sebastião no ano de 2000, também apresentaram níveis detectáveis da proteína CYP1A, sugerindo que estes animais também foram expostos a agonistas do receptor Ah, uma vez que nestas regiões, existem locais onde ocorre um maior aporte destes poluentes (MDC/MMA, 1996; Zanardi et al. 1999). Segundo Menezes & Figueiredo (1980), *M. furnieri* pertence a uma espécie de peixes carnívoros, bentófagos (portanto, topo de cadeia) que nos primeiros meses de vida tendem a não se deslocarem por longas distâncias, permanecendo próximos ou dentro de baías e estuários, principalmente no período reprodutivo, que ocorre entre inverno e primavera. Neste trabalho, apesar dos animais terem sido coletados no verão, supõe-se, pelo tamanho médio dos mesmos, que estes tenham sido expostos a agonistas do receptor Ah nas proximidades do local de coleta.

Os animais coletados na BG e SS foram os que apresentaram maior atividade hepática da enzima de conjugação GST nos diferentes anos de coleta, enquanto que os coletados em SEP nos dois anos de coleta e AR em 2001, apresentaram uma atividade relativamente baixa desta enzima. Segundo Van der Oost et al. (2003), a atividade da GST é um parâmetro complexo de ser avaliado, devido ao fato desta enzima poder tanto ser ativada quanto inibida na presença de certos tipos de contaminantes. No entanto, o aumento de sua atividade tem sido relatado em vários estudos após a exposição de peixes a contaminantes do tipo HPAs, BPCs, entre outros (Rodriguez-Ariza et al., 1993; Vigano et al., 1995; Otto & Moon, 1996). A maior atividade da GST nestes locais pode estar, de certa forma, relacionada ao fato de que em 2000 ocorreram acidentes envolvendo derramamento de óleo cru, tanto na BG (mencionado anteriormente), quanto no canal de São Sebastião (colisão do navio Vergina II com o terminal de óleo da PETROBRAS, em 4 de Novembro) (Menicomi et al., 2002). Como os níveis de HPAs aumentaram drasticamente após estes acidentes, ambos podem ter ocasionado uma resposta adaptativa de aumento na capacidade de conjugação destes xenobióticos nestes animais, como

mecanismo de defesa, frente à agressão química. Pereira (2003), em estudo realizado com mexilhões expostos no canal de SS em 2001 encontrou níveis elevados de HPAs (1.630 ng.g de peso seco) em amostras de tecidos destes animais, ao mesmo tempo em que apresentaram um pequeno aumento da atividade da GST em comparação ao local referência.

Os peixes que apresentaram uma menor expressão da CYP1A na BG e AR em 2000, também mostraram uma maior atividade da GST hepática. Por outro lado, no ano seguinte ocorreu o inverso, houve um aumento da expressão da CYP1A e uma diminuição da atividade da GST. O processo de detoxificação de xenobióticos envolve os sistemas bioquímicos de biotransformação de Fase I, ex. o citocromo P450, e de conjugação (Fase II), entre as quais está incluída esta enzima. Considerando que os animais coletados no ano de 2000 apresentaram uma diminuição da expressão da CYP1A e um aumento da capacidade de conjugação, pode-se sugerir que os mesmos apresentaram uma menor produção de metabólitos da Fase I que seriam mais eficientemente conjugados pela GST, o que aumentaria a eficiência de excreção destes produtos nestes organismos. Este padrão de resposta também foi observado por Ventura (2001) em *Orthopristis ruber* coletados na Baía de Ilha Grande, com relação àqueles coletados na BG. Contudo, esta afirmação deve ser feita com muita cautela, uma vez que outras enzimas de conjugação, tais como as *UDP*-glucoronil transferases (UDPGTs), não medidas neste trabalho, poderiam estar ativas no fígado dos peixes coletados nestes pontos em 2001.

Em estudo realizado por Otto et al. (1996) com trutas expostas por até 42 dias a sedimentos contaminados por BPCs mostrou um aumento da atividade da CYP1A hepática (EROD), e uma diminuição da atividade da GST, semelhante ao observado nos animais coletados em 2001 na BG e AR. Possivelmente esta diminuição da GST esteja associada à diminuição do “pool” citosólico de GSH (a qual não foi medida no presente trabalho), co-substrato desta enzima, que poderia estar associada a uma condição de estresse oxidativo hepático, comumente observada em peixes

de regiões contaminadas (Bainy et al, 1996). No entanto, a atividade da GR (enzima responsável por manter os níveis de GSH no citosol), estava elevada no fígado dos peixes destes dois locais neste ano, sugerindo que estaria ocorrendo uma maior produção de glutathiona oxidada, decorrente de uma condição de estresse oxidativo.

Com relação à atividade dos sistemas antioxidantes, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram uma menor atividade da enzima CAT nos organismos coletados nos dois anos em SEP e em 2001 em AR. A atividade deste sistema pode ser ativada ou inibida sob estresse químico (Cossu et al., 2000). Tanto uma resposta como outra irá depender da intensidade e duração do estresse aplicado ao organismo, assim como da susceptibilidade deste organismo ao agente estressor. A ativação pode ser considerada como uma adaptação do organismo a fim de enfrentar um estresse ambiental, prevenindo assim a toxicidade. A inibição poderia estar possivelmente indicando uma maior susceptibilidade à contaminação química, podendo ser esperados efeitos adversos neste caso.

Segundo Kehrig et al. (1998) SEP recebe todo despejo proveniente de um grande parque metalúrgico, o qual contribui com a maior quantidade de metais pesados nesta parte da zona costeira, além disso, Karez et al. (1994), Amado Filho et al. (1999), Lima-Junior et al. (2002), relatam presença de metais na Baía de Sepetiba. De acordo com Taniguchi (2001), a região de AR é seriamente comprometida pela Usina Nuclear de Angra dos Reis, além de alguns terminais de petróleo. A atividade da CAT, como indicadora de estresse oxidativo, tem sido utilizada em alguns trabalhos no Brasil (Almeida, 1998; Bainy et al., 1996; Bainy et al., 2000; Isla, 2000; Ventura, 2001; Wilhelm Filho et al., 2001; Lopes, 2002; Ventura 2002; Alves, 2003; Trivella, 2003) e em outros países (Livingstone et al., 1993; Stephensen et al., 2000; Burgeot et al., 1996; Akcha et al., 2000; Romeo et al., 2003). Apesar de grande parte dos trabalhos indicarem que um aumento de sua atividade significa um mecanismo preventivo à ação de espécies reativas de

oxigênio, muitos têm demonstrado inibição de sua atividade à exposição a certos tipos de poluentes ambientais. Portanto é possível que os organismos coletados em SEP nos dois anos e em AR no ano de 2001 estivessem sofrendo estresse oxidativo associado à presença de algum tipo particular de grupo de contaminantes, enquanto que nos demais locais este efeito não foi observado.

O perfil de atividade da GPx, com exceção dos peixes coletados em SS e AR no ano de 2001, foi baixo no fígado dos animais coletados nos diferentes locais. Segundo Van der Oost et al. (2003), as peroxidases são enzimas que reduzem uma variedade de peróxidos a seus correspondentes álcoois, sendo que a GPx é responsável pela decomposição do H_2O_2 e oxida o tripeptídeo GSH até sua forma oxidada (GSSG), durante a catálise. Houve uma correlação significativa entre a atividade da GPx e da GR nos peixes coletados nestes dois locais neste ano, que também foi elevada nestes animais. A GR é responsável por manter os níveis de GSH necessária para a manutenção da capacidade antioxidante celular em condições de estresse oxidativo. Sendo assim, sugere-se que possa ter havido uma atividade cooperativa destas duas enzimas no sistema de defesa antioxidante celular dos peixes analisados, possivelmente coordenada a nível de expressão gênica. Com o aumento da GR, pode estar havendo, como consequência, um aumento dos níveis de GSH, necessários para a atuação da GPx, assim como da GST. Viganò et al. (1995), Van der Oost et al. (1998) e Stephensen et al. (2000), observaram uma menor atividade da GPx em fígado de peixes de locais contaminados.

De uma forma geral os peixes coletados em 2001 apresentaram uma maior atividade da SOD e GPx em relação aos peixes coletados no ano anterior. Interessante perceber que dentre todas as coletas realizadas nos diferentes pontos, a temperatura da água de fundo (onde os animais estão com mais frequência) no ano de 2001 foi sempre menor quando comparada com a temperatura observada para o ano anterior. Possivelmente, este aumento na atividade destas duas enzimas

antioxidantes nos animais coletados no ano de 2001 possa estar relacionado com a diminuição da temperatura da água neste ano, o que poderia ter influenciando no aumento da atividade destas enzimas. Diferentemente deste trabalho, Buzadzic et al. (1997), observaram uma diminuição da atividade destas enzimas em temperatura mais baixas.

Pelos dados obtidos neste estudo, foram observadas alterações nas respostas de diferentes biomarcadores de contaminação, que podem estar indicando possíveis efeitos dos contaminantes na costa brasileira, sobre populações de corvina que servem como indicador precoce de alterações ambientais associadas à presença de contaminantes.

Referências Bibliográficas

- Adams, S. M., Shepard, K. L., Greeley, M. S. Jr., Ryon, M. G., Shugart, L. R., McCarthy, J. F., 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Environ. Res.* 28, 459-464.
- Aebi, H., 1984. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis. London: Academic Press. v. 105, pp. 121-126.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J. F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo (a) pyrene contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 49, 269-287.
- Almeida, E. A., 1998. Avaliação de Biomarcadores em mexilhões *Perna perna* do litoral de Santa Catarina. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC. pp. 50.
- Alvez, S. R. C., 2003. Respostas Bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC. Tese de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC. pp. 50.
- Amado Filho, G. M., Andrade, L. R., Karez, C. S., Farina, M., Pfeiffer, W. C., 1999. Brown algae species as biomonitors of Zn and Cd at Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Environ. Res.* 48, 213-224.
- Avelar, W. E. P., Mantelatto, F. L. M., Tomazelli, A. C., Silva, D. M. L., Shuhama, T., Lopes, L. C., 2000. The marine mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) as an indicator of contamination by heavy metals in the Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Water, Air and Soil Poll.* 118, 65-72.

- Bainy, A. C. D., 1993. How to evaluated the safety chemical substances in aquatic environments. *Ciência e Cultura*. 45, 10-11.
- Bainy, A. C. D., Saito, E., Carvalho, P. S. M., Junqueira, V. B. C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.* 34, 151-162.
- Bainy, A. C. D., Woodin, B. R., Stegeman, J. J., 1999. Elevated levels of multiple Cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir – São Paulo, Brazil. *Aquat. Toxicol.* 44, 289-305.
- Bainy, A. C. D., Almeida, E. A., Muller, I. C., Ventura, E. C., Medeiros, I. D., 2000. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar. Environ. Res.* 50, 411-416.
- Baptista Neto, J. A., Smith, B. J., McAllister, J. J., 2000. Heavy metal concentration in surface sediments in a nearshore environment, Jurujuba Sound, Southeast Brazil. *Environ. Poll.* 109, 1-9.
- Beutler, E., 1975. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. Grune & Straton, New York.
- Brammell, B. F., Price, D. J., Birge, W. J., Elskus, A. A., 2004. Apparent lack of CYP1A response to high PCB body burdens in fish from a chronically contaminated PCB site. *Mar. Environm. Res.* 58, 251-255.
- Buhler, D. R., Wang-Buhler, J., 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.* 121C, 107-137.
- Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimmet, J., Santella, R. M., Dimeet, J., Santella, R. M., Garcia de la Parra, L. M., Pftol-Leszkowicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators

- of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 125-141.
- Buzadzic, B., Blagojevic, B., Korac, Z. S., Saicic, M. B., Petrovic, V. M., 1997. Seasonal variation in the antioxidant defense system of the Brain of the Ground Squirrel (*Citellus citellus*) and response to Low temperature compared with Rat. *Comp. Biochem. Physiol.* 117C, 141-149.
- Cajaravile, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environment of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Tot. Environ.* 247, 295-311.
- Costa, M., Paiva, E., Moreira, I., 2000. Total mercury in *Perna perna* from Guanabara Bay – 10 years later. *The Sc. Tot. EnvironmI.* 261, 69-73.
- Cossu, C., Dayotte, A., Babut, M., Ger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus* in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotox. Environ. Saf.* 45, 106-121.
- Gabardo, I. T., Menicomi, M. F. G., Falcão, L. V., Vital, N. A. A., Pereira, R. C. L., Carreira, R. S., 2001. Hydrocarbon and ecotoxicity in seawater and sediment samples of Guanabara Bay after the oil spill in January 2000. *International Oil Spill Conference.* March 26-29. Tampa – Florida, USA.
- Hahn, M. E., 2001. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *Sci. Tot. Environ.* v. 289, p. 49-69.
- Henson, K. L., Sheehy, K. M., Gallagher, E. R., 2000. Conservation of a glutathione S-transferase in marine and freshwater fish. *Mar. Environ. Res.* 50,17-21.
- Isla, L. A. S., 2000. Análises de biomarcadores bioquímicos e concentração de metais em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados no litoral central de Santa Catarina.

- Dissertação de Mestrado (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis. pp. 50.
- Jakanovic, M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicol.* 166, 139-160.
- Kares, C. S., Magalhães, V. F., Pfeiffer, W. C., 1994. Trace metal accumulation by algae in Sepetiba Bay, Brazil. *Environ. Poll.* 83, 351-356.
- Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B., 1976. Mechanism for several activities of the Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- Kehrig, H. A., Malm, O., Moreira, I., 1998. Mercury in a widely consumed fish *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) from four main Brazilian estuari. *Sci. Tot. Environ.* 213, 263-271.
- Kehrig, H. A., Costa, M., Moreira, I., Malm, O., 2002. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. *Mar. Poll. Bull.* 44, 1018-1023.
- Lacerda, L. D., Paraquetti, H. H. M., Marins, R. V., Rezende, C. E., Zalmon, I. R., Gomes, M. P., Farias, V., 2000. Mercury content in shark species from the south-eastern Brazilian coast. *Rev. Bras. Biol.* 60(4), 571-576.
- Leitão, M. A. S., Affonso, E. G., da Silva, M. E., Meirelles, N. C., Rantin, R. T., Vercesi, A. E., Junqueira, V. B. C., Degterev, I. A., 2000. The liver monooxygenase system of Brazilian freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol.C.* 126, 29-38.
- Lima Júnior, R. G., Araújo, F. G., Maia, M. F., Seda, A., Pinto, S. B., 2002. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Res. Section A.* 89, 171-179.
- Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L., Bucke, D., Law, R. J., 1993. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresoufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of

- Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar. Poll. Bull.* 26(11), 602-606.
- Lopes, F. R. A. S., 2002. Análises de Biomarcadores de Contaminação Aquática em ostras do mangue (*Crassostrea rhizophorea* – Guilding, 1828) cultivadas junto às comunidades pesqueiras do sul de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis. pp. 50.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 256.
- Machado, W., Moscatelli, M., Rezende, L. G., Lacerda, L. D., 2002a. Mercury, zinc, and copper accumulation in mangrove sediments surrounding a large landfill in southeast Brazil. *Environ. Poll.* 120, 455-461.
- Machado, W., Silva-Filho, E. V., Oliveira, R. R., Lacerda, L. D., 2002b. Trace metal retention in mangrove ecosystems on Guanabara Bay, SE Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 44, 1277-1280.
- Malm, O., Branches, F. J. P., Akagi, H., Castro, M. B., Pfeiffer, W. C., Harada, M., Dastos, W. R., Kato, H., 1995. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. *Sci. Total. Environ.* 175(2), 141-150.
- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- MDC/MMA Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União., 1996. Ministério do Meio Ambiente dos recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Sony Music-CD Room.
- Menezes, N. A., Figueiredo, J. L., 1980. Manual de peixes marinhos do litoral sudeste do Brasil: IV -Teleostei (3). 2nd Edição. Editora da Universidade de São Paulo, SP, pp. 96.

- Meniconi, M. F. G., Gabardo, I. T., Carneiro, M. E. R., Barbanti, S. M., Silva, G. C., Massone, C. G., 2002. Brazilian oil spill chemical characterization – Case Studies. *Environ. For.* 3, 303-321.
- Miller, K. A., Addison, R. F., Bandiera, S. M., 2003. Hepatic CYP1A levels and EROD activity in English sole: biomonitoring of marine contaminants in Vancouver Harbour. *Mar. Environ. Res.* 57, 37-54.
- Monosson, E., Stegeman, J. J., 1994. Induced cytochrome P4501A in Winter Flounder, *Pleuronectes americanus*, from offshore and coastal sites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 933-941.
- Moreira, J. C., 1996. Threats by heavy metals: human and environmental contamination in Brazil. *Sc. Tot. Environ.* 188, S61-S71.
- Otto, D. M. E., Buttner, J. K., Aequette, D. M., Moon, T. W., 1996. Impaired inducibility of xenobiotic and antioxidant responses in rainbow trout exposed to polychlorinated biphenyl contaminated sediments in the St. Lawrence river. *Chemosph.* 33, 2021-2032.
- Otto, D. M. E., Moon, T. W., 1996. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 141-147.
- Park, S. S., Miller, H., Klotz, A. V., Kloepper-Sams, P. J., Stegeman, J. J., Gelboin, H. V., 1986. Monoclonal antibodies to liver microsomal cytochrome P450E of marine fish *Stenotomus chrysops* (scup): Cross-reactivity with 3-methylcholanthrene induced rat cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 339-350.
- Pereira, C. D. S., 2003. Utilização de biomarcadores como indicadores de efeito e exposição a contaminantes em mexilhões da espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758) provenientes do canal de São Sebastião. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Instituto

- Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP. pp. 72.
- Perin, G., Fabris, R., Manente, S., Rebello, W. A., Hamacher, C., Scotto, S., 1997. A five-year study on the heavy-metal pollution of Guanabara Bay sediments (Rio de Janeiro, Brazil) and evaluation of the metal bioavailability by means of geochemical speciation. *Wat. Res.* 31, 3017-3028.
- Peterson, G. L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* Which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Rezende, C. E., Lacerda, L. D., 1986. Metais pesados em mexilhões (*Perna perna* L.) no litoral do Estado do Rio de Janeiro. *Ver. Brasil. Biol.* 46(1), 239-247.
- Rocha-e-Silva, T. A. A., Rantin, F. T., Matsumura-Tundisi, J. E., Matsumura-Tundisi, T., Tundisi, J. G., Degterev, I. A. Dynamic of cytochrome P450 inducers in polluted sites of São Paulo city reservoir. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* No prelo.
- Rodriguez-Ariza, A., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Pedrejas, J. R., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Barcena, J. A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J., 1993. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci. Tot. Environ. Suppl.* 1, 109-116.
- Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Girard, J. P., 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Poll.* 122, 369-378.
- Roy, S., Lindström-Seppä, P., Hänninen, O., 1995. Biotransformation and antioxidant enzymes in aquatic organisms as bioindicators of pollution. *Europ. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* Special Issue, 49-51.
- Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287-290.

- Silva, E. M. Da., Peso-Aguiar, M. C., Navarro, M. F. T., Barros, C., Chastinet, A., 1997. Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystem in Brazil. *An. Ver. Environ. Toxicol. Chem.* 16, 112-118.
- Silva, A. M. F., Lemes, V. R. R., Barretto, H. H. C., Oliveira, E. S., Alleluia, I. B., 2001. Contaminação por bifenilas policloradas (PCBs) em pequenos cetácios da espécie *Sotalia fluviatis* da Baía da Guanabara. In: Moraes, R. B. C., Crapez, M. A. C., Pfeiffer, W. C., Farina, M., Bainy, A. C. D., Teixeira, V. L., 2001. *Efeitos de poluentes e organismos marinhos*. Arte & Ciência. São Paulo, SP. Brasil, pp. 285.
- Silva, A. M. F., Lemes, V. R. R., Barretto, H. H. C., Oliveira, E. S., Alleluia, I. B., Paumgarten, F. J. R., 2003. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in edible fish species and dolphins from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 1151-1157.
- Slott, D. I., 1989. Immunoblotting and dot blotting. *J. Immun. Meth.* 119, 153-187.
- Stegeman, J. J., Teng, F. Y., Snowberger, E., 1987. Induced cytochrome P450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 1270-127.
- Stegeman, J. J., Brower, M., Di Giulio, R. T., Forlin, L., Fowler, B. A., Sanders, B. M., Van Veld, P. A., 1992. Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P., Bergman, H. L. Eds. Lewis Publishers. Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.

- Stegeman, J. J., Vrolijk, N. K., Taregett, N. M., Woodin, B. R., 1994. Toxicological and ecological implications of biotransformation enzymes in the tropical teleost *Chaetodon capistratus*. *Mar. Biol.* 119, 151-158.
- Stegeman, J. J., Woodin, B. R., Singh, H., Oleksiak, M. F., Celander, M., 1997. Cytochrome P450 (CYP) in tropical fishes: Catalytic activities, expression of multiple CYP protein and high levels of microsomal P450 liver of fishes from Bermuda. *Comp. Biochem. Physiol.* 116, 61-75.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., Förlin, L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbour on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48, 431-442.
- Stringer, R., Santillo, D., Labunska, I., Brigden, K., 2000. Poluição por compostos orgânicos de estanho, organoclorados, hidrocarbonetos e metais em amostras de sedimento da Baía da Guanabara, Brasil. Disponível em: <http://www.greempeacebrazil.com.br>. Acesso em: Junho de 2002.
- Taniguchi, S., 2001. Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências – Área de Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. pp. 160.
- Trivella, D. B. B., 2003. Respostas Bioquímicas em ostra do mangue (*Crassostrea rhizophorae*) mantidas no canal da Barra da Lagoa – Ilha de Santa Catarina. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC. pp. 41.

- Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N. P. E., 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat. Toxicol.* 36, 189-222.
- Van der Oost, R., Lopes, S. C. C., Komen, H., Satumalay, K., Van den Bos, R., Heida, H., Vermeulen, N. P. E., 1998. Assessment of environmental quality and island water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*); use of a bioactivation-detoxification ratio as biotransformation index (BTI). *Mar. Environ. Poll.* 46, 315-319.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Ventura, E. C., 2001. Biomarcadores de contaminação aquática em peixes coletados no litoral Sudeste brasileiro. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC. pp. 67.
- Ventura, E. C., Gaelzer, L. R., Zanette, J., Marques, M. R. F., Bainy, A. C. D., 2002. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. *Mar. Environ. Res.* 54, 775-779.
- Vigano, L., Arillo, A., Melodia, F., Bagnasco, M., Bennicelli, C., De Flora, S., 1995. Hepatic and biliary biomarkers in rainbow trout injected with sediment extracts from the river Pó (Italy). *Chemosp.* 30, 2117-2128.
- Yogui, G. T., Santos, M. C. O., Montone, R. C., 2003. Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananéia estuary, southeastern Brazil. *Sci. Tot. Environ.* 312, 67-78.
- Xavier de Brito, A. P., Brüning, I. M. R. A., Moreira, I., 2002. Chlorinated pesticides in mussels from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 44, 79-81.

- Wilhelm Filho, D., Tribess, T., Gáspari, C., Cláudio, F. D., Torres, M. A., Magalhães, A. R. M., 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the Brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*. 203, 149-158.
- Zanardi, E., Bicego, M. C., Miranda, L. B., Weber, R. R., 1999a. Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 38, 261-267.
- Zanardi, E., Bicego, M. C., Weber, R. R., 1999b. Dissolved/dispersed petroleum aromatic hydrocarbons in the São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 38, 410-413.

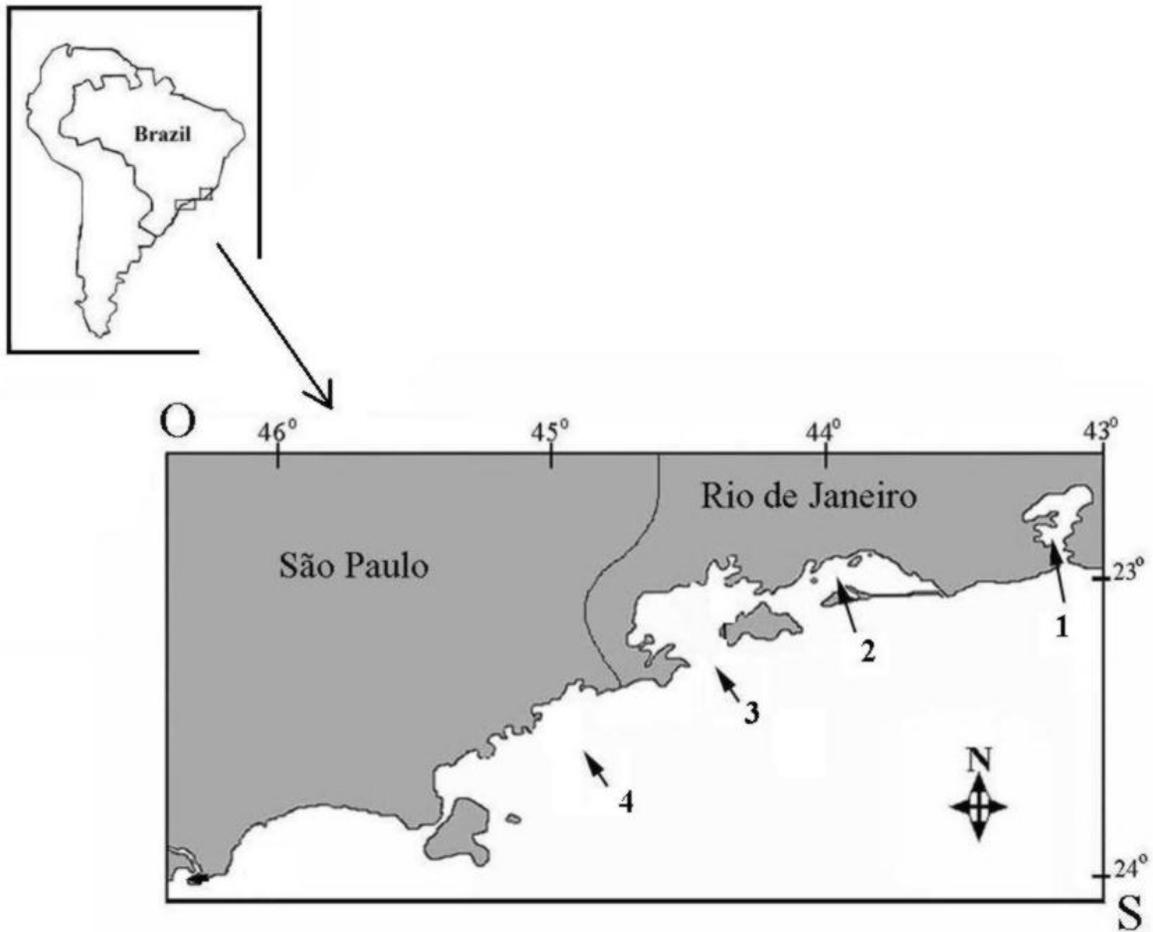


Figura 1: Mapa do Brasil e da costa dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, mostrando os diferentes locais de coleta. 1- Baía da Guanabara, 2- Sepetiba, 3- Angra dos Reis e 4- São Sebastião.

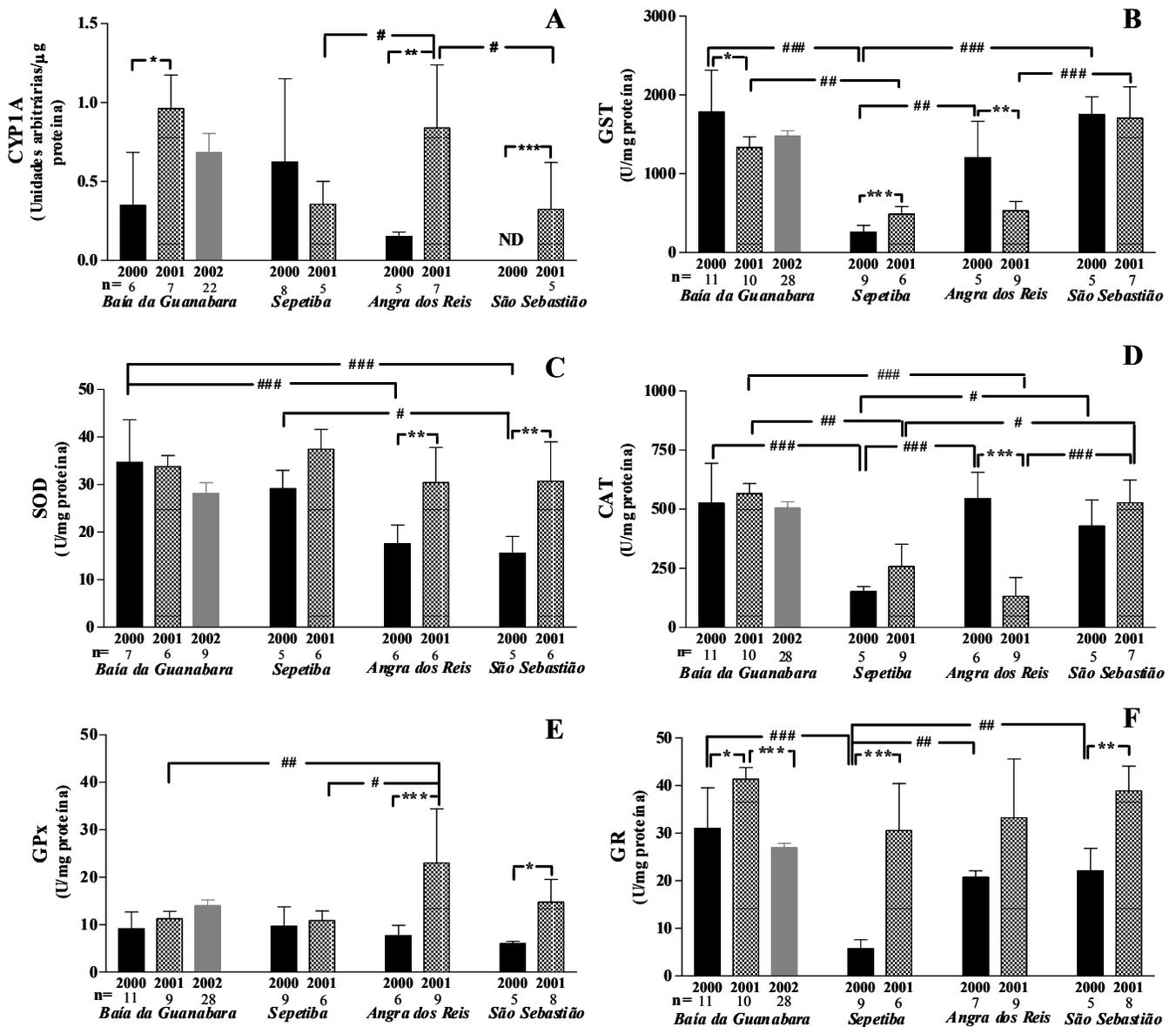


Figura 2: Análise da expressão da CYP1A (A) e da atividade das enzimas glutatona S-transferase (B), superóxido dismutase (C), catalase (D), glutatona peroxidase (E) e glutatona redutase (F), em fígado de *Micropogonias furnieri* coletadas na Baía da Guanabara, São Sebastião, Sepetiba e Angra dos Reis. “n” indica o número de amostras analisadas. *, ** e *** indicam diferenças entre os anos de coleta dentro de um mesmo local, com $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$ respectivamente. #, ## e ### indicam diferenças entre os locais de coleta dentro da mesma coleta, com $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$ respectivamente. ND: níveis não detectados.

Tabela 1

Parâmetros físicos e químicos da água no local de coleta e biológicos dos animais amostrados.

Locais* Mês/ano	Lat.	Long.	T°C (Sup**.- Fundo)	Sal. (Sup.- Fundo)	OD (Sup.- Fundo)	Comp. (cm)***	Peso (g)	Sexo#		Est. Mat###		
								M - F	A	B	C	
BG 12/2000	22°55',141''S	043°09',513''W	25,5 – 23,2	31,90 – 33,99	4,51 – 4,82	25,7 ± 4,8 ^A	159,0 ± 84,7	4 - 7	9	2	0	
BG 12/2001	22°55',191''S	043°09',611''W	19,0 – 17,7	34,13 – 34,75	4,50 – 4,80	25,0 ± 5,5 ^{a/A,B}	153,3 ± 50,8 ^a	4 - 6	9	1	0	
BG 03/2002	22°58',324''S	043°09',005''W	24,4 – 24,0	34,72 – 35,14	4,26 – 4,71	18,2 ± 1,9 ^B	42,4 ± 11,6	8 - 20	27	0	0	
SEP 12/2000	22°59',264''S	043°59',570''W	25,5 – 24,2	30,84 – 32,98	4,92 – 4,82	24,2 ± 7,5 ^C	201,9 ± 146,5	3 - 6	7	2	0	
SEP 12/2001	22°59',085''S	043°59',484''W	23,4 – 20,9	33,30 – 34,11	5,30 – 5,20	43,8 ± 7,3 ^{b,D}	790,9 ± 469,4 ^b	4 - 2	1	5	0	
AR 12/2000	23°02',604''S	044°26',896''W	26,3 – 22,8	32,29 – 34,66	4,51 – 4,72	28,6 ± 11,0	284,9 ± 297,7	2 - 4	5	1	0	
AR 12/2001	23°02',872''S	044°27',116''W	27,8 – 14,5	33,68 – 35,45	4,60 – 4,20	22,4 ± 2,9 ^a	108,7 ± 48,3 ^a	0 - 8	7	1	0	
SS 12/2000	23°50',689''S	045°27',135''W	25,5 – 24,5	31,68 – 32,91	4,31 – 4,92	32,8 ± 7,1	342,3 ± 245,4	3 - 2	3	1	1	
SS 12/2001	23°50',095''S	045°27',219''W	24,5 – 18,8	35,14 – 35,47	4,50 – 4,80	26,9 ± 5,5 ^a	216,5 ± 156,0 ^a	4 - 4	6	2	0	

*BG= Baía da Guanabara; SS= São Sebastião; SEP= Sepetiba; AR= Angra dos Reis.

Parâmetros físico-químicos: Latitude (Lat.), Longitude (Long.), Temperatura (T°C), Salinidade (Sal.), Oxigênio dissolvido (OD).

** Sup = superfície; *** Comp. = comprimento (cm); # M= macho, F= fêmea; ### Est. Mat = Estágio de Maturação gonadal; A = imaturo, B = intermediário, C = maturo.

Parâmetros biológicos: diferentes letras indicam diferenças significativas entre locais em um mesmo ano de coleta (^a e ^b) e diferenças significantesentre os anos de coleta dentro de um mesmo local (^A e ^B; ^C e ^D), com $P \leq 0,05$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os peixes da espécie *O. ruber* coletados na BG no ano de 2000, apresentaram uma maior expressão da proteína CYP1A hepática, sendo significativamente maior que nos peixe coletados em AC neste mesmo ano. Possivelmente neste ano, os animais coletados na BG foram expostos a uma concentração maior de contaminantes do tipo agonistas do receptor Ah. Este possível aumento na concentração destes compostos pode ter ocorrido em consequência do acidente que houve em Janeiro deste mesmo ano, onde aproximadamente 340.000 galões de óleo cru, provenientes de uma estação de petróleo da refinaria Duque de Caxias da PETROBRAS, vazaram nas águas da baía.

- Ao mesmo tempo em que apresentaram uma elevada expressão da CYP1A hepática, os peixes da espécie *O. ruber* coletados na BG apresentaram em todos os anos de coleta, uma diminuição da atividade da GST em comparação aos animais coletados em AC. Possivelmente estes animais estavam com uma menor capacidade de conjugação dos metabólitos produzidos pelo sistema CYP, enfrentando assim, uma situação de desequilíbrio no sistema de biotransformação dos xenobióticos o que aumentaria a possibilidade de danos à célula destes animais. Os animais de AC estariam em melhores condições, uma vez que a atividade da GST manteve-se mais elevada, em relação aos níveis de CYP1A, comparativamente aos animais coletados na BG.

- Os animais coletados em AC, de modo geral apresentaram uma maior capacidade de defesas antioxidantes em comparação aos coletados na BG. No entanto, não se sabe ao certo se os parâmetros biológicos (idade, sexo e estágio de maturação gonadal) destes animais

estariam interferindo no padrão de respostas das enzimas antioxidantes, uma vez que algumas diferenças com relação a esses parâmetros foram observadas entre os animais analisados.

- Os peixes da espécie *M. furnieri* coletados na BG e em AR no ano de 2001 apresentaram uma maior expressão da CYP1A em comparação aos coletados no ano anterior e aos coletados no mesmo ano nos demais locais, sendo semelhantes aos encontrados por alguns autores em peixes coletados em outros locais contaminados. Os demais animais coletados, com exceção dos provenientes de SS no ano de 2000, também apresentaram níveis detectáveis desta proteína, o que indica que também foram expostos a contaminantes do tipo agonistas do receptor Ah.

- Houve uma relação inversa entre a expressão da CYP1A e a atividade da GST nas corvinas oriundos da BG e AR na coleta de 2000, onde observou-se uma diminuição da expressão da proteína CYP1A e um aumento na atividade da GST. Com base nisso, pode-se sugerir que houve uma menor produção de metabólitos da Fase I que estariam sendo mais eficientemente conjugados pela GST aumentando a eficiência de excreção destes produtos nos animais de AR. O contrário foi observado nos animais coletados no ano seguinte, onde se observou uma elevada expressão da CYP1A e uma diminuição da atividade da GST, que poderia estar associada à diminuição do “pool” citosólico de GSH, co-substrato desta enzima, relatando desta forma uma condição de estresse oxidativo hepático, comumente observada em peixes de regiões contaminadas.

- De modo geral, os peixes da espécie *M. furnieri* coletados nos diferentes locais no ano de 2001, apresentaram uma maior capacidade de defesa antioxidante. No entanto não se sabe se fatores físicos, com por exemplo, a temperatura da água onde estes animais foram coletados poderia influenciar na resposta destas enzimas, uma vez que neste ano foram encontradas as menores temperaturas.

- Os dados apresentados para as duas espécies de peixes analisadas mostraram algumas variações na expressão e/ou atividade de biomarcadores bioquímicos no litoral Sudeste, que possivelmente estavam associadas a um maior ou menor grau de exposição a contaminantes no ambiente. Apesar de haver muito pouco estudo com biomarcadores em nossa zona costeira, sendo esse um trabalho pioneiro nesta área em nosso país, propomos que estudos futuros incluam a análise destes parâmetros aliados à determinação quali-quantitativa dos principais compostos tóxicos nos animais presentes no ambiente.

BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS

AAS, E.; BAUSSANT, T.; BALK, L.; LIEWENBORG, B. & ANDERSEN, O. K. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquat. Toxicol.** v. 51, p. 241-258, 2000.

ACETO, A.; AMICARELLI, F.; SACCHETTA, P.; DRAGANI, B.; BUCCIARELLI, T.; MASCIOCO, L.; MIRANDA, M. & DI ILIO, C. Developmental aspects of detoxifying enzymes in fish (*Salmo iridaeus*). **Free Rad. Res.** v. 21, p. 285-294, 1994.

ADAMS, S. M.; SHEPARD, K. L.; GREELEY, M. S. JR.; RYON, M. G.; SHUGART, L. R.; & MCCARTHY, J. F. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Mar. Environ. Res.** v. 28, p. 459-464, 1989.

ADDISON, R. F. & EDWARDS, A. J. Hepatic microsomal mono-oxygenase activity in flounder *Platichthys flesus* from polluted sites in Langesundfjord and from mesocosms experimentally dosed with diesel oil and copper. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 46, p. 51-54, 1988.

ADDISON, R. F., WILLIS, D. E. & ZINCK, M. E. Liver microsomal mono-oxygenase induction in Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from a gradient of sediment PAH concentrations at Sydney Harbour, Nova Scotia. **Mar. Environ. Res.** v. 37, p. 283-296, 1994.

AEBI, H. Catalase. In: **Methods of enzymatic analysis**. London: Academic Press. v. 105, p. 121-126, 1984.

AGENDA 21. **Relatório da 2ª Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Desenvolvimento**. Capítulo 17: Proteção dos oceanos, de todos os tipos de mares - inclusive mares fechados e semi-fechados - e das zonas costeiras, e proteção, uso racional e desenvolvimento de seus recursos vivos. Rio de Janeiro, 1992.

AL-ARABI, S. A. M. & GOKSØYR, A. Cytochrome P4501A responses in two tropical fish, riverine catfish (*Rita rita*) and marine mudfish (*Apocryptes bato*). **Comp. Biochem. Physiol. Part C.** v. 131, p. 61-71, 2002.

BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M. & JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquat. Toxicol.** v. 34(2), p. 151-162, 1996.

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

BEYER, J. & GOKØYR, A. Cytochrome P450 observations in Gulf fish. **Mar. Poll. Bull.** v. 27, p. 293-296, 1993.

BURGEOT, T.; BOCQUÉNÉ, G.; PORTE, C.; DIMMET, J.; SANTELLA, R. M.; GARCIA DE LA PARRA, L. M.; PFHOL-LESZKOWICZ, A; RAOUX, C. & GALGANI, F. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 131, p. 125-141, 1996.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** v. 25, p. 201-268, 1995.

BUHLER, D. R. & WANG-BUHLER, J. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 121C, p. 107-137, 1998.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. & VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environment of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci. Tot. Environ.** v. 247, p. 295-311, 2000.

CAS – Chemical Abstract Services – A division of the American Chemical Society. USA., 2003. Disponível em: <http://www.cas.org>. Acesso em: Março de 2003.

CARVALHO-FILHO, A. **Peixes da costa brasileira**. 1nd Edição, Editora Marca D'Água Ltda. São Paulo, SP. p. 304, 1994.

CHEN, C.; LIU, M. C.; SHIH, M. L.; YU, S.; YEH, C.; LEE, S. T.; YANG, T. & HUNG, S. Microsomal monooxygenase activity in *Tilapia (Oreochromis mossambicus)* exposed to a bleached kraft mill effluent using different exposure systems. **Chemosph.** v. 45, p. 581-588, 2001.

COLLIER, T. K.; COONNOR, D.; EBERHART, B. T. L.; ANULACION, B. F.; GOKSØYR, A. & VARANASI, U. Using cytochrome P450 to monitor the aquatic environment: results regional and national surveys. **Mar. Environ. Res.** v 34, p 195-202, 1992.

COSTA, M.; PAIVA, E. & MOREIRA, I. Total mercury in *Perna perna* mussels from Guanabara Bay – 10 years later. **Scien. Tot. Environ.** v. 261, p. 69-73, 2000.

COUSINOU, M.; NILSEN, B.; LÓPES-BAREA, J. & DORATO, G. New methods to use fish cytochrome 1A to assess marine organic pollutants. **Sci. Tot. Environ.** v. 247, p. 213-225, 2000.

DE CAPRIO, A. P. Biomarkers: coming age for environmental health and risk assessment. Critical review. **Environ. Sci. Technol.** v. 31, p.1837-1848, 1997.

DE FLORA, S.; BAGNASCO, M. & ZÁNACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutat. Res.** v. 258, p. 285-320, 1991.

DI GIULIO, R. T.; WASSHBURN, P. T.; WENNING, R. J.; WINSTON G. W. & JEWELL, C. S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 8, p. 1103-1123, 1989.

FEEMA. **Qualidade das águas da Baía da Guanabara.** Programa de despoluição da Baía da Guanabara – Programas Ambientais Complementares, 1998.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicol. Lett.** v. 140-141, p. 353-365, 2003.

FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil: I Introdução . Cações, raias e quimeras.** 1nd Edição. Editora da Universidade de São Paulo, SP. p. 104, 1977.

FITZPATRICK, P. J. & SHEEHAN, D. Separation o multiple forms of glutathione S-transferase from the Blue Mussel *Mytilus edulis*. **Biochem. J.** v. 23, p. 851-861, 1993.

FITZPATRICK, P. J.; O'HALLORAN, J. SHEEHAN, D. & WALSH, A . R. Assesment of a glutathione S-transferase and related protein in the gill and digestive gland of *Mutius edulis* (L.), as a potential organic pollution biomarkers. **Biomol.** v, 2, p. 51–56, 1997.

FÖRLIN, L. & CELANDER, R. Induction of cytochrome P4501A in teleosts: environmental monitoring in Swedish fresh, brackish and marine waters. **Aquat. Toxicol.**, v 26, p 41-56, 1993.

GABARDO, I. T.; MENICOMI, M. F. G. & FALCÃO, L. V. Hydrocarbon and ecotoxicity in seawater and sediment samples of Ganabara Bay after the oil spill in January 2000. **International Oil Spill Conference.** Tampa, Florida. EUA, March 26-29, 2001.

GOKSØYR, A. & FÖRLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquat. Toxicol.** v. 22, p. 287-312, 1992.

GOUVEA, V.; SANTOS, N. & TIEMENETSKY, M. C. Identification of norwalk virus in artificially seeded shellfihs and selected foods. **J. Virol. Meth.** v. 48, p. 177-187, 1994.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J. Lab. Clin. Med.** v. 107, p 401- 404, 1986.

HENSON, K. L.; SHEEHY, K. M. & GALLANGHER. E. R. Conservation of a glutathione S-transferase in marine and freshwater fish. **Mar. Environ. Res.** v. 50, p. 17-21, 2000.

HODGSON, E. & LEVI, P. E. **Introduction to biochemical toxicology**. 2nd Edition, Appleton & Lange Copyright. Norwalk, Connecticut - USA. p. 588, 1994.

HOLDWAY, D. A.; BRENNAN, S. E. & AHOKAS, J. T. Use of hepatic MFO and blood enzyme biomarkers in sand flathead (*Platycephalus bassensis*) as indicators of pollution in Port Phillip Bay, Australia. **Mar. Poll. Bull.** v. 28(11), p. 683-695, 1994.

HONG, J. Y. & YANG, C. S. Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity. **Environ. Health Perspect.** v. 105, p. 759-762, 1997.

HUGGETT, R. J.; KIMERLE, K. A.; MEHRLE JR., P. M. & BERGMAN, H. L. Eds. - **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of anthropogenic stress**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 347, 1992.

ENGLISH, G. J. & KROSS, J. E. - Evidence for systemic changes in the benthic fauna of tropical estuaries as a result of urbanization. **Mar. Pollut. Bull.** v. 41, p. 367-376, 2000.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**. 1st Edition, Ed: Oxford University Press, New York - USA. p. 209, 1997.

KAPPUS, H. Oxidative stress in chemical toxicity. **Arch. Toxicol.** v. 60, p. 144-149, 1987.

KAREZ, C. S.; MAGALHÃES, V. F.; PFEIFFER, W. C. & FILHO, G. M. A. Trace metal accumulation by algae in Sepetiba Bay, Brazil. **Environ. Poll.** v. 83, p. 351-356, 1994.

KEELING, P. L. & SMITH, L. L. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. **Biochem. Pharmacol.** v. 31, p. 3243-3249, 1982.

KEHRING, H. A.; MALM, O. & MOREIRA, I. Mercury in widely fish *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) from four main Brazilian estuaries. **Sci. Tot. Environ.** v. 213, p. 263-271, 1998.

KLOEPPER-SAMS, P. J. & STEGEMAN, J. J. Turnover of hepatic microsomal cytochrome P4501A protein and heme in β -naphthoflavone-induced *Fundulus heteroclitus*. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.** v. 3(3), p. 171-183, 1994.

KURELEC, B.; SMITAL, T.; PIVČEVIĆ, B.; EUFEMIA, N. & EPEL, D. – Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. **Ecotoxicol.** v. 9, p. 307-327, 2000.

LIMA JÚNIOR, R. G.; ARAÚJO, F. G.; MAIA, M. F. & PINTO, A. S. S. B. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. **Environ. Res.** v. 89A, p. 171-179, 2002.

LINDSTRÖM-SEPPÄ, P.; FARMANFARMAIAN, L. & STEGEMAN, J. J. A visual test for hepatic EROD activity as a marker for exposure to aromatic and halogenated aromatic hydrocarbons. **Chemosph.** v. 27, p. 2183-2195, 1993.

LIVINGSTONE, D. R.; LEMAIRE, P.; MATTHEWS, A.; PETERS, L.; BUCKE, D. & LAW, R. J. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresoufin *O*-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. **Mar. Poll. Bull.** v. 26(11), p. 602-606, 1993.

LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol. Part.** v. 120, p. 43-49, 1998.

LÓPEZ-BAREA, J. & PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutat. Res.** v. 399, n. 1, p. 3-15, 1998.

LUOMA, S. N. – The developing framework of marine ecotoxicology: Pollutants as a variable in marine ecosystems? **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** v. 200, p. 29-55, 1996.

MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MDC/MMA Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União. Ministério do Meio Ambiente dos recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Sony Music-CD Room.** 1996.

MENEZES, N. A. & FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do litoral sudeste do Brasil: IV -Teleostei (3).** 2nd Edição. Editora da Universidade de São Paulo, SP, p. 96, 1980.

MENICOMI, M. F. G.; SANTOS, A. F.; SALMITO, T. M. V.; ROMÃO, C. M.; MOREIRA, I. M.N. S.; SCOFIELD, A. L.; AZEVEDO, L. A. C. & MACHADO, G. A. W. C. Fisheries safety monitoring in the Guanabara Bay, Brazil, following a marine fuel oil spill. **International Oil Spill Conference.** Tampa, Florida. EUA, March 26-29, 2001.

MILLER, H. C.; MILLS, G. N.; BEMBO, D. G.; MACDONALD, J. A. & EVANS, C. W. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchii* as an of environmental pollution in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. **Aquat. Toxicol.** v. 44, p. 183-193, 1999.

MILLER, K. A.; ADDISON, R. F. & BANDIERA, S. M. Hepatic CYP1A levels and EROD activity in English sole: biomonitoring of marine contaminants in Vancouver Harbour. **Mar. Environ. Res.** v. 57, p. 37-54, 2003.

MIRANDA, C. L.; SCHOOR, W. P.; ZHAO, X.; HENDERSON, M. C.; REED, R. L. & BUHLER, D. R. Immunological and biochemical characterization of cytochrome P450 in mullet (*Mugil cephalus*): comparison with rainbow trout P450s. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 109C, p. 27-35, 1994.

MONOSSON, E. & STEGEMAN, J.J. Induced cytochrome P4501A in Winter Flounder, *Pleuronectes americanus*, from offshore and coastal sites. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 51, p. 933-941, 1994.

MORAES, R. B. C. Estudos sobre poluição marinha: importância e perspectivas. In: **Efeitos de poluentes em organismos marinhos**. São Paulo, 2001, v. 1, p. 9-11.

MOSSE, P.R.L., BRUMLEY, C.M., AHOKAS, J.T., HOLDWAY, D.A. A preliminary investigation into the use of biomarkers for the monitoring of an ocean outfall. **Environ. Toxicol. Water Qual.** v. 11, p.113-119, 1996.

NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S. & DATTA, A. G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Mar. Environ. Res.** v. 52, p. 13-26, 2001.

ØSTBY, L. & KRØROKJE, A. Cytochrome P450 (CYP1A) induction and DNA adducts in a rat hepatoma cell line (Fao), exposed to environmentally relevant concentrations of organic compounds, singly and in combinations. **Environ. Toxicol. Pharm.** v. 12, p. 15-26, 2002.

OTTO, D. M. E. & MOON, T. W. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 31, p. 141-147, 1996.

PATIN, S. A. Introduction. In: **Pollution and the biological resources of the oceans**. Mansell Bookbinders Ltd. Ed. Patin, S.A. Witham, Essex, 1982.

PEDREJAS, J. R.; PEINADO, J. & LÓPEZ-BAREA, J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. **Chem. Biol. Interac.** v. 98, p. 267-282, 1995.

PELLERIN-MASSICOTE, J. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. **J. Aquat. Eco. Helth.** v. 3, p.101-111. 1994.

PESSANHA, A. L. M. & ARAÚJO, F. G. Spatial, temporal and diel variations of fish assemblages at two sandy beaches in the Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Est. Coast. Shelf Sci.** v. 57, p. 817-828, 2003.

RATTNER, B. A.; MELNLCON, M. J.; CUSTER, T. W.; HOTHEM, R. L.; KING, K. A.; LE CAPTAIN, L. J.; SPANN, J. W.; WOODIN, B. R. & STEGEMAN, J. J. Biomonitoring environmental contamination with pipping black-crowned night heron embryos: induction of Cytochrome P450. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 12, p. 1719-1732, 1993.

REED, D. J. Regulation of reductive processes by glutathione. **Biochem. Pharmacol.** v. 35, p. 7-13, 1994.

REGOLI, F.; PELLEGRINI, D.; WINSTON, G. W.; GORBI, S.; GIULIANI, S.; VIRNO-LAMBERTI, C. & BOMPADRE, S. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged material in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Mar. Poll. Bull.** v. 44, p. 912-922, 2002.

REZENDE, C. E. & LACERDA, L. D. Metais pesados em mexilhões (*Perna perna* L.) no litoral do estado do Rio de Janeiro. **Ver. Brasil. Biol.** v. 46(1), p. 239-247, 1986.

RICE, C. D. & SCHLENK. Immune function and cytochrome P4501A activity after acute exposure to 3, 3', 4, 4',5-pentaclorobiphenyl (PCB 126) in channel catfish. **Jour. Aquat. Anim. Health.** v. 7, p. 195-204, 1995.

ROSA, R. O.; AGUIAR, T. C.; MAGNAGO, A. A.; COSTA, R. C. R.; PEREIRA, R. F.; OLIVEIRA, R. R. B. & BARRUCHO, R. C. N.. Diagnóstico Ambiental do Litoral de Santa Catarina, Projeto Gerenciamento Costeiro. Integração dos Domínios Natureza e Sociedade - Relatório Final, Setores 1 e 2. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)-Secretaria de Estado do Desenvolvimento Econômico e Integração ao MERCOSUL - SDE/SC. Julho/1997.

SCHLEZINGER, J. J. & STEGEMAN, J. J. Induction and suppression of cytochrome P450 1A by 3,3,4,4',5-pentachlorobiphenyl and its relationship to oxidative stress in the marine fish scup (*Stenotomus chrysops*). **Aquat. Toxicol.** v. 52, p. 101-115, 2001.

SHUGART, L. R. Biological monitoring. In: RENZONI, A.; MATTER, N.; LARI, L.; FOSSI, M. C. (eds.). **Contaminants in the environment: a multidisciplinary assessment of risks to man and other organisms.** Lewis Publishers, p. 29-36, 1994.

SIES, H.; STAHL, W. & SUNDQUIST, A. R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 69, p. 7-20, 1992.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, A. M. F.; LEMAS, V. R. R.; BARRETO, H. H. C.; OLIVEIRA, E. S.; DE ALLELUIA, I. B. & PAUMGARTEN, F. J. R. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in edible fish species and dolphins from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 70, p. 1151-1157, 2003.

SNYDER, M. J. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. **Aquat. Toxicol.** v. 48, p. 529-547, 2000.

SO, C. L. Environmental pollution of estuaries - a problem of hazard. **Environ. Conserv.** v. 5 (3), p. 205-211, 1978.

SOLÉ, M.; PORTE, C.; BIOSCA, X.; MITCHELMORES, C. L.; CHIPMAN, J. K.; LIVINGSTONE, D. R. & ALBAIGES, J. Effects of the "Aegean Sea" oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 113(C), p. 257-265, 1996.

SPIES, R. B.; STEGEMAN, J. J.; HINTON, D. E.; WOODIN, B.; SMOLOWITZ, R.; OKIHIRO, M. & SHEA, D. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embryonic fishes

from a natural petroleum seep in the Santa Barbara channel. **Aquat. Toxicol.**, v. 34, p. 195-219, 1996.

STEGEMAN, J. J.; KLOPPER-SAMS, P. J. & FARRINGTON, J. W. Monooxygenase induction and chlorobiphenyls in the deep-sea fish. **Coryph. Armat. Scien.** v. 231, p. 1287-1289, 1986.

STEGEMAN, J. J.; TENG, F. Y. & SNOWBERGER, E. Induced cytochrome P450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 44, p. 1270-127, 1987.

STEGEMAN, J. J.; WOODIN, B. R. & SMOLOWITZ, R. M. Structure, function and regulation of cytochrome P450 in fish. **Bioch. Soc. Transac.** v. 18, p. 19-21, 1990.

STEGEMAN, J. J. & LECH, J. J. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environ. Health Perspect.** v. 90, p. 101-109, 1991.

STEGEMAN, J. J.; BROWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÓRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M. & VAN VELD, P. A. Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: **Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress.** HUGGETT, R.J., KIMERLE, R.A., MEHRLE JR., P.P. & BERGMAN, H .L. Eds. Lewis Publishers. Chelsea, MI, USA, p. 235-335, 1992.

STEGEMAN, JOHN. J. **Cytochrome P450 form in fish.** In: SCHENKMAN, J. B.; GREIM, H. (Eds), Handbook of Experimental Pharmacology. v, 105. Springer, Berlin, p. 279-291, 1993.

STEPHENSEN, E.; SVAVARSSON, J.; STURVE, J.; ERICSON, G.; ADOLFSSON-ERICI, I. M. & FÓRLIN, L. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. **Aquat. Toxicol.** v. 48, p. 431-442, 2000.

TANIGUCHI, S. **Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do estado do Rio de Janeiro.** 2001.160f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências – Área de Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

TERAMITSU, I.; YAMAMOTO, Y.; CHIBA, I.; IWATA, H.; TANABE, S.; FUJISE, Y.; KAZUSAKA, A.; AKAHORI, F. & FUJITA, S. Identification of novel cytochrome P450 1A genes from five marine mammal species. **Aquat. Toxicol.** v. 51, p. 145-153, 2000.

TIMBREL, J. A. **Principles of biochemical toxicology.** TIMBREL, J. A., Ed., Taylor & Francis, Londres. p. 415, 1991.

TOMASI, L. R. A riqueza finita dos oceanos. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 141, p.6-9, Agosto de 1998. Entrevista.

TORRES, M. A.; ALMEIDA, E. E.; MEZZARI, M. P.; SILVA, D. W.; MARQUES, M. R. F. & BAINY, A. C. D. Análise de biomarcadores bioquímicos de contaminação ambiental em peixes da região de Arraial do Cabo - RJ. In: **VII CONGRESSO LATINO AMERICANO SOBRE CIÊNCIAS DO MAR, SP.** Resumos Expandidos, v. 2, p. 498-499, 1997.

VAN DER AAR., E. M.; BUIKEMA, D.; COMMANDEUR, J. N. M.; KOPPELE, J. M.; VAN OMMEN, B.; VAN BLADEREN, P. J. & VERMEULEN, N. P. E. Enzyme kinetics and substrate selectivities of rat glutathione *S*-transferase isoenzymes towards a series of new 2-substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes. **Xenobiot.** v. 26, p. 143-155, 1996.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J. & VERMEULEN. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 13, p. 57-149, 2003.

VROLIJK, N. J.; TARGETT, N. & GERHART, D. J. Biochemical and molecular characterization of cytochrome P450 in the estuarine pinfish *Lagodon rhomboides*. **Envir.** v. 5, p. 5-7, 1994.

XAVIER DE BRITO, A. P.; BRÜNING, I. M. R. A. & MOREIRA, I. Chlorinated pesticides in mussels from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Mar. Poll. Bull.** v. 44, p. 71-81, 2002.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. & PEAKAL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. School of Animal and Microbial Science, University of Reading Taylor & Francis Ltd, London, p. 321, 1996.

WANDERS, R. J. A. & DENIS, S. Identification of superoxide in rat liver peroxisomes. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 1115, p. 259-262, 1992.

WEBER, L. P.; DIAMOND, S. L.; BANDIERA, S. M. & JANZ, D. M. Expression of HSP70 and CYP1A protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout exposed to β -naphthoflavone. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 131, p. 387-394, 2002.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses – a comparative approach. **Braz. J. Med. Res.** v. 29, p. 1735-1742, 1996.

WILSON, J. Y.; KRUYNSKI, G. M. & ADDISON, R. F. Experimental exposure of juvenile chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) to bleached kraft mill effluent: hepatic CYP1A induction is correlated with DNA adducts but not with organochlorine residues. **Aquat. Toxicol.** v. 53, p. 49-63, 2001.

WINSTON, G. W.; LIVINGSTONE, D. R. & LIPS, F. Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel *Mytilus edulis* L. **J. Exper. Zool.** v. 255, p. 296-308, 1990.

ZANARDI, E.; BÍCEGO, M. C.; MIRANDA, L. B. & WEBER, R. R. Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. **Mar. Poll. Bull.** v. 38, p. 261-267, 1999.