

**RESPOSTAS DO SISTEMA DE DETOXIFICAÇÃO
E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES CELULARES
EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
EXPOSTAS A AMBIENTES CONTAMINADOS EM
JOINVILLE, SC**

Samira Flesch



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**RESPOSTAS DO SISTEMA DE DETOXIFICAÇÃO E DAS
DEFESAS ANTIOXIDANTES CELULARES EM TILÁPIAS DO
NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS A AMBIENTES
CONTAMINADOS EM JOINVILLE, SC**

Samira Flesch

Dissertação submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Belló Klein

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

F611r Flesch, Samira

Respostas do sistema de detoxificação e das defesas antioxidantes celulares em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a ambientes contaminados em Joinville, SC [dissertação] / Samira Flesch ; orientador, Alcir Luiz Dafre. - Florianópolis, SC 2011.

139 p.: il., grafs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Inclui referências

1. Citocromo. 2. Estresse Oxidativo. 3. Glutaciona. 4. Ecotoxicologia. 5. Marcadores biológicos - Joinville (SC). 6. Tilápia (Peixe). I. Dafre, Alcir Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

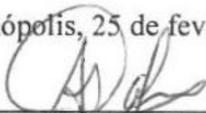
CDU 57

Samira Flesch

**RESPOSTAS DO SISTEMA DE DETOXIFICAÇÃO E DAS
DEFESAS ANTIOXIDANTES CELULARES EM TILÁPIAS DO
NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS A AMBIENTES
CONTAMINADOS EM JOINVILLE, SC**

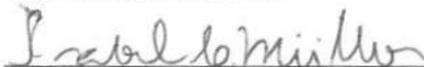
Dissertação julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”, e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas.

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2011

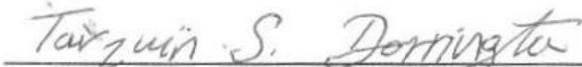


Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre
Presidente / Orientador

Banca Examinadora:



Dr.^a Isabel Cristina Müller (UFSC)



Dr. Tarquin Stephen Dorrington (UFSC)

Prof.^a Dr.^a Andreza Fabro de Bem (UFSC)



Prof.^a Dr.^a Cilene Lino de Oliveira

Coordenadora do Programa Multicêntrico de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas - UFSC

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de mais uma etapa de evolução.

A meu pai e minha mãe pela educação e exemplo de vida e união.

Aos meus irmãos, por todas as brigas, beliscões e gargalhadas.

Ao Eduardo, pelo amor e companheirismo dedicados durante todo o meu trabalho, ouvindo minhas reclamações todos os dias, inclusive do outro lado do mundo.

A Vera, seu Chico, Janize, Claudiomar e Júlia, por todo apoio e por se tornarem parte da minha família.

Enfim, a minha família, por fornecerem a base da minha existência e me apoiarem em cada passo da minha vida.

Ao professor Alcir Luiz Dafre, pela orientação, amizade e paciência oferecidas durante todo o período do mestrado, proporcionando todas as condições para meu crescimento profissional e para a confecção deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Defesas Celulares, Marcela, Trevisa, Péricles, Luiz, Daiane, Mari, Dani, Ariana, Betina, Anderson, pela ajuda essencial desde a minha chegada no laboratório, me auxiliando na aprendizagem das técnicas, até a conclusão do meu trabalho. E por todos os momentos de conversa, festas e descontração dentro e fora do laboratório.

A Marcela, pela amizade e carinho construídos durante estes 2 anos.

A Lila e Jacó, pela ajuda essencial durante os experimentos e por todos os momentos e conversas divertidas.

A todos os corajosos que foram envolvidos nas 4 etapas de trabalho de campo, 2 em 2009 e 2 em 2010: Alcir, Jacó, Trevisa, Marcela, Lila, Mari, Naissa, Juliano, Mari, Eliza, Klei, pelas várias horas de trabalho braçal e pelas boas conversas no café colonial de Joinville.

A Lila, Trevisa, Marcela, Naissa, Jacó, pelas várias horas dedicadas aos experimentos deste trabalho, dia, noite, finais de semana, dentro e fora do laboratório.

A Daiane, por ter me acolhido nesta última fase do mestrado, aturado com muita paciência o meu mau humor e por ser minha melhor companheira de TV.

A Fundação municipal 25 de Julho e a Roberto Hoppe, pelo fornecimento dos animais e de toda a estrutura para a realização dos experimentos.

Ao professor Afonso Bairy, pela parceria neste trabalho e por disponibilizar seus alunos e seu laboratório durante os experimentos.

Ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, especialmente a Satie Taniguchi, pelas análises químicas das amostras.

Ao Parque Integrado de Esportes, Lazer e Cultura Ltda - Kartódromo Internacional de Joinville, SC, por disponibilizarem o kartódromo para a realização dos experimentos, nos oferecendo livre acesso durante todos os anos de experimento.

A seu Flávio e ao casal de senhores que permitiram nossa entrada em suas propriedades e tornaram mais fácil a realização dos experimentos.

A meus amigos, pelo apoio e todos os bons momentos vividos.

Aos apoios financeiros que permitiram a realização deste trabalho: CAPES, CNPq, FAPESC.

Enfim, a todos que de alguma maneira estiveram envolvidos na realização deste trabalho.

RESUMO

As defesas antioxidantes e os sistemas de detoxificação podem ser modulados frente a contaminantes ambientais, dependendo do tempo e da intensidade da exposição, podendo levar a danos oxidativos. O objetivo deste trabalho é avaliar a resposta antioxidante e de adaptação celular de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a ambientes contaminados na Bacia do Rio Cubatão do Norte, Joinville, SC, principal pólo industrial de Santa Catarina. O estudo foi desenvolvido em outubro de 2009 e de 2010, onde as tilápias (<2 g/L, grupos de 10) foram expostas em gaiolas (1,2x1,0x0,8 m) por 2 ou 7 dias em três diferentes pontos (S1, S2 e S3) da Bacia do Rio Cubatão do Norte, sendo o grupo referência (REF) uma fazenda de cultivo. Os dados representam a média \pm E.P.M. As análises no sedimento mostraram a presença de contaminantes de origem antrópica, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), alquilbenzeno lineares e esteróis. O nível de contaminantes obedece a seguinte ordem: S2>S3>S1=REF. Os níveis de HPAs e biliverdina na bile, de HPAs no sedimento, a atividade 7-etoxi-resorufina-O-desetilase (EROD) e a expressão do citocromo P450 1A (CYP1A), mostraram uma correlação positiva entre si. A elevação dos níveis de metabólitos de HPAs na bile indica um aumento na capacidade de metabolização e eliminação destes compostos. A maior metabolização poderia ser explicada pela indução da atividade da EROD associada ao aumento da expressão de CYP1A, especialmente no ponto S2. O decréscimo nos níveis de tióis do fígado e sangue, bem como, o aumento dos danos ao DNA indicam que após 2 dias de exposição houve aumento nos índices de estresse oxidativo nos animais dos 3 pontos de estudo, o que foi corroborado pelo aumento da clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1, 7 dias, S2). A restauração parcial do estado tiólico e de vários outros parâmetros, além da reversão nos danos ao DNA e a indução de peroxirredoxina 6 (Prx6, S2), indicam que houve uma resposta adaptativa aos 7 dias de exposição. As atividades tioredoxina redutase (TrxR, 2 dias), glutathiona redutase (GR, 7 dias) e colinesterásica (2 dias) diminuíram no ponto S1. Em 2009, as maiores alterações foram encontradas após 2 dias de exposição e relacionadas à depleção de grupos tióis, enquanto que as alterações enzimáticas aconteceram predominantemente em 2010, sugerindo uma diversidade de contaminantes e/ou de seu aporte. Este estudo mostrou que protocolos utilizando respostas antioxidantes, danos oxidativos e indução de CYP1A como biomarcadores de contaminação

aquática foram complementares e eficientes em discriminar o grau de contaminação entre os vários pontos de estudo. Os dados comprovam que animais que habitam a região da Bacia do Rio Cubatão do Norte estão expostos a contaminantes de origem antrópica e que estes têm ação negativa sobre os indivíduos, necessitando de medidas corretivas a curto e longo prazo.

Palavras-chave: citocromo P450, estresse oxidativo, glutathione, ecotoxicologia, biomarcadores, tilápia, Joinville.

ABSTRACT

Antioxidant defenses and detoxification systems may be modulated against environmental contaminants, depending on timing and intensity of exposure and may lead to oxidative damage. The aim of this study was to evaluate the antioxidant response and cellular adaptation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to contaminated environments at Cubatão Basin, Joinville, SC, the main industrial area of Santa Catarina. The study was performed in October for two consecutive years (2009 and 2010). Tilapias (<2 g / L, 10 groups) were exposed in cages (1,2 x1,0x0,8 m) for 2 or 7 days in 3 different sites (S1, S2 and S3) of Cubatão Basin, and the reference group (REF) at a fish farm. Data are expressed as the mean \pm SEM. The analysis in sediment showed contaminants of anthropogenic origin, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), linear alkylbenzene and sterols. A degree of contamination could be established: S2> S3> S1 = REF. The levels of PAHs and biliverdin in bile, PAHs in the sediment, 7-O-etoixiresorufina deetilase (EROD) activity and cytochrome P450 1A (CYP1A) expression presented good correlation. The high levels of PAH metabolites in bile indicates an increased ability to metabolize and dispose these compounds. The increased metabolization could be explained by the induction of EROD activity associated with increased CYP1A expression, especially at the site S2. The decrease in the levels of liver and blood thiols as well as an increase in DNA damage after 2 days of exposure are indicative of oxidative stress in animals from 3 studied sites, which is corroborated by the increased poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) cleavage (7 days, S2). The partial restoration of the thiol status and several other parameters, the reversal of DNA damage and peroxiredoxin 6 induction (Prx6, S2), indicate that there was an adaptive response after 7 days of exposure. The thioredoxin reductase (TrxR, 2 days), glutathione reductase (GR, 7 days) and cholinesterase (2 days) activities decreased at site S1. In the year 2009, most changes were found after 2 days of exposure and related to thiol status, whereas the enzyme changes occurred predominantly in 2010, suggesting a variety or diverse dosing of contaminants. This study showed that protocols using antioxidant responses, oxidative damage and CYP1A induction as biomarkers of aquatic contamination were complementary and efficient in discriminating the degree of contamination between the various sites of study. The data show that

animals living in the Cubatão Basin, Joinville, SC, are exposed to contaminants of anthropogenic origin, producing a negative influence on individuals which requires corrective measures at short and at long term.

Keywords: cytochrome P450, oxidative stress, glutathione, ecotoxicology, biomarkers, tilapia, Joinville.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas do metabolismo do oxigênio.....	22
Figura 2. Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	27
Figura 3. Biodisponibilidade e toxicidade dos poluentes.....	32
Figura 4. Área de estudo nos Rios Cubatão e do Braço em Joinville, SC.	39
Figura 5. Imagens representativas das amostras feitas nos ensaios do cometa.....	50
Figura 6. Cromatogramas das amostras de sedimentos.....	61
Figura 7. Níveis de biliverdina e metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, dados 2009.....	63
Figura 8. Atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) na fração microssomal do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.	64
Figura 9. Imunodeteção da isoforma 1A do citocromo P450 (CYP1A) na fração microssomal do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	65
Figura 10. Imunodeteção da isoforma 2B do citocromo P450 (CYP2B) na fração microssomal do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	66
Figura 11. Imunodeteção da isoforma 3A do citocromo P450 (CYP3A) na fração microssomal do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	67
Figura 12. Níveis de glutatona total (GSH-t) no fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.	70

Figura 13. Níveis de tióis não-protéicos (NPSH) no fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	71
Figura 14. Níveis de glutatona total (GSH-t) no sangue de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	72
Figura 15. Níveis de tióis plasmáticos (plasma-SH) de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	73
Figura 16. Atividade da enzima catalase (CAT) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.	75
Figura 17. Atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	76
Figura 18. Atividade da enzima glutatona redutase (GR) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	77
Figura 19. Atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	78
Figura 20. Atividade da enzima tioredoxina redutase (TrxR) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	79
Figura 21. Atividade da enzima glioxalase na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	80
Figura 22. Atividade da enzima glutatona S-transferase (GST) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	81
Figura 23. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no plasma de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	82
Figura 24. Atividade da enzima butirilcolinesterase (BuChE) no plasma de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	83

Figura 25. Imunodeteção da clivagem da proteína poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1) no fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, dados 2010.....	84
Figura 26. Imunodeteção da peroxirredoxina 6 (Prx6) no fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, dados 2010.....	85
Figura 27. Dano ao DNA estimado pelo teste cometa no sangue de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, dados 2010.....	86
Figura 28. Níveis de hemoglobina (Hb) no sangue de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperatura, pH e O ₂ dissolvido da água nos pontos de exposição das tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009 e 2010.....	55
Tabela 2. Peso, comprimento e peso do fígado e das gônadas de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009 e 2010.....	56
Tabela 3. Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de sedimento dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009.....	58
Tabela 4. Concentrações de contaminantes orgânicos em amostras de sedimento dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009.....	60
Tabela 5. Concentrações de contaminantes orgânicos em amostras fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas por 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009.....	62
Tabela 6. Matriz de correlação entre parâmetros analisados no fígado e na bile de tilápias Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas por 2 e 7 dias e os níveis de contaminantes orgânicos no fígado dos animais e no sedimento dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	68

LISTA DE BREVIATURAS DE SIGLAS

·OH – Radical hidroxil
 $^1\text{O}_2$ – Oxigênio *singlet*
4-HNE – 4-hidroxinonenal
AChE – Acetilcolinesterase
AHR – Receptor de hidrocarbonetos aromáticos
ARE – Elemento de resposta antioxidante
ATP – Trifosfato de adenosina
BSA – Albumina de soro bovino
BuChE – Butirilcolinesterase
CAT – Catalase
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CuOOH – Peróxido de cumeno
CYP1A – Citocromo P450, isoforma 1A
CYP2B – Citocromo P450, isoforma 2B
CYP3A – Citocromo P450, isoforma 3A
CYP450 – Citocromo P450
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DTNB – Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
DTT – Ditioneitol
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERN – Espécies reativas do nitrogênio
ERO – Espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive oxygen species)
EROD – 7-Etoxi-resorufina-O-deetilase (7-Ethoxyresorufin-O-deethylase)
G6P – Glicose-6-fosfato
G6PDH – Glicose 6-fosfato desidrogenase
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCL – Glutamato-cisteína ligase
GGT – γ -glutamil transpeptidase
GPx – Glutationa peroxidase
GR – Glutationa redutase
GS – Glutationa sintetase
GSH – Glutationa na forma tiólica ou reduzida
GSH-t – Glutationa total, compreendendo a soma de GSH + GSSG, apresentada com equivalentes de GSH
GSSG – Dissulfeto de glutaciona, ou glutaciona oxidada

GST – Glutathione S-transferase
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
Hb – Hemoglobina
HO – Heme oxigenases
HPA – Hidrocarboneto policíclico aromático (PAHs –Polycyclic aromatic hydrocarbons)
KPi – Tampão fosfato de potássio
LAB – Alquilbenzeno lineares (Linear alkylbenzene)
MDA – Malondialdeído
MeHg – Metil-mercúrio
MFO – Oxidases de funções múltiplas
NAD⁺ – Dinucleotídeo de nicotinamida adenina, forma oxidada
NADP⁺ – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma oxidada
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida
NO – Óxido nítrico
NPSH – Tióis não protéicos
Nrf2 – Fator 2 relacionado ao NF-E2
O₂⁻ – Ânion superóxido
OH⁻ – Ânion hidroxila
ONOO⁻ – Peroxinitrito
PARP1 – poli-(ADP-ribose)-polimerase 1
PBS – Salina tamponada com fosfato
PCA – Ácido perclórico
PCB – Bifenilas policloradas
PMSF – Fenil-metil-sulfunil-fluoreto
Prx – Peroxirredoxina
PSH – Tióis protéicos
REF – Ponto referência na estação de piscicultura da Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC
RO[•] – Radical alcoxil
ROO[•] – Radical peroxil
S1, S2 ou S3 – Pontos de exposição dos animais na Bacia do Rio Cubatão, Joinville, SC
SDS – Dodecil sulfato de sódio
-SH – Grupamento tiol
SOD – Superóxido dismutase
SOD-CuZn – Superóxido dismutase cobre-zinco
SOD-Mn – Superóxido dismutase manganês
TCA – Ácido tricloroacético

TNB – Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
Tris-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano
Trx-(SH)₂ – Tiorredoxina no estado reduzido
TrxR – Tiorredoxina redutase
Trx-S₂ – Tiorredoxina, forma disulfeto

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE BREVIATURAS DE SIGLAS	14
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes	21
1.1.1 <i>Espécies reativas de oxigênio (ERO)</i>	21
1.1.2 <i>Danos a biomoléculas</i>	23
1.1.3 <i>Defesas antioxidantes</i>	25
1.1.4 <i>Estresse oxidativo</i>	29
1.2 Metabolismo de xenobiontes.....	29
1.3 Contaminação ambiental	30
1.4 Biomarcadores	32
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Área de estudo.....	39
4.2 Animais	39
4.3 Exposição	40
4.4 Coleta	40
4.5 Preparação das amostras	41

4.6	Análise de tióis	42
4.6.1	Determinação dos níveis de glutatona total (GSH-t)	42
4.6.2	Determinação dos níveis de tióis plasmáticos e tióis não protéicos (NPSH) do fígado.....	42
4.7	Análises enzimáticas	43
4.7.1	Glutaciona redutase (GR)	43
4.7.2	Glutaciona peroxidase (GPx).....	43
4.7.3	Catalase (CAT).....	44
4.7.4	Glutaciona S-Transferase (GST).....	44
4.7.5	Tiorredoxina redutase (TrxR).....	45
4.7.6	Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	45
4.7.7	Glioxalase I.....	46
4.7.8	Acetilcolinesterase (AChE).....	46
4.7.9	Butirilcolinesterase (BuChE).....	47
4.7.10	7-Etoxi-resorufina O-Deetilase (EROD).....	47
4.8	Quantificação de proteínas e determinação dos níveis de hemoglobina (Hb).....	48
4.9	Avaliação de danos ao DNA pelo ensaio do cometa	48
4.10	Imunodeteccção	50
4.11	Determinação de biliverdina e níveis de metabólitos de HPAs na bile	52
4.12	Análise química	52
4.12.1	Determinação de compostos orgânicos	52
4.13	Análise estatística	54
5.	RESULTADOS.....	55
5.1	Parâmetros químicos e físicos da água nos pontos de exposição	55
5.2	Parâmetros biológicos.....	55

5.3 Determinação de compostos orgânicos no sedimento dos pontos de exposição e no fígado dos animais	56
5.3.1 HPA's no sedimento	57
5.3.2 PCBs no sedimento	57
5.3.3 Organoclorados no sedimento	57
5.3.4 LABs no sedimento	58
4.3.5 Hidrocarbonetos alifáticos no sedimento	58
5.3.6 Esteróis no sedimento	59
5.4 Análises de biliverdina e metabólitos de HPA's na bile.....	62
5.5 Imunodeteção das isoformas CYP1A, CYP2B e CYP3A e atividade enzimática da EROD	63
5.6 Correlação entre a atividade da EROD, expressão de CYP1A e contaminantes orgânicos	67
5.7 Análise de tióis.....	69
5.8 Análises enzimáticas	73
5.8.1 Atividades de enzimas antioxidantes.....	73
5.8.2 Atividade colinesterásica	81
5.9 Imunodeteção da Prx6 e da clivagem da proteína PARP1	83
5.10 Dano ao DNA estimado pelo teste cometa.....	85
5.11 Hemoglobina.....	86
6. DISCUSSÃO.....	88
6.1 Parâmetros químicos e físicos da água nos pontos de exposição	88
6.2 Parâmetros biológicos	88
6.3 Contaminação aquática e metabolismo de xenobiontes	89
6.3.1 LABs.....	89
6.3.2 Organoclorados	90
6.3.3 Esteróis	90

6.3.4 Hidrocarbonetos alifáticos	91
6.3.5 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).....	92
6.4 Biliverdina e HPAs na bile	93
6.5 Alterações na expressão de CYP450 e na atividade da EROD...	95
6.6 Correlação entre atividade da EROD, expressão de CYP1A e contaminantes orgânicos.....	97
6.7 Alterações no metabolismo de tióis	98
6.8 Alterações enzimáticas	100
6.8.1 Atividades de enzimas antioxidantes	100
6.8.2 Atividade colinesterásica.....	105
6.9 Danos ao DNA.....	106
6.10 Biomarcadores de contaminação aquática	107
7. CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS.....	112

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

1.1.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

O elemento oxigênio está distribuído como uma molécula diatômica (O_2) e ao contrário de algumas espécies anaeróbias ou aerotolerantes, muitos organismos requerem O_2 para uma produção eficiente de energia através da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria dos eucariotos ou na membrana celular de muitas bactérias. Esta necessidade de O_2 não diminui o fato de que este é um gás mutagênico e que seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas, tanto no meio intracelular como no meio extracelular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A molécula diatômica de oxigênio o qualifica como um radical livre (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A presença de radicais livres em sistemas biológicos foi descoberta a mais de cinco décadas e foi imediatamente relacionada a várias doenças e ao envelhecimento (HARMAN, 1956). Teorias pioneiras propuseram que os efeitos lesivos do O_2 são devidos a geração de substâncias tóxicas, que podem ser produzidas durante o transporte de elétrons na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, durante reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas, e são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o oxigênio *singlet* (1O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As ERO são produtos da redução parcial do O_2 molecular. Geralmente o O_2 sofre redução tetravalente na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria resultando na formação de água. Entretanto, a adição sequencial de um único elétron ao O_2 (redução univalente) gera o $O_2^{\cdot-}$, que é reduzido a H_2O_2 pela adição de um segundo elétron. Com a adição de um terceiro elétron ocorre a fissão heterolítica do H_2O_2 , gerando o ânion hidroxila (OH^-) e o $\cdot OH$. Este último, ao receber mais um elétron e um próton forma H_2O (Fig. 1) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

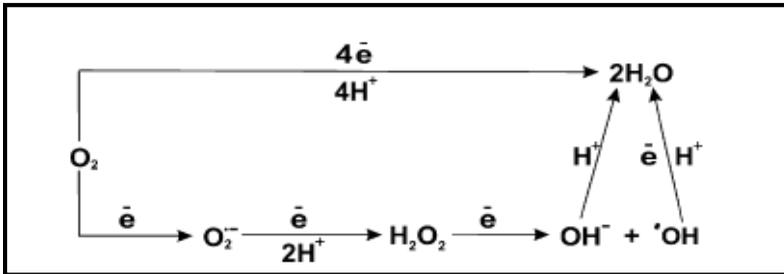


Figura 1. Rotas do metabolismo do oxigênio. A parte superior do esquema demonstra a redução tetraeletrônica do O_2 com formação de H_2O . A parte inferior mostra a sequência de redução unieletrônica, levando a uma formação de espécies reativas de oxigênio (ERO): radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\cdot OH$), finalizada pela redução do $\cdot OH$ e OH^- para H_2O (LUSHCHAK, 2010).

O uso do termo ERO não inclui somente radicais de O_2 , mas também alguns derivados não radicalares de O_2 , como o H_2O_2 . A reatividade também é um termo relativo, por exemplo, o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 são altamente seletivos em suas reações com moléculas biológicas, enquanto o $\cdot OH$ reage rapidamente com inúmeras moléculas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Estas características geram diferentes níveis de efeitos biológicos, dependendo da sua taxa e local de formação, ambiente e compartimento celular. Desta forma o termo radical livre acaba sendo designado para qualquer espécie capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, além de incluir outras espécies radicalares não derivadas do O_2 , como por exemplo, aquelas centradas em carbono e nitrogênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As reações entre ERO ou com outras moléculas, originam espécies reativas secundárias, como o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), denominado espécie reativa do nitrogênio (ERN), produzido a partir da combinação do óxido nítrico (NO) com o $O_2^{\cdot-}$ (JENSEN, 2003).

O $O_2^{\cdot-}$ não tem a capacidade de penetrar a membrana lipídica, mas pode migrar para o citosol através de canais aniônicos (WARNHOLTZ *et al.*, 2002). A formação do $O_2^{\cdot-}$ se dá espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial e na cadeia respiratória, sendo também produzido endogenamente por flavoenzimas, xantina oxidase, lipoxigenases e ciclooxigenases. O $O_2^{\cdot-}$ é rapidamente dismutado a H_2O_2 através da ação catalítica da enzima superóxido dismutase (SOD) (THANNICKAL e FANBURG, 2000). O H_2O_2 tem a capacidade de atravessar membranas biológicas e participa da formação de moléculas

mais reativas como o $\cdot\text{OH}$, um processo geralmente dependente da participação de metais de transição, como o Fe^{2+} por exemplo. O H_2O_2 atua também como molécula de sinalização intracelular (RHEE, 1999). O $\cdot\text{OH}$ é altamente reativo no sistema biológico, reagindo no próprio sítio onde foi formado, sendo que sua reação é limitada pela sua capacidade de difusão (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

Os organismos aeróbicos estão em contato permanente com uma grande variedade de oxidantes de diversas origens. Uma exposição a níveis elevados de oxidantes, ou uma capacidade reduzida de metabolizar estes agentes, podem resultar em danos aos constituintes celulares, no entanto, alterações moderadas na homeostase redox podem iniciar uma resposta que inclui o aumento na expressão de enzimas de proteção e reparo. Nesta situação, oxidantes endógenos agem como segundo mensageiros sinalizando para mudanças proliferativas ou metabólicas associadas, ativando ou desativando fatores de transcrição e canais de membranas e enzimas (WINTERBOURN e HAMPTON, 2008). As ERO são continuamente produzidas, e devido a sua atividade biológica e alta capacidade lesiva, o seu metabolismo esta sob um fino controle celular sendo que suas concentrações geralmente não excedem 10^{-8} M (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.1.2 Danos a biomoléculas

Os níveis das ERO e ERN mantêm-se estável durante o metabolismo normal, mas suas concentrações podem ficar acima de valores basais, especialmente durante condições patológicas ou quando o organismo é submetido a agentes estressores, tais como xenobiontes e radiações ionizantes. A interação das ERO com os constituintes celulares pode levar a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos oxidativos ao DNA (SIES, 1997).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação envolve a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados existentes nos fosfolipídios das membranas celulares, sendo estes os locais mais susceptíveis as reações de oxidação. Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonal (4-HNE) (GIROTTI, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O 4-HNE em níveis elevados (acima de $1 \mu\text{M}$) pode atuar em processos citotóxicos e genotóxicos, provocando danos mitocondriais e inibindo a ação de chaperonas, a síntese de DNA e de proteínas. Já o MDA pode atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH,

resultando em modificações de inúmeros resíduos de aminoácidos (especialmente lisina), também podendo reagir com bases de DNA (especialmente guanina) gerando lesões mutagênicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A oxidação de proteínas pode ser reversível ou irreversível, dependendo do alvo e da forma de dano oxidativo. Devido a alta reatividade do $\cdot\text{OH}$, ele exerce mais efeitos nocivos a proteínas, enquanto que o H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e NO ficam mais restritos aos ataques de grupos facilmente oxidáveis, como os grupamentos tiólicos. Todos os resíduos de aminoácidos podem ser oxidados por ERO, podendo também sofrer agregação e fragmentação, formando grupos carbonilas (REQUENA *et al.*, 1996; VALKO *et al.*, 2006; TRACHOOTHAM *et al.*, 2008).

A oxidação de proteínas e organelas celulares leva a formação de produtos como carbonilas e lipofuscinas. As lipofuscinas acumulam nos lisossomos como resultado da peroxidação de proteínas autofagocitadas, associadas com agregados de proteínas e organelas. Evidências indicam que as lipofuscinas se ligam ao ferro promovendo a geração de ERO, aumentando os danos oxidativos e inibindo a degradação protéica (MOORE, 1990; BRUNK & TERMAN, 2002). Desta forma, a autofagia incompleta leva a acumulação de organelas, proteínas, fosfolipídeos e lipídeos lesados e não-degradados que contribuem para a formação adicional de lipofuscinas (BRUNK & TERMAN, 2002; MOORE *et al.*, 2006). A autofagia incompleta tem sido relatada em moluscos, peixes e mamíferos expostos a xenobiontes (MARIGOMEZ & BAYBAY-VILLACORTA, 2003; ALLEN & MOORE, 2004; MOORE *et al.*, 2006).

Os danos mais graves relacionados as ERO são aqueles causados ao DNA. A ERO com maior capacidade de causar danos ao DNA é o $\cdot\text{OH}$. Ele tem a capacidade de adicionar ligações duplas nas bases heterocíclicas de DNA, assim como, de abstrair hidrogênio da base nitrogenada guanina e de cada um dos carbonos da desoxirribose. Uma vez que ocorre quebra na cadeia do DNA, a ordem de suas bases pode ser alterada e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear processos de carcinogênese. A cisão do anel desoxirribose dos ácidos nucléicos, pelas ERO, promove mutações e inibição da síntese protéica. As ERO estão envolvidas com processos de envelhecimento, carcinogênese, mutações e morte celular, através de alterações químicas, tanto nas bases nitrogenadas, na ribose do DNA e na quebra de suas ligações (TSUZUKI *et al.*, 2007; TRACHOOTHAM *et al.*, 2008).

As quebras na fita de DNA por agentes oxidantes são acompanhadas por uma resposta celular aguda com síntese de poli-(ADP-ribose) pela enzima poli-(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1). A PARP1 (113 kDa) é uma proteína nuclear ligada ao DNA que detecta quebras na fita do DNA (SHALL e DE MURCIA, 2000). A PARP1 liga-se rapidamente as quebras na fita de DNA e leva a formação de polímeros de poli-(ADP-ribose) usando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) como substrato, em seguida é dissociada do DNA, facilitando o processo de reparo do DNA (HERCEG e WANG, 2001).

1.1.3 Defesas antioxidantes

Sendo o O₂ uma molécula tóxica, os seres vivos, ao longo da evolução, desenvolveram mecanismos adaptativos que lhes permitiram coexistir com a exposição aos oxidantes. As defesas contra esses agentes envolvem diversos mecanismos, como os de prevenção e reparo. A célula possui uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério das ERO geradas pelo metabolismo aeróbico. Estas defesas são comumente chamadas de defesas antioxidantes e podem ser sintetizadas endogenamente ou adquiridas através da dieta (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo. Os organismos aeróbicos apresentam diferentes mecanismos, enzimáticos e não-enzimáticos, de defesa antioxidante, que podem evitar a formação das ERO, reagir com os intermediários reativos e também reparar os danos causados por ERO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As defesas antioxidantes podem ser induzidas, como também podem ser esgotadas frente a substâncias pró-oxidantes, dependendo do tempo e intensidade da exposição. Ao mesmo tempo, a alteração nestas defesas também está relacionada às diferentes classes de xenobiontes, diferenças de sensibilidade entre as espécies e a fatores ambientais e biológicos (WINSTON e DIGIULIO, 1991).

Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas estão a GSH (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), o ácido ascórbico (vitamina C) e antioxidantes lipossolúveis como o β -caroteno (vitamina B) e o α -tocoferol (vitamina E) (TRACHOOTHAM *et al.*, 2008), além de substâncias antioxidantes encontradas em vegetais, como flavonóides e carotenóides (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O tripeptídeo GSH é o principal tiol-não-protéico (NPSH) da maioria das células, presente em altas concentrações (1-10 mM). É sintetizado no citosol em dois passos que requerem ATP. Primeiro ocorre a formação da γ -glutamil-cisteína a partir do glutamato e da cisteína, através da atividade da glutamato-cisteína ligase (GCL), seguido da formação da GSH pela atividade da GSH sintetase (GS), que usa γ -glutamil-cisteína e glicina como substrato (MEISTER, 1994; MARI *et al.*, 2009). Devido à presença da cisteína em sua estrutura, a GSH é essencial na regulação de ligações dissulfeto de proteínas e na eliminação de agentes eletrofilicos e oxidantes (DELEVE e KAPLOWITZ, 1991). Esta função antioxidante da GSH é mediada pelo grupo tiol (-SH) reativo da cisteína, que confere a capacidade redutora da GSH. O grupamento -SH também pode ser encontrado em proteínas (PSH) ou em tióis de baixo peso molecular (NPSH), como a cisteína e a GSH (REISCHL *et al.*, 2007). A oxidação do grupamento -SH da GSH leva a formação da sua forma dissulfeto (GSSG) ou ácidos sulfênicos, sulfínico e sulfônico (SHELTON *et al.*, 2005).

Entre as defesas enzimáticas (Fig. 2) estão as enzimas SOD, catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O grupo de enzimas SOD constitui uma família de metaloenzimas que catalisam a conversão do O_2^- para H_2O_2 . Existem diferentes tipos de SOD que podem variar quanto a sua estrutura e localização. Nos eucariotos, existem duas formas de SOD que contêm cobre (Cu) e zinco (Zn) no seu sítio ativo (SOD-CuZn), sendo uma delas presente no citoplasma das células e a outra correspondendo à SOD extracelular, normalmente associada à superfície das células. A SOD localizada na mitocôndria contém íon Mn^{+3} no seu sítio ativo (SOD-Mn) e desempenha um papel central na regulação da concentração de O_2^- intra-mitocôndrial (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Na eliminação de peróxidos são duas as enzimas principais, a CAT e a GPx. A CAT tem como função dismutar o H_2O_2 em H_2O e O_2 (BAUD *et al.*, 2004), e está localizada em maior abundância em peroxissomos. A GPx está relacionada à função antioxidante da GSH com atividade peroxidásica contra H_2O_2 e peróxidos orgânicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). São conhecidas pelo menos 4 isoformas de GPx: GPx1, presente no citoplasma; GPx2 presente nas células gastro-intestinais; GPx3, presente no plasma e outros fluídos extracelulares; GPx4, responsável pela degradação de peróxidos derivados de ácidos graxos e colesterol, presente em baixas concentrações nos tecidos (HOU *et al.*, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

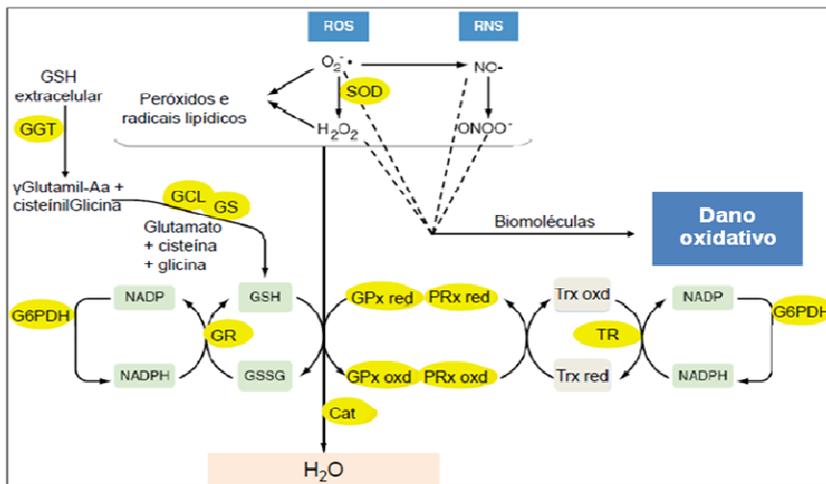


Figura 2. Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Legenda: $O_2^{\cdot -}$ - Ânion superóxido; NO - Óxido nítrico; ONOO $^{\cdot -}$ - peroxinitrito; H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio; SOD - Superóxido dismutase; GGT - γ -glutamil transpeptidase; GCL - γ -glutamil-cisteína ligase; GS - Glutaciona sintetase; G6PDH - Glicose-6 fosfato desidrogenase; GR - Glutaciona redutase; GPx red - Glutaciona peroxidase reduzida; GPx oxd - Glutaciona peroxidase oxidada; Prx red - Peroxirredoxina reduzida; Prx oxd - Peroxirredoxina oxidada; CAT - Catalase; GSH - Glutaciona reduzida; GSSG - Dissulfeto de glutaciona; NADP - Fosfato de nicotinamina adenina dinucleótido oxidado; NADPH - Fosfato de nicotinamina adenina dinucleótido reduzido; Trx oxd - Tiorredoxina oxidada; Trx red - Tiorredoxina reduzida; TR - Tiorredoxina redutase (Adaptado de KENSLER *et al.*, 2007).

Processos oxidativos celulares e a redução de peróxidos através da GPx geram o dissulfeto da glutaciona ou glutaciona oxidada (GSSG), que é substrato da enzima glutaciona redutase (GR). A GR transfere elétrons do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida (NADPH), para a GSSG, regenerando-a para GSH, mantendo alta a razão entre glutaciona reduzida e oxidada (GSH/GSSG), uma vez que evita a depleção da GSH e o aumento da GSSG. Desta forma a GR auxilia na manutenção do ambiente redutor intracelular (SIES e MOSS, 1978; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; MAULIK e DAS, 2008). A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) fornece potencial redutor (NADPH) as enzimas antioxidantes para regeneração de GSSG. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da GSH também fica afetada, pois a GSSG não pode ser

regenerada através da GR, causando alterações no metabolismo celular (HERMES-LIMA, 2004; GRANT, 2008).

Outra enzima envolvida no metabolismo da GSH é a γ -glutamil transpeptidase (GGT), uma glicoproteína ligada à face extracelular da membrana plasmática que inicia a degradação extracelular da GSH e seus conjugados. A clivagem da GSH fornece o mecanismo para a recuperação de cisteínas para a célula, renovando a síntese de GSH (MEISTER e ANDERSON, 1983; WHITFIELD, 2001; YAO e DONG, 2007).

Na reação contra os peróxidos atua também o sistema peroxirredoxinas (Prx) / tioredoxina (Trx) / tioredoxina redutase (TrxR) (ARNÉR e HOLMGREN, 2000; RHEE *et al.*, 2005). O sistema (Trx/TrxR) contribui para a manutenção das proteínas tiólicas e na defesa contra agentes oxidantes presentes nas células. Quando a Trx está no estado reduzido, Trx-(SH)₂, as duas cisteínas do sítio ativo são capazes de catalisar a redução de dissulfetos. A Trx oxidada (Trx-S₂) pode ser reduzida por NADPH através da ação catalítica da TrxR (PEDRAJAS *et al.*, 1999; MARI *et al.*, 2009). As Trx são pequenas proteínas (12 kDa) que em humanos compreendem três isoformas: a Trx-1 é citosólica e ocorre no meio extracelular, citoplasma e núcleo; a Trx-2 é mitocondrial e se expressa em vários tipos celulares; a terceira isoforma, SpTrx, ocorre em maior quantidade no espermatozóide (MAULIK e DAS, 2008). O sistema Trx interage também com as Prx, que constituem uma família de peroxidases que dependem da Trx como doadora de elétrons para decompor H₂O₂, peroxinitrito e uma grande variedade de hidroperóxidos orgânicos (CHAE *et al.*, 1999; PESKIN *et al.*, 2007; WINTERBOURN e HAMPTON, 2008).

As Prxs são divididas em dois grupos, de acordo com o número de resíduos de cisteína envolvidos diretamente na ação catalítica: 1-Cys e 2-Cys Prx. As 1-Cys Prx conservam apenas a cisteína peroxidásica responsável pela atividade catalítica da enzima. Já as 2-Cys Prx conservam também outro resíduo de cisteína, denominado cisteína de resolução. As 2-Cys Prx estão subdivididas em típicas e atípicas. Entre as 2-Cys típicas estão a Prx1, encontrada no citoplasma e núcleo, a Prx2 presente também no citoplasma e nas membranas, a Prx3 mitocondrial, e a Prx4 que ocorre no citoplasma e no complexo de Golgi. A 2-Cys Prx atípica (Prx5) é encontrada no citoplasma, na mitocôndria e nos peroxisomas e a 1-Cys Prx (Prx6) foi identificada no citoplasma (HOFMANN *et al.*, 2002; WOOD *et al.*, 2003; SHUVAEVA *et al.*, 2009). A Prx6 conserva apenas a cisteína peroxidásica e não possui a cisteína de resolução. O ácido sulfênico da cisteína, produzido na reação

com peróxidos, é reduzido por grupamentos tiólicos doadores de elétrons, tais como GSH, ácido lipóico e ciclofilinas (WOOD *et al.*, 2003; RHEE *et al.*, 2005).

1.1.4 Estresse oxidativo

As alterações relacionadas ao ataque de ERO podem ser causadas por sua excessiva formação e/ou ineficiência em sua interceptação pelas defesas antioxidantes, gerando o chamado estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a capacidade das células em eliminá-los (CHONG *et al.*, 2005) e pode ocorrer devido à ação de contaminantes, através da alteração na regulação redox celular, pelo metabolismo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) por citocromos P450, ou ainda, pela presença de íons metálicos livres, gerando ciclos de reações oxidativas (REGOLI *et al.*, 2002a; REGOLI *et al.*, 2002b). Nestas situações específicas, através do excesso de produção de ERO, falha das defesas antioxidantes ou ambos, ocorre a geração do estresse oxidativo. As consequências do estresse oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo celular e com sua intensidade. Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), os principais efeitos são: proliferação celular, adaptação com aumento das defesas celulares, dano celular, senescência e morte celular.

1.2 Metabolismo de xenobiontes

Xenobiontes são contaminantes ou substâncias estranhas ao ambiente e aos organismos biológicos. Estas substâncias em geral, ativam as duas primeiras etapas de defesa do organismo, induzindo enzimas de biotransformação de fase I e II. O processo de biotransformação pode ser definido como a conversão, catalisada por enzimas, de um composto xenobiótico em uma forma mais solúvel em água, que pode ser mais facilmente excretada (VAN DER OOST R. *et al.*, 2003). O processo de biotransformação de fase I (reações de oxidação) de compostos orgânicos é realizado pelo sistema citocromo P450 (CYPs) associado à atividade da 7-etoxi-resorufina-O-deetilase (EROD) (NIYOGI *et al.*, 2001). Os CYPs representam a principal via metabólica de biotransformação da fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas que fazem parte do sistema de oxidases de funções múltiplas

(MFO). Este sistema desempenha papel central no metabolismo de muitos xenobíontes tornando-os hidrofílicos e catalisando tanto reações de detoxificação quanto de bioativação (TERAMITSU *et al.*, 2000).

Na fase II, os metabólitos produzidos na fase I são conjugados a compostos endógenos como a GSH. Em peixes, a biotransformação de compostos orgânicos, como HPAs, ocorre principalmente no fígado e envolve as enzimas do retículo endoplasmático como os CYPs associados a atividade da EROD. Os metabólitos resultantes da fase I de biotransformação se tornam substratos hidrofílicos para reações de conjugação na fase II de biotransformação (INSAUSTI *et al.*, 2009). A GST é responsável pela conjugação de xenobíontes eletrofílicos com a GSH, diminuindo sua toxicidade, além de torná-los mais hidrofílicos, permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular e posteriormente para bile ou da urina (VAN DER OOST *et al.*, 2003). O sistema de transporte de xenobíontes é considerado como sendo metabolismo de fase III de biotransformação. Uma vez que a eliminação de HPAs é eficiente em peixes, a bioacumulação destes compostos em tecidos geralmente não é observada, desta maneira a análise destes compostos no tecido pode não ser válida como marcador de exposição. A análise de metabólitos de HPAs na bile tem sido considerada como uma estratégia efetiva para análise da presença de HPAs no ambiente (LEPPÄNEN *et al.*, 1998; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A indução de GST e de CYPs, por serem sensíveis a compostos exógenos, tem sido largamente utilizada como biomarcador (STEGEMAN *et al.*, 1990; BUCHELI e FENT, 1995). A resposta indutiva de enzimas de biotransformação em peixes frente a xenobíontes foi a base para utilização desta resposta como biomarcador no monitoramento da poluição em ambientes aquáticos (COLLIER *et al.*, 1992; AGRADI *et al.*, 2000).

1.3 Contaminação ambiental

Ao longo da evolução o homem encontrou caminhos para desenvolver habilidades de transformar e criar instrumentos para a sua sobrevivência, desenvolvendo assim as mais diversas áreas do conhecimento e levando ao processo de desenvolvimento da indústria, comércio e ciência. Este desenvolvimento gerou crescimento

populacional, o qual exigiu uma maior demanda de produtos agrícolas e industriais. Para sobrevivência e manutenção da qualidade de vida, o homem aprimorou técnicas de plantio e de desenvolvimento de equipamentos. Este desenvolvimento veio acompanhado da degradação do meio ambiente com emissão de poluentes atmosféricos e contaminação do solo e da água.

Hoje a maioria dos recursos vitais da terra é encontrada em locais geográficos específicos como o ambiente litorâneo e bacias de represamento de grandes rios, sendo que, muitas pessoas vivem nas proximidades destas regiões e são dependentes, ao menos em parte, de seu suprimento alimentício ou matéria prima industrial. A consequência desta situação é que grande parte dos resíduos industriais e domésticos, assim como vários tipos de mudanças no ecossistema levam a destruição de habitats. A ação humana ocorre em áreas que são de grande importância econômica e biológica e são, via de regra, impactantes sobre o ambiente (MOORE *et al.*, 2004).

Os contaminantes liberados ao meio ambiente pela ação antrópica podem causar diversos tipos de danos aos organismos e as populações, tais como comprometer os processos fisiológicos vitais como a respiração, reprodução e crescimento. No entanto, alterações na estrutura de populações e ecossistemas tendem a se manifestar após longos períodos de exposição. Estas alterações sofrem influência de vários fatores externos, podendo apresentar consequências como perda de biodiversidade, destruição de habitats e declínio populacional. Estas consequências da contaminação geralmente são irreversíveis e de grande impacto ecológico e humano. Em um sistema biológico, a ordem sequencial das alterações promovidas pela presença de poluentes ocorre em níveis crescentes de organização biológica, estendendo-se do nível molecular ou bioquímico para o nível fisiológico ou individual, até os níveis de população e ecossistema (MOORE *et al.*, 2004).

O ambiente aquático recebe um crescente número de químicos da agricultura e da indústria contaminando os organismos vivos. Esta carga de contaminantes pode ocorrer na água, sedimento, matéria particulada em suspensão e nas fontes alimentícias. Desta forma, a concentração de contaminantes é muito variável, e afetará o organismo através da relação entre sua taxa de captação e eliminação (LUSHCHAK, 2010). Os xenobiontes afetam os organismos biológicos através de interações com proteínas receptoras celulares, distúrbios na homeostase celular, inibição enzimática, danos a macromoléculas, entre outros. Ao sofrer o impacto dos xenobiontes, o organismo responde inicialmente a nível molecular e celular através de respostas adaptativas para minimizar o efeito tóxico

dos contaminantes, aumentando suas defesas. Quando as respostas adaptativas não são suficientes, alterações sistêmicas podem ocasionar diminuição no crescimento, redução da fertilidade e reprodução, distúrbios funcionais, mutação, câncer, distúrbios comportamentais ou a morte. Quando as respostas desenvolvidas pelos organismos são suficientes para contrabalancear os distúrbios, os organismos se adaptam ao ambiente contaminado (Fig. 3) (FENT, 2004).

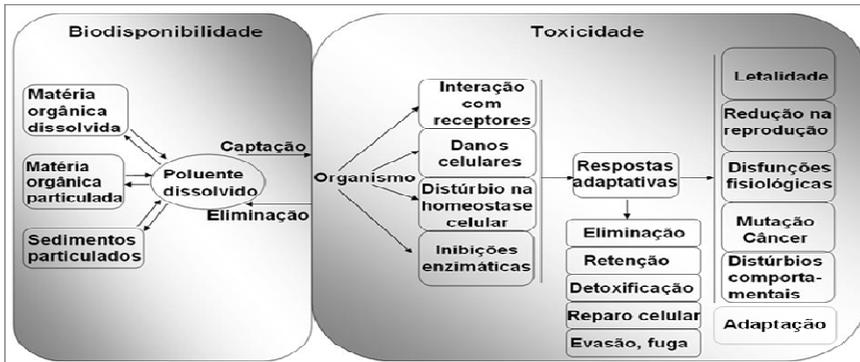


Figura 3. Biodisponibilidade e toxicidade dos poluentes. A biodisponibilidade dos poluentes está relacionada à taxa de captação e eliminação pelo organismo. Já a sua toxicidade é o resultado entre os efeitos diretos, a níveis celulares e moleculares, e a capacidade adaptativa do organismo (Adaptado de FENT, 2004).

No início da década de 60 a sociedade começou a se preocupar com os efeitos adversos de compostos químicos e com o risco potencial que eles representam para os ecossistemas aquáticos, o que levou à criação de órgãos ambientais nacionais (STAP, 2004). Neste contexto, a ciência busca entender a interação dos compostos tóxicos ou xenobiontes com a vida aquática, sendo a ecotoxicologia a ciência que identifica e avalia os processos bioquímicos e fisiológicos em organismos aquáticos de comunidades naturais sob pressão antrópica (CHAPMAN, 2002).

1.4 Biomarcadores

Com o desenvolvimento da ecotoxicologia vários biomarcadores foram identificados, os quais são definidos pela Organização Mundial

de Saúde (WHO, 2001) como qualquer substância, estrutura ou processo, que possa ser mensurado no organismo e que possa predizer ou influenciar a incidência de um acontecimento ou doença, refletindo a interação entre sistema biológico e contaminantes. Também podem ser definidos como alterações biológicas em nível molecular, celular ou fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados pelos poluentes (WALKER *et al.*, 1996 ; VALAVANIDIS *et al.*, 2006). A análise de biomarcadores moleculares ou bioquímicos pode refletir o nível da degradação ambiental causada por contaminantes, sendo possível aplicar estratégias de mitigação para evitar danos em maior escala, como efeitos deletérios nas populações e comunidades biológicas (ADAMS *et al.*, 1989; CAJARAVILLE *et al.*, 2000), uma vez que a análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares apresenta menor custo, maior facilidade e rapidez do que as análises químicas convencionais e intervenções em níveis macroecológicos (GALLOWAY *et al.*, 2004).

Compostos químicos exógenos ou xenobiontes são continuamente liberados pelas comunidades urbanas, propriedades rurais e indústrias no ambiente aquático. Com o crescimento populacional, urbanização e industrialização, a partir do século XX, além das cargas orgânicas convencionais, muitos outros poluentes, tais como, HPAs, bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas organoclorados (e.g. DDT), organofosforados (e.g. malation), metais pesados e outros produtos químicos/orgânicos, vêm sendo produzidos e, em parte, liberados no ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003; MARTINEZ-ALVAREZ *et al.*, 2005). A maioria destes xenobiontes possui potencial oxidante, tornando as células suscetíveis a danos por ERO (WINSTON e DIGIULIO, 1991). Neste contexto, as alterações no metabolismo e a produção de danos por ERO, em decorrência de xenobiontes lançados no ambiente aquático, podem ser usados como biomarcadores de contaminação aquática (MARTINEZ-ALVAREZ *et al.*, 2005).

Como já mencionado, os efeitos iniciais dos poluentes podem ser observados nas respostas bioquímicas e moleculares, com mecanismos compensatórios de detoxificação. Sendo assim, conhecer os mecanismos iniciais (em níveis molecular e celular) de resposta na presença de contaminantes, pode evitar danos maiores em nível de ecossistema.

Neste contexto, ferramentas sensíveis, ou biomarcadores, são necessários para permitir o reconhecimento da existência e do grau de adversidade causada ao ambiente. Estes dados, por sua vez, permitem intervenções que preservem a integridade da biota, antes dos efeitos tornarem-se irreversíveis ou caros demais para intervenção (FENT, 2004; MOORE *et al.*, 2004).

O conhecimento atual e os avanços recentes na toxicologia fornecem um campo fértil para estudos de toxicologia aquática, onde peixes podem servir como sistema modelo em investigação do processo básico de dano e de proteção celular por ERO (LUSHCHAK, 2010), uma vez que estes possuem sistemas para geração e degradação de radicais livres (WINSTON e DIGIULIO, 1991; VALAVANIDIS *et al.*, 2006), além de possuir mecanismos de bioconcentração (WEISBROD *et al.*, 2007; PARKERTON *et al.*, 2008). Peixes estão presentes em praticamente qualquer corpo d'água e as diferentes espécies possuem uma vasta variedade de nichos ecológicos. Neste contexto, são bons modelos na avaliação dos efeitos da toxicidade dos xenobiontes nos animais, uma vez que suas respostas bioquímicas são similares as respostas dos mamíferos e de outros vertebrados (SANCHO *et al.*, 2000).

Vários trabalhos têm sido realizados neste sentido, expondo peixes em gaiolas ou capturando-os em pontos impactados por xenobiontes. Almroth e colaboradores (2008) em um estudo com trutas mantidas em gaiolas em áreas impactadas por químicos de várias origens analisaram parâmetros como GST, GR, CAT e GSH. Da mesma forma Lima e colaboradores (2006) analisaram parâmetros de danos oxidativos ao DNA com o ensaio do cometa e parâmetros antioxidantes como GR, GPx, GST e GSH em tilápias expostas em lagoas contaminadas. A biotransformação de xenobiontes também tem sido analisada como marcador da presença de contaminantes orgânicos no ambiente. Bairy e colaboradores (1999) avaliaram as alterações na expressão e atividade de isoformas de CYPs de tilápias capturadas em uma área impactada em São Paulo. Da mesma forma, Wilhelm Filho e colaboradores (2001b) analisaram a atividade da GST e da EROD em peixes coletados de áreas contaminadas de Santa Catarina, além de analisar parâmetros antioxidantes como GSH, SOD e CAT.

Alguns estudos também demonstraram que a inibição de colinesterases em peixes pode ser considerada como um biomarcador específico para carbamatos e organofosforados (PAYNE *et al.*, 1996). Condições pró-oxidantes podem ainda aumentar a formação de cetoaldeídos durante processos oxidativos de proteínas e lipídios, induzindo a atividade da enzima de detoxificação glicoxalase I (REGOLI e PRINCIPATO, 1995). Enfim, o uso de bioindicadores de poluição ambiental tem sido largamente utilizado através da análise de enzimas antioxidantes, produtos de biotransformação, parâmetros de estresse oxidativo e de genotoxicidade como biomarcadores (GOKSOYR, 1995; VENTURA *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2007; SIMONATO *et al.*,

2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; PATHIRATNE *et al.*, 2010). Com base nestes estudos, trabalhos vêm sendo desenvolvidos na região de Joinville, SC, onde Alves (2003), através da exposição de tilápias do Nilo em gaiolas no Rio do Braço encontrou aumento na atividade das enzimas CAT e GST, assim como aumento na expressão de CYP450. Ainda nesta região, Franco e colaboradores (2010) realizaram esta mesma exposição, observando diminuição nos níveis de glutathione total (GSH-t) e aumento na peroxidação lipídica, associado ao aumento na atividade de enzimas antioxidantes como CAT, GPx e GR, além do aumento na expressão de CYP1A e inibição colinesterásica. Neste sentido, o presente trabalho visa dar continuidade aos estudos já realizados nesta região.

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil possui grandes reservas de água doce, que, além de estarem distribuídas de forma inconstante ao longo de seu território, sofrem intensa degradação através da contaminação gerada por grandes centros urbanos e pólos industriais, principalmente nas regiões sul e sudeste do país. Santa Catarina, por exemplo, possui um extenso litoral com a presença de atividades portuárias, agrícolas, industriais e de mineração.

No nordeste do estado de Santa Catarina (SC) está localizada Joinville, a cidade mais populosa do estado, com uma população estimada de 509.293 habitantes em 2010 (IBGE, 2010). A cidade possui um dos mais altos índices de desenvolvimento humano entre os municípios brasileiros, produz 13,6% do PIB global do estado de Santa Catarina e é o terceiro pólo industrial da região Sul do Brasil. Baseado em dados do IBGE e da Prefeitura Municipal de Joinville, a FATMA (2003) reporta que entre 1950 e 2000, houve uma intensa urbanização, onde a população urbana passou de 49 % para 97%. Joinville possui um parque industrial moderno e concentra grande parte dos segmentos da indústria metalúrgica, mecânica e de plástico de Santa Catarina, assim como indústrias têxteis, de vestuário, de madeira e do mobiliário. A agropecuária baseia-se na fruticultura, produção de grãos (principalmente arroz) e rebanho bovino (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Em Joinville está localizada a Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Norte. O Rio Cubatão é considerado um dos principais da região nordeste de Santa Catarina, com cerca de 80% de sua área total inserida no município de Joinville, constituindo o principal contribuinte hídrico do Complexo Hídrico da Baía da Babitonga, uma área com importantes ecossistemas de manguezais, resquícios de Mata Atlântica, e uma importante fauna marinha. O Rio Cubatão é responsável por cerca de 70% do abastecimento de água de Joinville e de parte do município de Araquari. Já o Rio do Braço é um importante contribuinte hídrico da Bacia do Rio Cubatão, percorrendo uma área ocupada por zona industrial, área rural e com grande concentração urbana (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Os problemas na qualidade ambiental na cidade de Joinville estão vinculados a inúmeros fatores sócio-econômicos. A poluição dos recursos hídricos tem origem em efluentes industriais e resíduos sólidos, uso de agrotóxicos nas lavouras de arroz, drenagem insuficiente de água pluvial e ineficiência na coleta e tratamento de esgoto. Estudos

anteriores nesta região, com a utilização de biomarcadores de contaminação aquática, sugeriram que estes recursos hídricos estão sofrendo impacto antrópico (ALVES, 2003; FATMA, 2003; FRANCO *et al.*, 2010). A pesca, especialmente em rios, e o cultivo de moluscos, na Baía da Babitonga, também sofrem o impacto deste aporte indesejado de contaminantes. Nesta região já foi demonstrado sinais de elevados níveis de contaminação desde a década de 80 (CARMONA *et al.*, 1985). Em estudos realizados entre 1997 e 2003, a FATMA reporta inúmeros dados de toxicidade a respeito dos principais rios e afluentes da região. O Rio Cubatão demonstrou elevados níveis de toxicidade a partir da confluência com um de seus afluentes, o Rio do Braço, o mesmo ocorrendo com os níveis de coliformes fecais e demanda química e bioquímica de oxigênio (FATMA, 2003). Os níveis de contaminação do Rio Cubatão são variáveis ao longo de seu curso: inicialmente pode ser impactado por esgoto doméstico, detritos agroquímicos e de animais, e posteriormente, por efluentes industriais através do Rio do Braço (FERREIRA *et al.*, 2007).

O lançamento de efluentes com potencial oxidante neste ambiente poderá induzir inúmeras alterações adaptativas no metabolismo celular, assim como danos oxidativos nos organismos que ali habitam. Uma vez que estes organismos são submetidos a um estresse persistente, estas alterações bioquímicas ou moleculares podem evoluir para um nível sistêmico, promovendo alterações funcionais nos organismos biológicos, prejudicando a dinâmica e sustentabilidade da população, podendo afetar a saúde humana. Para tanto, é fundamental o desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos que visem o desenvolvimento de ferramentas e protocolos para o biomonitoramento ambiental. Entretanto, para o uso adequado destas ferramentas é necessário uma visão ampla que envolva conhecimentos relacionados à genética, proteômica e metabolismo celular (MOORE *et al.*, 2004).

Neste contexto, analisar as alterações celulares de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a contaminantes, através de parâmetros de resposta celular antioxidante e de danos oxidativos, pode ser fundamental para o desenvolvimento de ferramentas e protocolos sensíveis que auxiliem o planejamento e desenvolvimento de estratégias que buscam a conservação ambiental e proteção da saúde humana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as respostas antioxidantes e de adaptação celular de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.

3.2 Objetivos específicos

a) Analisar o padrão de resposta de biomarcadores clássicos de estresse oxidativo, bem como, de novos potenciais biomarcadores em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas por 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço em Joinville, SC;

b) Quantificar os níveis de contaminantes orgânicos e seus metabólitos no sedimento, fígado e bile de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas por 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço em Joinville, SC;

c) Integrar os níveis de contaminação com as repostas observadas;

d) Identificar o melhor protocolo experimental de curto prazo para estudos de campo com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Joinville está localizada no nordeste do estado de Santa Catarina. No presente estudo foram analisados três pontos do Complexo Hídrico da Bacia da Babitonga. O ponto S1 está localizado no Rio Cubatão e representa uma região de atividade agrícola, principalmente com o cultivo do arroz (Fig. 4). Os pontos S2 e S3, localizados nos Rios do Braço e Cubatão, respectivamente (Fig. 4), representam dois pontos sobre forte influência de atividades industriais e efluentes domésticos. No mapa (Fig. 4), REF indica o ponto de referência, localizado na estação de piscicultura da Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC.

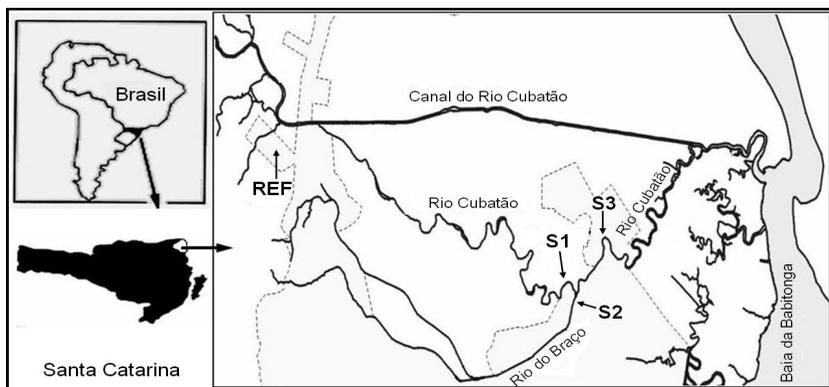


Figura 4. Área de estudo nos Rios Cubatão e do Braço em Joinville, SC. REF indica o ponto de manutenção dos animais referência na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville - SC; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição dos animais nos Rios Cubatão e do Braço.

4.2 Animais

Os animais foram fornecidos pela Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC (REF), onde foram criados e mantidos em tanques-rede durante 3 semanas antes do início do

experimento, com o objetivo de reduzir o estresse provocado pelo confinamento. Os tanques rede possuíam 1,2x1x1 metro (comprimento, largura, altura), em uma densidade máxima de 6 g/L. Foram utilizadas tilápias (*Oreochromis niloticus*) machos pesando 168 ± 68 g e medindo 20 ± 3 cm (Tabela 2).

4.3 Exposição

Os animais foram transportados para os pontos de exposição em sacos plásticos oxigenados em água do açude com temperatura de 20-22°C. Foram mantidos em grupos de dez em gaiolas de 1x1,2x0,80 metro (comprimento, largura, altura), confeccionadas com PVC e malha 20 mm, apresentando uma densidade menor que 2 g/L. As exposições foram realizadas durante 2 e 7 dias, em Joinville, SC, nos pontos S1, S2 e S3, indicados na Figura 4. Um açude de piscicultura da Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho foi utilizado como referência (REF). Em cada ponto foram colocadas 2 gaiolas sendo uma retirada após 2 dias e a outra após 7 dias de exposição. Durante o período de exposição os animais não foram alimentados. As exposições foram realizadas entre os dias 14 e 21 de outubro por dois anos consecutivos (2009 e 2010). Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA PP00039).

4.4 Coleta

Após 2 e 7 dias de exposição, os animais foram coletados e então transportados para a Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho em sacos plásticos de 25 L contendo aproximadamente 8 L de água do rio e oxigênio. Antes da coleta das amostras os animais foram mantidos em tanques de 2000 L. Amostras de sangue foram coletadas por punção da aorta ventral ou dos vasos branquiais. Os animais foram mortos por meio de secção transversal da medula espinhal. Amostras de fígado, cérebro, bile, músculo e gônadas foram coletadas. A preparação das amostras para análise de GSH-t, tióis não protéicos do fígado (NPSH), tióis plasmáticos (-SH do plasma) e conteúdo de hemoglobina foi realizada imediatamente após a coleta, enquanto que para os demais parâmetros, as amostras foram congeladas em gelo seco e armazenadas

a -80 °C até as análises. Também foram coletadas amostras de sedimento e água do rio para a determinação de compostos orgânicos e metais traço.

Durante a realização dos experimentos a temperatura, pH e O₂ dissolvido da água foram monitorados no dia da exposição e no dia da coleta em todos os pontos de exposição.

4.5 Preparação das amostras

Para a determinação dos níveis de GSH-t e NPSH no fígado, aproximadamente 100 mg de tecido foi homogeneizado em 900 µL de ácido perclórico (PCA) 0,5 M, que após alguns minutos foi centrifugado a 15.000 g por 2 minutos a 4 °C. O extrato ácido foi utilizado para as determinações de GSH-t e NPSH.

Para a determinação dos níveis de GSH-t no sangue aproximadamente 100 µL de sangue foi homogeneizado em 900 µL de ácido tricloroacético (TCA) 8 %. Os homogenatos foram centrifugados a 15.000 g por 2 minutos a 4 °C e o extrato ácido foi utilizado para as determinações.

Para a determinação dos níveis de tióis plasmáticos e da atividade colinesterásica do plasma, o sangue foi centrifugado a 3.000 g por 5 minutos a 4 °C e o plasma foi utilizado para análise.

Para a determinação das atividades enzimáticas aproximadamente 400 mg de fígado foi homogeneizado em tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) 50 mM, cloreto de potássio (KCl) 0,15 M, fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) 0,1 mM, pH 7,4, na proporção 1:4 (peso/vol.). O homogenato foi centrifugado a 9.000 g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 100.000 g por 60 minutos a 4 °C para obtenção do precipitado microsomal (*pellet*). O sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

O precipitado microsomal (*pellet*) foi ressuspenso em 400 µL de Tris-HCl 0,1 M, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, ditiotretitol (DTT) 1 mM, KCl 0,1 M, glicerol 20 % e utilizado para imunodeteção das isoformas de CYP450 (CYP1A, CYP2B e CYP3A) e para determinação da atividade da EROD (STEGEMAN *et al.*, 1979; STEGEMAN *et al.*, 1981).

Para imunodeteção da Prx6 e da clivagem da proteína PARP1, aproximadamente 50 mg de fígado foi homogeneizado em Tris-HCL 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,1 mM, contendo inibidor de protease

(*Protease Inhibitor Cocktail – Sigma P2714*), na proporção 1:4 (peso/vol.). O homogenato foi centrifugado a 1.000 g por 10 minutos a 4 °C para obtenção do sobrenadante, que foi utilizado para a imunodeteção.

4.6 Análise de tióis

4.6.1 Determinação dos níveis de glutatona total (GSH-t)

Para determinar os níveis de GSH-t, 50 µL do extrato ácido foi neutralizado e diluído em 450 µL de tampão fosfato de potássio (KPi) 0,1 M contendo EDTA 1 mM pH 7,0. Em seguida foi empregado o método enzimático de Tietze, modificado por Akerboom e Sies (1981). O ensaio enzimático de 2 minutos foi realizado em KPi 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0, contendo NADPH 0,2 mM e ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,1 mM. Como iniciador da reação utiliza-se GR 0,25 U/mL purificada de levedura. A reação foi medida fotometricamente a 412 nm. A absorbância basal é descontada a partir da leitura do consumo basal de NADPH do ensaio na ausência de amostra. A quantificação dos níveis de GSH-t foi baseada a partir de uma curva padrão com GSSG realizada no momento da leitura.

4.6.2 Determinação dos níveis de tióis plasmáticos e tióis não protéicos (NPSH) do fígado

Para determinação dos níveis de tióis totais do plasma, foi utilizado um meio de reação contendo Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, dodecil sulfato de sódio (SDS) 1 % e DTNB 0,2 mM, ao qual foi adicionado o plasma. A absorbância de uma amostra referência, sem a adição de DTNB, foi descontada do valor obtido a fim de subtrair a absorbância causada por substâncias interferentes, tais como grupos heme no plasma.

Para a análise dos níveis de NPSH no fígado, 100 µL do extrato ácido foi adicionado a 400 µL de tampão na concentração final Tris-HCl 0,5 M, DNTB 0,2 mM, pH 8,0. Paralelamente as amostras também foram preparadas na ausência de DTNB, para descontar a absorbância basal da amostra.

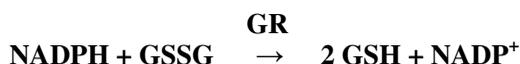
O desenvolvimento de cor se dá pela reação dos grupos tióis com DTNB, e conseqüente liberação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), o qual absorve em 412 nm ($\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (ELLMAN, 1959). Um

segundo branco na presença de DTNB foi realizado para descontar sua absorvância basal.

4.7 Análises enzimáticas

4.7.1 *Glutathione redutase (GR)*

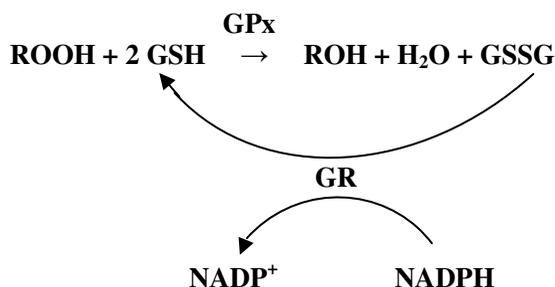
A atividade GR foi determinada por meio do consumo de NADPH durante a redução da GSSG para GSH, como descrito por Carlberg e Mannervik, (1985).



A taxa de oxidação do NADPH, em condições de saturação, representa a atividade enzimática, que é observada fotometricamente a 340 nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Da velocidade de consumo de NADPH é descontada a reação basal de consumo de NADPH obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do iniciador, GSSG 1 mM. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado a 25 °C em KPi 100 mM, EDTA 1mM, pH 7,0 contendo NADPH 0,2 mM. Os valores foram obtidos em nmol/min/mg de proteína.

4.7.2 *Glutathione peroxidase (GPx)*

A atividade da GPx foi determinada indiretamente pelo consumo do NADPH. A enzima, ao utilizar GSH para degradar um peróxido orgânico, como o peróxido de cumeno (CuOOH), gera GSSG. A GSSG, por sua vez, é reduzida a GSH pela GR, consumindo NADPH (WENDEL, 1981).



A taxa de oxidação do NADPH, em condições de saturação, representa a atividade enzimática, que é observada fotometricamente a 340 nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Desta velocidade de consumo é descontado o consumo basal de NADPH, obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (CuOOH). O ensaio enzimático é realizado a 25 °C em KPi 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo NADPH 0,2 mM, GSH 1 mM e GR 0,2 U/mL purificada de levedura. Para permitir a ativação da GPx por GSH, a leitura espectrofotométrica foi realizada 5 min após a adição das amostras ao meio da reação. O início da reação é determinado pela adição do substrato iniciador (CuOOH 1 mM) ao meio de reação. Os valores foram obtidos em nmol/min/mg de proteína.

4.7.3 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada como descrito por (AEBI, 1984), onde se mede o desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima presente no meio de reação.



O ensaio enzimático de 1 minuto foi realizado em KPi 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo Triton X-100 0,012 % e H_2O_2 10 mM. A alta velocidade de reação desta enzima, associada a uma baixa afinidade, permite a determinação de sua atividade com concentrações elevadas de H_2O_2 . Assim, a atividade enzimática foi determinada fotometricamente a 25 °C em 240nm ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), através da velocidade de consumo do H_2O_2 no primeiro minuto da reação. A absorbância basal é descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra. Os valores foram obtidos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.7.4 Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada a partir da conjugação de GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), produzindo um composto que pode ser detectado em 340nm ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional a velocidade de produção do composto conjugado (HABIG e JAKOBY, 1981).



O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado a 25 °C em KPi 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo GSH 1 mM. Como substrato iniciador foi utilizado CDNB 1 mM. Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. Os valores foram obtidos em nmol/min/mg de proteína.

4.7.5 Tiorredoxina redutase (TrxR)

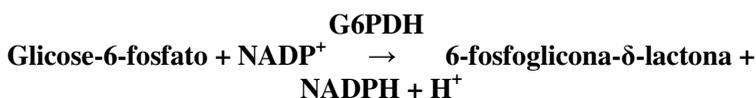
A atividade da TrxR foi determinada a partir da redução do DTNB a duas moléculas de TNB, resultado da reação catalisada pela TrxR, onde há consumo de NADPH (ARNER *et al.*, 1999).

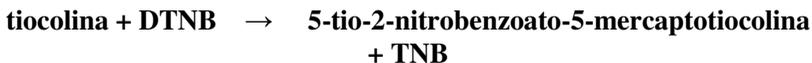
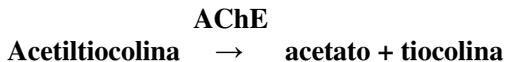


Para descontar a formação basal de TNB através das reações dos tióis da amostra com DTNB, as amostras foram incubadas durante 15 minutos no meio de reação contendo KPi 100 mM pH 7,0, EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e albumina de soro bovino (BSA) 0,2 mg/mL. Após esse tempo, a reação específica da TrxR foi iniciada a 25 °C através da adição de NADPH 200 µM, acompanhando-se fotometricamente a formação de TNB em 412 nm ($\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), em uma leitura de 10 min. Os valores foram obtidos em nmol/min/mg de proteína.

4.7.6 Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH foi determinada pelo método de Glock & McLean, (1953), onde, na presença de glicose-6-fosfato (G6P), o NADPH é formado a partir do fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada (NADP⁺) e, portanto, o aumento da absorbância é medido em 340nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

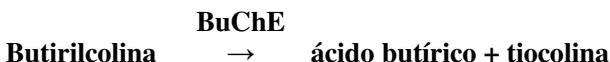




O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em KPi 100 mM, pH 8,0, contendo DTNB 0,5 mM. Como substrato iniciador utilizou-se acetilcolina 0,36 mM. A formação de TNB foi medida espectrofotometricamente a 25 °C em 412 nm ($\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A absorbância basal foi descontada a partir da absorbância obtida na ausência da acetilcolina. Os valores foram obtidos em nmol/min/mg de proteína.

4.7.9 *Butirilcolinesterase (BuChE)*

A atividade da butirilcolinesterase (BuChE) foi medida pelo método de Ellman (1961). A hidrólise da butirilcolina leva a formação de ácido butírico e tiocolina, sendo que o grupo tiol desta reage com DTNB liberando o ânion colorido TNB.



O ensaio enzimático é similar ao da AChE, substituindo-se acetilcolina por butiriltiocolina.

4.7.10 *7-Etoxi-resorufina O-Deetilase (EROD)*

A atividade da EROD foi medida segundo o método de Burke e Mayer (1974). O princípio do método consiste na detecção fluorimétrica do produto final, resorufina. A medida da intensidade da fluorescência corresponde a resorufina produzida por unidade de tempo e é equivalente a atividade do CYP1A da amostra. A atividade da EROD foi analisada espectrofluorimetricamente medindo o aumento da fluorescência da resorufina (Ex/Em 530/585). As concentrações no ensaio foram: NADPH 1,67 mM, etoxi-resorufina 2 μM , Tris-HCL 50

mM, pH 7,8. A atividade foi analisada na fração microssomal. Os valores foram obtidos em pmol/min/mg de proteína.

4.8 Quantificação de proteínas e determinação dos níveis de hemoglobina (Hb)

A quantificação de proteínas totais nas frações citosólicas e microssomais foi determinada pelo método Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Para a derterminação de Hb, utilizou-se a absortividade em 540 nm da forma ciano-metHb ($\epsilon = 44.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para o ensaio adicionou-se 20 μl de sangue em 2 mL de solução Drabkin (TENTORI e SALVATI, 1981).

4.9 Avaliação de danos ao DNA pelo ensaio do cometa

O ensaio do cometa, que avalia os danos ao DNA e sítios álcalilábeis em células individuais (HELMA e UHL, 2000), foi realizado como descrito por Singh e colaboradores (1988) com algumas modificações. A coloração foi feita com solução de prata, de acordo com Nadin e colaboradores (2001). Para avaliação do dano ao DNA foi coletada uma alíquota de sangue dos animais como descrito acima (Seção 4.4). Este ensaio foi realizado somente no ano de 2010.

Uma alíquota de 2 μL foi adicionada a um microtubo contendo 250 μL de salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4, deste, uma alíquota de 20 μL foi adicionada a 200 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,75 % (*Low-melting point*). A mistura foi aplicada à lâminas de microscópio previamente preparadas com uma camada de agarose 1,5 %, e depois cobertas com lamínulas. Cada amostra foi aplicada em duplicata.

Após a aplicação da amostra as lâminas foram deixadas para solidificar por 15 minutos a 10 °C e depois colocadas em solução de lise previamente gelada (cloreto de sódio (NaCl) 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X100 1 % e dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %, pH 10), por duas horas a 4 °C. Após esse período, as lâminas foram incubadas em solução alcalina pH ~13 (hidróxido de sódio (NaOH) 0,3 M e EDTA 1 mM) em cuba de eletroforese horizontal por 25 minutos e

em seguida foi aplicada corrente elétrica de 300 mA e 25 V por 25 minutos. Depois, as lâminas foram neutralizadas com Tris-HCL 4 M, pH 7,5, e em seguida lavadas com água destilada e fixadas por 10 minutos em solução contendo ácido tricloroacético 15 %, sulfato de zinco 5 % e glicerol 5 %. Após a fixação, as lâminas foram novamente lavadas com água destilada e deixadas para secar por 5 horas.

As lâminas foram então reidratadas por 5 minutos. Para coloração foi utilizado 66 % da solução A (carbonato de sódio 5 %) e 34 % da solução B (nitrato de amônio 0,1 %, nitrato de prata 0,1 %, ácido tungstosilícico 0,25 % e formaldeído 15 %). A coloração durou 20 minutos a 37 °C com agitação constante. Após esse período, as lâminas foram lavadas com água destilada e mergulhadas em solução de parada (ácido acético 1 %).

Durante o ensaio foi utilizada lâmpada com luz vermelha para evitar danos ao DNA. As cubas utilizadas foram cobertas para proteger as lâminas da luz.

O índice de danos ao DNA foi determinado em microscópio óptico de acordo com o comprimento da migração do DNA, visualizado como uma cauda que parte do nucleóide de DNA. Foram analisadas 100 células de cada grupo, – 50 para cada uma das lâminas feitas em duplicata – nas quais a avaliação dos danos ao DNA obedeceu a seguinte classificação, considerando o tamanho da cauda: classe 0, as células sem cauda, portanto, sem danos; classe 1, células com cauda curta, menor do que o diâmetro da cabeça do cometa; classe 2, cauda medindo de uma a duas vezes o tamanho da cabeça; classe 3, células com cauda maior do que duas vezes o tamanho da cabeça; e classe 4, cometas com cauda longa e núcleo pequeno (Fig. 5). A pontuação das amostras para o cálculo do índice de danos foi feita de acordo com a visualização das caudas em cada classe, de acordo com o seguinte cálculo: índice de danos ao DNA = $\{(N \text{ classe } 1 \times 0) + (N \text{ classe } 2 \times 1) + (N \text{ classe } 3 \times 2) + (N \text{ classe } 4 \times 3) + (N \text{ classe } 5 \times 4)\}$.

Ao final, foi obtida uma pontuação de cada amostra, com índice de danos variando de 0, quando há ausência de danos, a 400, o dano máximo. Os guias e recomendações internacionais para o ensaio do cometa consideram o escore visual um método válido para avaliação de danos (ROSA *et al.*, 2007).

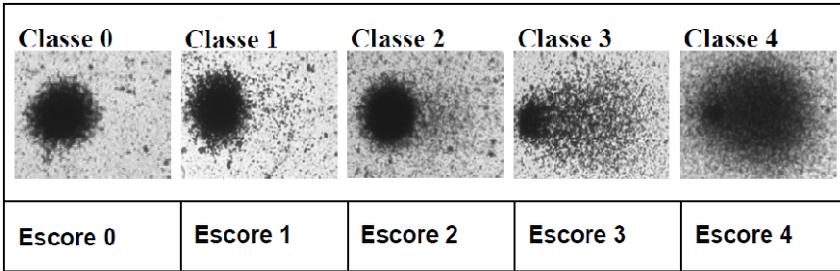


Figura 5. Imagens representativas das amostras feitas nos ensaios do cometa. Imagens dos cometas, suas classes e a pontuação, de acordo com o tamanho da cauda. Imagens obtidas com microscópio marca Olympus modelo BX41 e câmera 3.3 mpixel QColor 3C da Q-imaging e programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging (Retirado de Mitozo, 2010).

4.10 Imunodeteção

A técnica de *Western blot* foi utilizada para imunodeteção do CYP1A, CYP2B e CYP3A. As análises foram feitas com as frações microssomais preparadas de acordo com Stegeman e colaboradores (1979, 1981).

A técnica de *Western blot* também foi utilizada para imunodeteção da Prx6 e da clivagem da proteína PARP1, e as amostras de fígado foram preparadas conforme descrito na Seção 4.5.

Os extratos protéicos foram diluídos em tampão contendo Tris-HCL 50 mM, SDS 4 %, EDTA 100 mM, pH 6,8, numa proporção de 1:1, e foram fervidos durante 3 minutos. Em seguida, foi adicionado tampão contendo Tris-HCL 50 mM, glicerol 40 % e azul de bromofenol, pH 6,8, na proporção 4:1 (amostra/tampão). A separação das proteínas (30 µg por poço) foi feita por eletroforese em gel de acrilamina (SDS-PAGE) 10 % por 60 minutos a 150 V, utilizando tampão de corrida contendo Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1 %. Membranas de nitrocelulose com 0,45 µm foram utilizadas para a eletrotransferência, com uma migração de 100 V por 60 minutos a 4 °C, com tampão contendo Tris 25 mM, glicina 190 mM e metanol 5 %.

As membranas foram lavadas com tampão TBST (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM e Tween-20 0,1 %) e bloqueadas com leite desnatado 5 % durante 90 minutos, lavadas novamente com TBST e depois incubadas *overnight* a 4° C com o anticorpo primário para Prx6

(*Abcam Rb pAb to Prx6 ab 59543-100, Abcam, 1:3.000*) e para PARP1 (*Santa Cruz PARP 1/2 (H-250) sc-7150, Rbt policlonal IgG, 1:1.000*). Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com TBST e incubadas durante 60 minutos com o anticorpo secundário de cabra contra IgG de coelho conjugada a peroxidase (*Goat pAb to Rbt IgG, Ab 6721-1, Abcam, 1:5.000*).

Para as análises de imunodeteção do CYP1A, CYP2B e CYP3A foram utilizados os seguintes anticorpos primários, gentilmente cedidos por J.J. Stegman, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, U.S.A.: a) anticorpo monoclonal 1-12-3 de camundongo contra P450E de sargo-da-América-do-Norte (*Stenotomus chrysops*) para CYP1A1 (10 µg/mL solução bloqueadora) (PARK *et al.*, 1986); b) o anticorpo policlonal de coelho contra P4502B de sargo-da-América-do-Norte (*Stenotomus chrysops*) para CYP2B (10µg/mL solução bloqueadora) (KLOTZ *et al.*, 1986); c) o anticorpo policlonal de coelho contra P450 de truta (*Oncorhynchus mykiss*) para CYP3A (25µg/mL solução bloqueadora) (CELANDER *et al.*, 1989). Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com TBST e incubadas durante 60 minutos com os anticorpos secundários: de cabra contra IgG de camundongo conjugada a peroxidase (*Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005, Santa Cruz 1:5000*) e de cabra contra IgG de coelho conjugada a peroxidase (*Goat pAb to Rbt IgG, Ab 6721-1, Abcam, 1:5.000*).

A detecção foi feita através da exposição a filme de alto desempenho ECL (*Amersham Hyperfilm, GE Healthcare*) e reveladores e fixadores Kodak. Para controle de conteúdo de proteína na fração citosólica foi utilizada gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (*Policlonal Anti-GAPDH peroxidase, produzido em cabra, Ab 85760, Abcam, 1:10.000*), além do uso de marcadores de peso molecular (*Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Ge Healthcare*). A intensidade das bandas foi quantificada após digitalização da imagem utilizando-se o software ImageJ (*National Institutes of Health - USA*). Na fração microsomal os resultados foram calculados em densidade integrada por micrograma de proteína microsomal. Já na fração citosólica os resultados foram calculados em densidade integrada normatizado por GAPDH. Os dados estão representados pelo percentual da densidade integrada em relação ao grupo controle.

4.11 Determinação de biliverdina e níveis de metabólitos de HPAs na bile

A análise dos níveis de biliverdina e de metabólitos de HPAs na bile foi realizada somente em 2009 e após 7 dias de exposição. Em 2010 não foi realizada devido a problemas técnicos.

Para determinação dos níveis de biliverdina as amostras de bile foram diluídas 50 vezes em etanol 50 % e 200 μL destas amostras foram utilizadas para leitura espectrofotométrica em 365 nm ($\epsilon = 40.738 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (INSAUSTI *et al.*, 2009). A concentração de biliverdina na bile foi obtida em $\mu\text{mol/ml}$, sendo que os dados foram transformados para percentual em relação ao controle.

A determinação dos metabólitos de HPAs na bile foi realizada pelo método de fluorescência. As amostras de bile foram diluídas para a menor concentração de biliverdina encontrada nas amostras, sendo a diluição mínima 1.000 vezes e a máxima 15.000 vezes. Os comprimentos de onda de excitação e emissão usados foram, respectivamente, 380 / 430 nm para medir metabólitos do tipo benzo(a)pireno e 290 / 335 nm para medir metabólitos do tipo naftaleno (HANSON e LARSSON, 2008). Os dados estão apresentados em percentual de fluorescência em relação ao controle.

4.12 Análise química

4.12.1 Determinação de compostos orgânicos

A análise de compostos orgânicos foi realizada pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

As amostras de sedimento e fígado foram liofilizadas (*liofilizador Thermo Savant – ModulyoD*) durante 72 horas e em seguida maceradas e homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro. Uma alíquota de 20 gramas de sedimento e 0,25 gramas de fígado foi extraída em sistema Soxhlet para análise dos bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas organoclorados, HPAs e alquilbenzeno lineares (LABs) com n-hexano/diclorometano 50 % (vol./vol.) segundo método descrito em UNEP (1992), Matos (2002) e MacLeod e colaboradores (1986), com algumas modificações. Antes da extração foram adicionados os padrões surrogate PCB-103, PCB-198 naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} , dodecil

alquilbenzeno (1C₁₂LAB), hexadeceno e eicoseno em todas as amostras, brancos e materiais de referência certificados (SRM). O SRM 1944 e 2978 utilizado para sedimento e organismos, respectivamente, foram provenientes da National Institute of Standards and Technology (NIST) dos EUA.

O extrato do sedimento foi dividido em duas alíquotas para serem submetidas a cromatografia por adsorção em coluna. Uma parte foi eluída em coluna contendo 3,2 g de alumina 5 % desativada para análise de organoclorados. A outra fração foi eluída em coluna com alumina sobre sílica, também 5 % desativadas, onde o extrato foi purificado e separado para análise de hidrocarbonetos alifáticos e LABs e HPAs. O extrato evaporado dos organismos foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 g de sílica gel sobre 16 g de alumina (*Merck*), 5 % desativadas com água pré-extraída 5 vezes com n-hexano, e 1 g de sulfato de sódio da J. T. Baker no topo. A eluição foi feita com 80 mL de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50 %). Para purificação complementar, o eluato foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo a líquido de alto desempenho (HPLC) da Perkin Elmer, equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano.

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás 6890 da Agilent Technologies equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) para análise de pesticidas organoclorados e com detector de ionização de chama (GC-FID) 6890 para análise de hidrocarbonetos alifáticos. Os demais grupos de compostos (HPAs, PCBs e LABs) foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N da Agilent Technologies. A aquisição dos dados foi feita em monitoramento seletivo de íons (SIM).

Os esteróiss foram extraídos de 20 g de sedimento também por Soxhlet por 8 horas contendo etanol e α -colestano como padrão “surrogate” segundo procedimento de Kawakami e Montone (2002). A purificação foi feita com coluna contendo 2 g de alumina e a eluição foi feita com 15 mL de etanol. A derivatização dos esteróides, com o objetivo de transformá-los em compostos com menor ponto de ebulição, foi feita com BSTFA (bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida) + trimetilclorosilano (TMCS) 1 % em banho maria por 90 minutos a 65 °C. A identificação e quantificação foram feitas em cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas, sendo que a aquisição foi feita em SCAN.

As temperaturas do injetor e detector do GC-ECD foram de 280 °C e 300 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o hidrogênio ultra puro e o gás auxiliar foi o nitrogênio. A coluna cromatográfica foi de 30 metros de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 5 % fenilmetilsiloxana de 0,25 µm da marca J&W Scientific.

As temperaturas do GC-MS foram de 280 °C no injetor, 280 °C na interface e 300 °C na fonte de íons. A coluna cromatográfica utilizada foi da J&W Scientific com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5 % fenilmetilsiloxana.

A identificação dos pesticidas, hidrocarbonetos alifáticos, HPAs, PCBs, LABs e esteróis foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard e Supelco dos EUA, Fluka da Suíça e Sigma-Aldrich da Alemanha. Os compostos analisados no GC-MS também foram identificados através do espectro de massas. A quantificação foi feita por razões entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 5 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

4.13 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada no software STATISTIC 8 (StatSoft®, EUA) através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post hoc de Duncan, quando necessário. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Para avaliar as correlações entre as variáveis, foi utilizada a análise de correlação de Pearson entre os valores dos contaminantes orgânicos e a média das outras variáveis. As variáveis com as correlações mais relevantes foram incluídas nos resultados. Os valores representam a média \pm erro padrão. O número amostral está apresentado nas legendas das figuras.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros químicos e físicos da água nos pontos de exposição

Durante a realização dos experimentos a temperatura, pH e O₂ dissolvido da água foram monitorados no dia da exposição e no dia da coleta, em todos os pontos de exposição. Os dados dos experimentos de 2009 e 2010 podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Temperatura, pH e O₂ dissolvido da água nos pontos de exposição das tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009 e 2010.

Pontos	Temperatura (°C)	pH	O ₂ dissolvido (mg/ml)
REF ^a	22,5 ± 2,0 ^c	6,9 ± 0,4	7,2 ± 1,4
S1 ^b	21,5 ± 2,4	6,5 ± 0,6	7,3 ± 0,7
S2	21,9 ± 1,8	6,8 ± 0,4	5,6 ± 0,6
S3	21,4 ± 1,2	5,9 ± 0,6	7,0 ± 0,6

^a REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC; ^b S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição dos animais nos Rios Cubatão e do Braço. ^c Os dados representam a média ± erro padrão. ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.2 Parâmetros biológicos

Os parâmetros morfométricos das tilápias utilizadas neste estudo podem ser visualizados na Tabela 2. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no peso e comprimento dos animais, assim como no peso do fígado entre os grupos após 2 ou 7 dias de exposição. Após 7 dias de exposição foi realizada a coleta das gônadas sendo que o peso destas também não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 2. Peso, comprimento e peso do fígado e das gônadas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009 e 2010.

Grupo	Peso (g)	Comprimento (cm)	Fígado (g)	Gônadas (g)
<i>Dois dias</i>				
REF ^a (n = 20)	155,4 ± 58 ^c	19,4 ± 2,3	2,7 ± 1,0	n.c. ^d
S1 ^b (n = 17)	171,3 ± 66,1	19,7 ± 1,8	2,8 ± 1,4	n.c.
S2 (n = 20)	174,5 ± 62,5	20,4 ± 2,8	2,6 ± 1,6	n.c.
S3 (n = 20)	166,1 ± 50,2	20,2 ± 1,7	2,5 ± 0,9	n.c.
<i>Sete dias</i>				
REF (n=20)	169,8 ± 52,0	20,6 ± 2,1	1,8 ± 0,5	1,2 ± 1,4
S1 (n = 20)	163,5 ± 44,5	19,9 ± 1,6	2,1 ± 0,7	1,2 ± 1,7
S2 (n = 10)	166,2 ± 26,6	20,3 ± 1,1	3,7 ± 1,4	0,7 ± 0,5
S3 (n = 16)	176,4 ± 69,7	19,9 ± 2,7	3,3 ± 1,9	1,3 ± 1,3

^a REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC; ^b S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição dos animais nos Rios Cubatão e do Braço; ^c Os dados representam a média ± erro padrão. ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan ($p < 0,05$). ^d Não coletado.

5.3 Determinação de compostos orgânicos no sedimento dos pontos de exposição e no fígado dos animais

Foi realizada a coleta de fígado dos animais e sedimento dos Rios Cubatão e do Braço para análise de compostos orgânicos nos anos de 2009 e 2010. No entanto os dados apresentados são somente do ano de 2009, uma vez que a análise de 2010 ainda não foi realizada. Os dados da análise de contaminantes orgânicos de 2009 podem ser visualizados nas Tabelas 3 a 5 e na Figura 6, os valores obtidos são derivados de 3 amostras de cada ponto de estudo que foram agrupadas antes da análise.

5.3.1 HPAs no sedimento

A concentração de HPAs no sedimento apresentou uma variação de 11,6 a 1179 ng/g de sedimento e a amostra S2 apresentou a maior concentração de HPAs totais seguida pela amostra do ponto S3. Ainda em relação aos HPAs, as maiores concentrações de naftaleno e benzo(a)pireno, assim como vários outros derivados de HPAs, também foram encontradas nas amostras de sedimento dos pontos S2 e S3 (Tabela 3). Alguns HPAs como o perileno podem ser derivados de fontes diferentes da combustão de material orgânico (VENKATESAN, 1988). As amostras de sedimento analisadas apresentaram um intervalo da porcentagem de perileno em relação aos HPAs totais de 9 a 69%. O perfil das amostras considerando os HPAs sem o perileno mostrou que ponto S2 apresenta concentração similar ao ponto S3 (708 a 770 ng/g de sedimento), que ainda podem ser consideradas altas (Tabela 3), sugerindo aporte antrópico de HPAs nestas regiões.

5.3.2 PCBs no sedimento

As concentrações de PCBs de todas as amostras de sedimento coletadas em Joinville, SC, apresentaram-se abaixo do limite de detecção do método (dados não mostrados).

5.3.3 Organoclorados no sedimento

As concentrações de pesticidas organoclorados totais foram de 0,15 a 2,25 ng/g para os DDTs, sendo que a maior concentração de DDTs foi encontrada no ponto S2 (Tabela 4). O *p,p'*-DDT foi o composto mais abundante nas amostras do grupo REF, S2 e S3, sendo no ponto S2 a maior concentração (Tabela 4), o que pode significar a presença de resíduos do produto técnico.

Tabela 3. Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de sedimento dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009.

	REF ^a	S1 ^b	S2	S3
Naftaleno	2,78 ^c	2,47	53,7	80,8
Bifenil	<1,30	<1,30	9,92	12,4
ΣEtilnaftalenos	<2,60	<2,60	7,47	9,12
ΣDimetilnaftalenos	3,67	3,37	108	86,9
Fenantreno	<2,60	<2,60	33,1	45,2
Fluoranteno	<1,30	<1,30	22,4	42,6
Pireno	<1,30	<1,30	22,6	62,3
Benzo(a)pireno	<1,10	<1,10	9,07	14,3
Perileno	1,63	26,8	471	79,5
HPAs totais	11,6	38,6	1179	857
HPAs totais sem perileno	10,0	11,8	708	777
% perileno	14%	69%	40%	9%

^a REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC; ^b S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição dos animais nos Rios Cubatão e do Braço. ^c Unidade de medida: ng/g de sedimento.

5.3.4 LABs no sedimento

As concentrações de LABs analisados nas amostras de sedimento variaram de <0,99 a 655 ng/g de sedimento, sendo na amostra S2 a maior concentração (Tabela 4), indicando descarga de efluentes domésticos.

4.3.5 Hidrocarbonetos alifáticos no sedimento

A concentração de alifáticos totais encontrada nas amostras de sedimento de Joinville, SC, variou de 2,4 a 203 µg/g de sedimento, sendo as maiores concentrações nos pontos S2 e S3. A razão pristano/fitano (Pri/Fit) apresentou um intervalo de 1,10 a 203 nas amostras de sedimento analisadas, com razões 1,1 e 1,43 nas mostras S2 e S3, respectivamente, e 203 no grupo REF (Tabela 4), o que sugere que os pontos S2 e S3 estão sofrendo introdução antrópica de

hidrocarbonetos alifáticos, uma vez que razões Pri/Fit entre 3 e 5 indicam predomínio de hidrocarbonetos alifáticos de origem antrópica (STEIHAUER e BOEHM, 1992).

Um dos métodos para se diferenciar os hidrocarbonetos do petróleo dos biogênicos é o índice de preferência de carbonos (CPI) (BOULOUBASSI *et al.*, 1997). Todos os valores de CPI nas amostras foram maiores do que 1 (4,0 a 10,9), indicando que também há predominância na introdução de hidrocarbonetos provenientes de plantas superiores na área de estudo. Um dos indicadores mais importantes da presença de hidrocarbonetos do petróleo, em sedimentos, na análise por cromatografia em fase gasosa, é a elevação na linha de base do cromatograma, caracterizada pela presença de uma mistura de compostos ramificados e cíclicos, denominada mistura complexa não resolvida (MCNR) (FARRINGTON *et al.*, 1977). A Figura 6 apresenta os cromatogramas das amostras do ponto S2 que apresentou elevação da linha de base e do ponto REF que não apresentou este padrão, sugerindo contaminação por derivados de petróleo nas regiões S2 e S3, que também demonstrou este padrão (Tabela 4).

5.3.6 Esteróis no sedimento

As concentrações de esteróides totais variaram de 10,5 a 32,3 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (Tabela 4), sendo que o ponto S2 apresentou a maior concentração de esteróis totais, como mostra a Tabela 4. Uma razão coprostanol/(coprostanol + colestanol) de 0,70 a 1,0 indica um local contaminado por esgoto. A amostra do ponto S2 apresentou uma razão 0,81 (Tabela 4). Em relação às concentrações de coprostanol, com exceção do ponto S1, todos os pontos de coleta apresentaram concentração de coprostanol acima ou muito próximo de 0,5 $\mu\text{g/g}$. Todas as amostras apresentaram epicoprostanol acima do limite de detecção do método, indicando contaminação por esgoto doméstico. A razão coprostanona/(coprostanona+colestanona) maior que 0,5 indica um ambiente moderadamente contaminado por esgoto (GRIMALT *et al.*, 1990). Todos os pontos apresentaram-se acima desse limite (Tabela 4), também indicando a presença de esgoto doméstico nos pontos de estudo.

Tabela 4. Concentrações de contaminantes orgânicos em amostras de sedimento dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009.

	REF ^a	S1 ^b	S2	S3
<i>Pesticidas Organoclorados</i> (ng/g)				
<i>p,p'</i> -DDE	0,5	0,15	0,68	0,22
<i>p,p'</i> -DDT	1,22	<0,37	0,68	0,64
DDTs totais	2,07	0,15	2,25	1,02
<i>Hidrocarbonetos alifáticos</i> (µg/g)				
n-alcenos totais	2,79	2,4	16,8	0,93
Alifáticos totais	2,79	2,4	203	23,4
Índice de Preferência de Carbonos (CPI)	7,5	8,8	4	10,9
MCNR	<5,34	<5,34	173	21,7
Pristano	0,778	<0,008	0,409	0,013
Fitano	0,004	<0,002	0,37	0,009
Razão Pristano/Fitano	203	n.c. ^c	1,1	1,43
<i>Alquilbenzeno lineares</i> (LABs) (ng/g)				
(7+6)-C13-LAB	3,28	<1,31	181,9	6,90
5-C13-LAB	1,61	<1,31	110,59	3,64
LABs Totais	6,84	<0,99	655	19,2
<i>Esteróis (µg/g)</i>				
Coprostanol	0,46	0,15	9,12	1,38
Epicoprostanol	0,23	0,04	0,50	0,19
Coprostanona	0,45	0,19	6,57	1,84
Colestanona	0,09	0,16	0,25	0,57
Colestanol	1,62	0,79	2,10	1,68
Esteróis totais	19,1	10,5	32,3	14,3
Relações				
Coprostanol/(coprostanol+ coleanol)	0,22	0,16	0,81	0,45
coprostanona/(coprostanona+ coleanona)	0,83	0,55	0,96	0,76

^a REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC; ^b S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição dos animais nos Rios Cubatão e do Braço; ^c Não calculado.

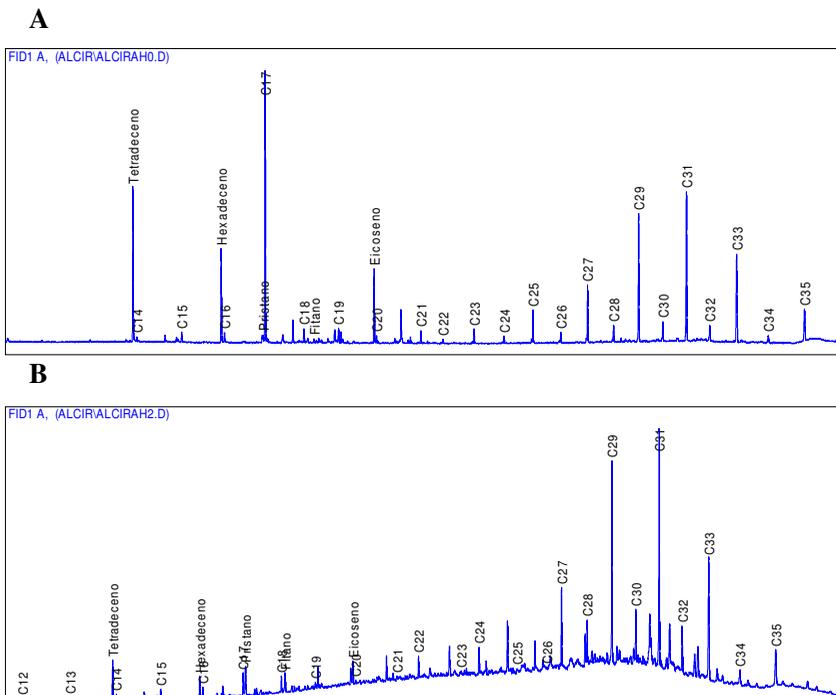


Figura 6. Cromatogramas das amostras de sedimentos coletados nos pontos REF (A) e S2 (B) em 2009, mostrando a elevação na linha de base do cromatograma, que caracteriza a presença de uma mistura complexa não resolvida (MCNR).

5.3.7 Contaminantes orgânicos no fígado

A determinação de compostos orgânicos no fígado dos animais mostrou a presença de HPAs em maiores concentrações no ponto S2, seguido pelos pontos S1 e S3 (Tabela 5). Este mesmo perfil foi encontrado nas concentrações de LABs no fígado dos animais (Tabela 5), indicando bioacumulação destes compostos devido a presença antrópica no ambiente. Já as concentrações de alcanos totais foram maiores nos pontos REF e S1 e sugerem a presença de compostos naturais nestes pontos. Níveis de PCBs, organoclorados e esteróis apresentaram-se abaixo do limite de detecção do método (dados não mostrados), sugerindo eliminação dos mesmos.

Tabela 5. Concentrações de contaminantes orgânicos em amostras de fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas por 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009.

	REF ^a	S1 ^b	S2	S3
HPAs Totais ^c	74,3	348	309	172
HPAs Totais ^d	563	4581	7720	2257
LABs Totais ^c	326	203	195	260
LABs Totais ^d	2,47	3,43	4,89	2,67
Alcanos Totais ^e	5,35	5,24	2,35	3,95

^a REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC; ^b S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição dos animais nos Rios Cubatão e do Braço; Unidades de medidas: ^c ng/g de tecido; ^d µg/g de lipídeos; ^e µg/g de tecido.

5.4 Análises de biliverdina e metabólitos de HPAs na bile

Também foi realizada a coleta da bile dos animais após 7 dias de exposição (dados de 2009) para dosagem da biliverdina e dos níveis de metabólitos de HPAs. Os níveis de biliverdina apresentaram um aumento significativo nos grupos S2 e S3 (Fig. 7A), quando comparados ao grupo REF. Valores elevados de biliverdina na bile indicam uma atividade aumentada da enzima heme oxigenase (HO).

Os níveis de metabólitos biliares de HPAs foram analisados por fluorescência em Exc/Em 290/335 nm, para observar os níveis de HPAs do tipo naftaleno (2 a 3 anéis aromáticos) e em Exc/Em 380/430 nm para medir metabólitos do tipo benzo(a)pireno (4 a 5 anéis aromáticos). Através desta análise observou-se um aumento nos níveis destes dois metabólitos de HPAs na bile dos grupos S2 e S3 (Fig. 7B), enquanto no grupo S1 foi observada apenas uma tendência.

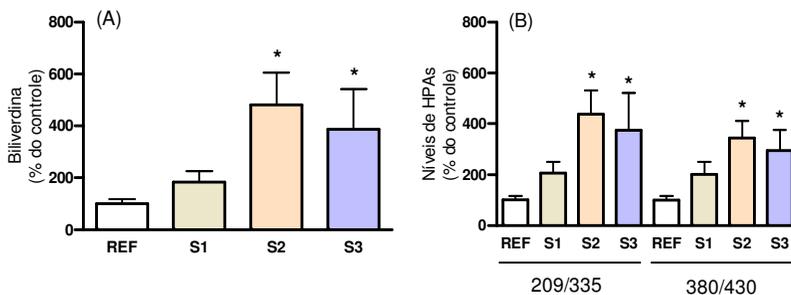


Figura 7. Níveis de biliverdina e metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, dados 2009. Níveis de biliverdina (A) e níveis de HPAs do tipo naftaleno (Ex/Em 209/335) e do tipo benzo(a)pireno (Ex/Em 380/430) na bile (B). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média do percentual em relação ao controle \pm erro padrão ($n = 6 - 8$). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

5.5 Imunodeteção das isoformas CYP1A, CYP2B e CYP3A e atividade enzimática da EROD

A expressão de diferentes isoformas de citocromos P450 e a atividade EROD também foram analisadas no fígado dos animais. Nos experimentos de 2009 e 2010, após 2 dias de exposição, foi observado um aumento na atividade da EROD (Fig. 8A e 8B) no grupo S2, juntamente com um aumento na expressão da isoforma CYP1A (Fig. 9A e 9B) neste mesmo grupo.

Após 7 dias de exposição (experimento de 2010) não foi encontrada alteração na atividade da EROD (Fig. 8C), entretanto a expressão da isoforma CYP1A aumentou ~100% no grupo S2 (Fig. 9C). No grupo S3 a expressão de CYP1A foi maior que no grupo REF, no entanto o aumento não foi significativo (Fig. 9C).

A expressão da isoforma CYP2B não foi alterada após 2 dias de exposição em nenhum dos experimentos (2009 e 2010) (Fig. 10A e 10B), já após 7 dias de exposição a expressão da isoforma CYP2B

apresentou um aumento (2010) no grupo S2 quando comparado ao grupo REF (Fig. 10C).

A expressão da isoforma CYP3A permaneceu inalterada após 2 (2009 e 2010) e 7 (2010) dias de exposição em (Fig. 11).

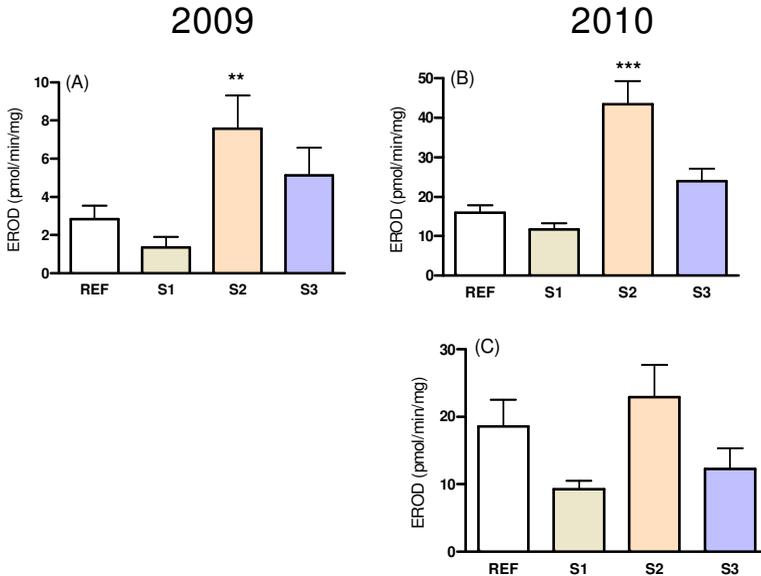


Figura 8. Atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) na fração microsomal do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da EROD após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da EROD após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da EROD após 7 dias de exposição em 2010 (C). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão (n = 3-10). **p<0,01, ***p<0,001, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

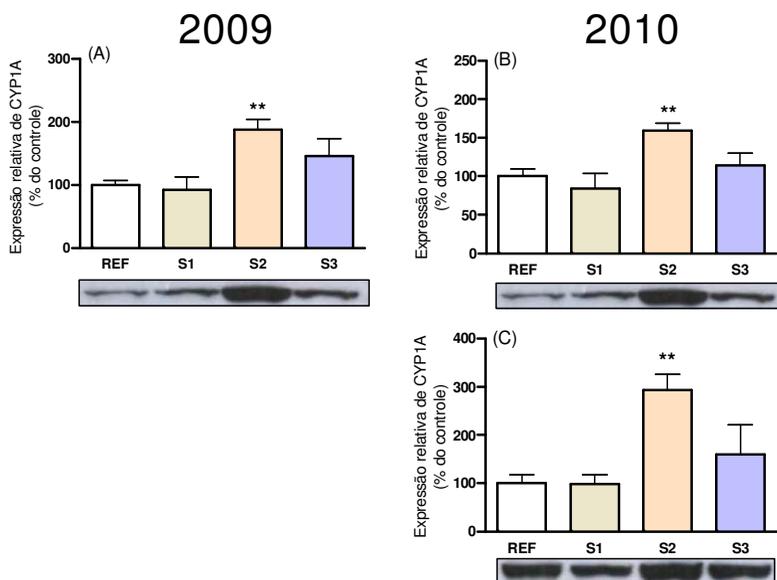


Figura 9. Imunodeteccção da isoforma 1A do citocromo P450 (CYP1A) na fração microsossoma do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Expressão de CYP1A após 2 dias de exposição em 2009 (A), expressão de CYP1A após 2 dias de exposição em 2010 (B), expressão de CYP1A após 7 dias de exposição em 2010 (C). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média do percentual em relação ao controle \pm erro padrão (n = 6). **p<0,01, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

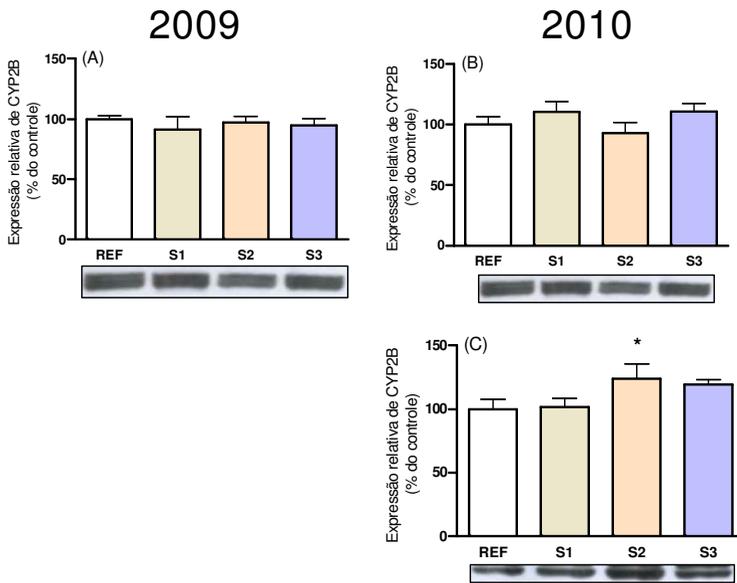


Figura 10. Imunodeteccção da isoforma 2B do citocromo P450 (CYP2B) na fração microsomal do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Expressão de CYP2B após 2 dias de exposição em 2009 (A), expressão de CYP2B após 2 dias de exposição em 2010 (B), expressão de CYP2B após 7 dias de exposição em 2010 (C). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média do percentual em relação ao controle \pm erro padrão (n = 6). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

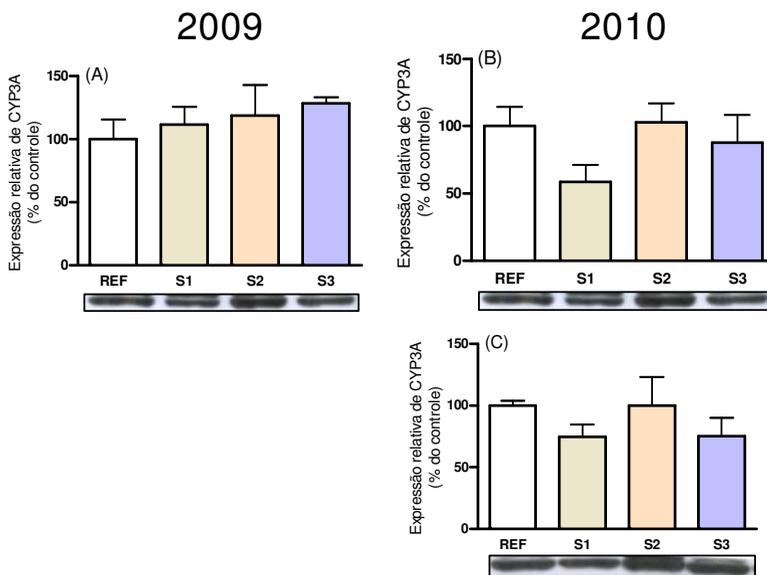


Figura 11. Imunodeteção da isoforma 3A do citocromo P450 (CYP3A) na fração microsomal do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Expressão de CYP3A após 2 dias de exposição em 2009 (A), expressão de CYP3A após 2 dias de exposição em 2010 (B), expressão de CYP3A após 7 dias de exposição em 2010 (C). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média do percentual em relação ao controle \pm erro padrão (n = 6). ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.6 Correlação entre a atividade da EROD, expressão de CYP1A e contaminantes orgânicos

A Tabela 6 apresenta a análise de correlação entre vários parâmetros que indicam os níveis de CYP1A e níveis de contaminantes orgânicos. Fica evidente que a média da atividade EROD (2 dias) e a expressão de CYP1A (2 e 7 dias) apresentam boa correlação positiva com os níveis de HPAs no sedimento e na bile. Da mesma forma que os

HPAs da bile e a biliverdina apresentam o mesmo padrão de correlação positiva com a atividade EROD e com os níveis de CYP1A. Também fica evidente a correlação negativa dos níveis de alcanos totais no tecido, a atividade EROD e a expressão de CYP1A. Os alcanos totais do tecido apresentaram correlação negativa com outras variáveis: biliverdina, alcanos do sedimento, HPAs do sedimento, da bile e do tecido. Os HPAs do fígado são representados pelo fenantreno, uma vez que os HPAs totais não mostraram correlação com os demais parâmetros. Somente foi possível observar correlação positiva entre os níveis de HPAs determinados no fígado com os alcanos e com a expressão de CYP1A. As demais correlações podem ser observadas na matriz de correlação de Pearson apresentada na Tabela 6. Correlações entre outros contaminantes, a atividade EROD e a expressão de CYP1A não foram apresentadas por não haver correlações relevantes. Chama a atenção que a atividade EROD de 7 dias não tem correlação significativa com nenhuma variável, indicando que possa haver algum fator que perturbe esta atividade, uma vez que a expressão de CYP1A demonstrou ótima correlação com os outros parâmetros apresentados.

Tabela 6. Matriz de correlação entre parâmetros analisados no fígado e na bile de tilápias Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas por 2 e 7 dias e os níveis de contaminantes orgânicos no fígado dos animais e no sedimento dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.

	EROD 2 dias	EROD 7 dias	CYP1A 2 dias	CYP1A 7 dias	Alcanos fígado	Alcanos sedimento	Biliverdina	HPAs bile	HPAs sedimento	HPAs fígado (Fenantreno)
EROD 2 dias		0,71	0,99**	0,95*	-0,96*	0,76	0,90 ^a	0,85 ^a	0,96*	0,78
EROD 7 dias	0,71		0,63	0,70	-0,61	0,80	0,36	0,27	0,48	0,66
CYP1A 2 dias	0,99**	0,63		0,97*	-0,99**	0,78	0,95*	0,91*	0,98**	0,83 ^a
CYP1A 7 dias	0,95*	0,70	0,97*		-0,99**	0,91*	0,90 ^a	0,86 ^a	0,92*	0,94*
Alcanos fígado	-0,96*	-0,61	-0,99**	-0,99**		-0,84 ^a	-0,95*	-0,92*	-0,97*	-0,89 ^a
Alcanos sedimento	0,76	0,80	0,78	0,91*	-0,84 ^a		0,65	0,60	0,67	0,97*
Biliverdina	0,90 ^a	0,36	0,95*	0,90 ^a	-0,95*	0,65		0,99**	0,98**	0,77
HPAs bile	0,85 ^a	0,27	0,91*	0,86 ^a	-0,92*	0,60	0,99**		0,96*	0,73
HPAs sedimento	0,96*	0,48	0,98**	0,92*	-0,97*	0,67	0,98**	0,96*		0,75
HPAs fígado	0,78	0,66	0,83 ^a	0,94*	-0,89 ^a	0,97*	0,77	0,73	0,75	

Os valores apresentados correspondem ao coeficiente de determinação (r^2) para uma relação de linearidade. As correlações significativas entre os parâmetros estão em negrito, e indicadas com asteriscos para os seguintes valores: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ e com ^a para $p < 0,1$.

5.7 Análise de tióis

A exposição dos animais durante 2 dias em gaiolas nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em 2009, levou a uma diminuição nos níveis de GSH-t no fígado (Fig. 12A) nos três grupos (S1, S2 e S3), quando comparados ao grupo REF. Este decréscimo nos níveis de GSH-t também foi observado aos 7 dias de exposição, exceto no grupo S2 (Fig. 12C). Diferentemente de 2009, no experimento de 2010 não foram observadas alterações nos níveis de GSH-t no fígado em nenhum dos grupos de estudo (Fig. 12B e 12D).

Assim como a GSH-t do fígado após 2 dias de exposição no experimento de 2009, os níveis de NPSH no fígado também apresentaram uma diminuição significativa nos grupos S1 e S3, mas não no grupo S2 (Fig. 13A). Em 2010 esta diminuição foi observada somente no grupo S1 (Fig. 13B). Após 7 dias de exposição tanto em 2009 como em 2010 os níveis de NPSH do fígado nos três grupos foram equivalentes aos do grupo REF (Fig. 13C e 13D).

Com relação aos níveis de GSH-t no sangue, foi observada uma diminuição nos grupos S2 e S3 após 2 dias de exposição no experimento de 2009 (Fig. 14A), enquanto o grupo S3 apresentou apenas uma tendência. Já no ano de 2010, os níveis de GSH-t no sangue não foram alterados após 2 dias de exposição (Fig. 14B). Não foi possível dosar os níveis de GSH-t no sangue após 7 dias de exposição devido a problemas técnicos nos dois anos de experimento.

Os níveis de tióis plasmáticos diminuíram nos três grupos (S1, S2 e S3), quando comparados ao grupo REF após 2 dias de exposição no experimento de 2009 (Fig. 15A). Após 7 dias de exposição em 2009 os níveis de tióis plasmáticos retornaram para níveis equivalentes aos do grupo REF (Fig. 15C). Em 2010 os níveis de tióis plasmáticos não alteraram após 2 dias de exposição (Fig. 15B) e após 7 dias de exposição observou-se uma diminuição no grupo S1 (Fig. 15D).

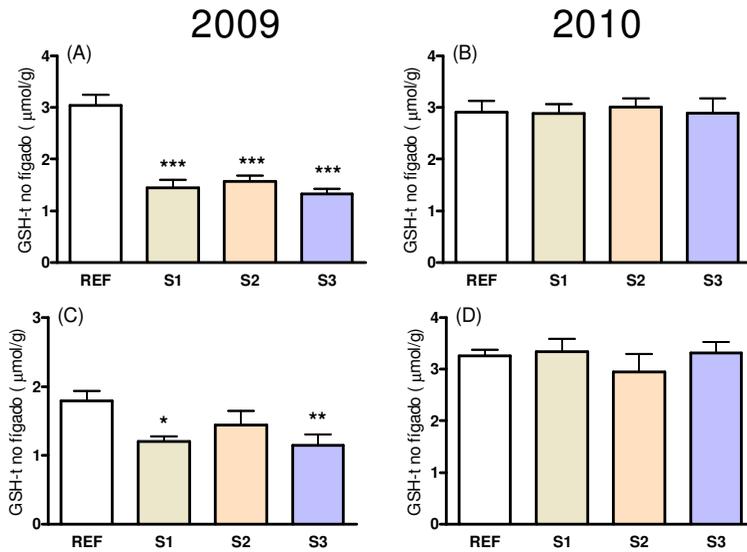


Figura 12. Níveis de glutatona total (GSH-t) no fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Níveis de GSH-t no fígado após 2 dias de exposição em 2009 (A), níveis de GSH-t no fígado após 2 dias de exposição em 2010 (B), níveis de GSH-t no fígado após 7 dias de exposição em 2009 (C), níveis de GSH-t no fígado após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

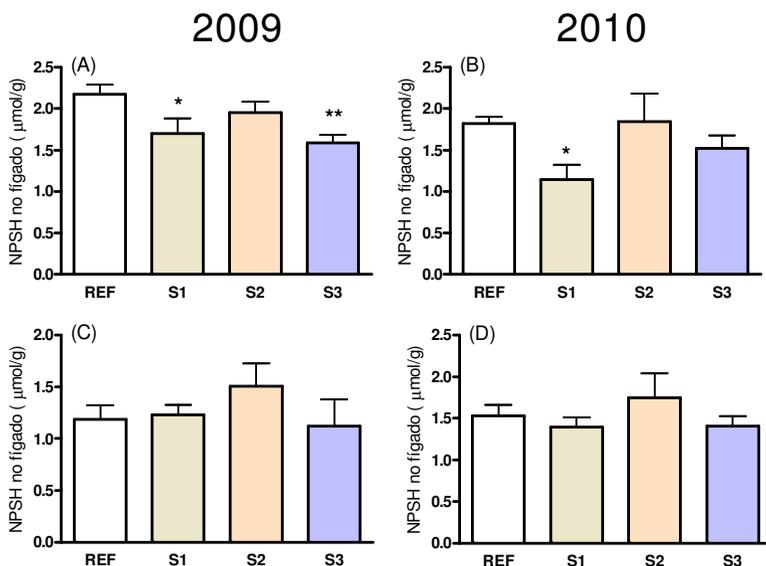


Figura 13. Níveis de tióis não-protéicos (NPSH) no fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Níveis de NPSH após 2 dias de exposição em 2009 (A), níveis de NPSH após 2 dias de exposição em 2010 (B), níveis de NPSH após 7 dias de exposição em 2009 (C), níveis de NPSH após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão (n = 3 – 10). *p<0,05, **p<0,01, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

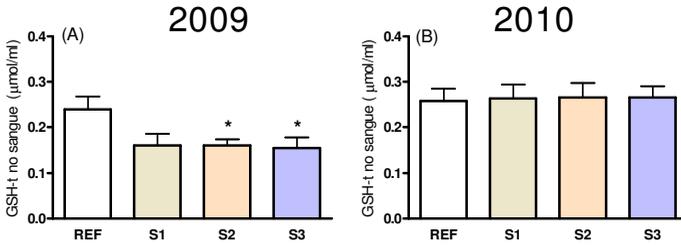


Figura 14. Níveis de glutatona total (GSH-t) no sangue de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Níveis de GSH-t no sangue após 2 dias de exposição em 2009 (A), níveis de GSH-t no sangue após 2 dias de exposição em 2010 (B). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão (n = 3 – 10). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

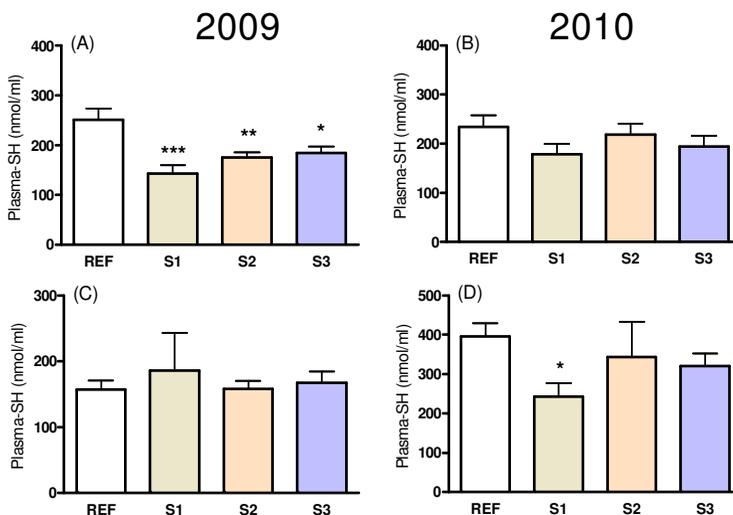


Figura 15. Níveis de tióis plasmáticos (Plasma-SH) de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Níveis de tióis plasmáticos após 2 dias de exposição em 2009 (A), níveis de tióis plasmáticos após 2 dias de exposição em 2010 (B), níveis de tióis plasmáticos após 7 dias de exposição em 2009 (C), níveis de tióis plasmáticos após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

5.8 Análises enzimáticas

5.8.1 Atividades de enzimas antioxidantes

As atividades de várias enzimas antioxidantes, ou relacionadas, foram analisadas no fígado das tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após a exposição em gaiolas por 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, em dois experimentos (2009 e 2010). Os dados podem ser visualizados nas Figuras 16 a 22.

A Figura 16 mostra que a atividade da enzima CAT foi alterada somente no ano de 2010 após 2 dias de exposição, onde foi observada uma diminuição na sua atividade no grupo S1 (Fig. 16B).

Após 2 dias de exposição a atividade da enzima GPx aumentou no grupo S3 em 2009 (Fig. 17A) e em 2010 aumentou nos grupos S1 e S2 (Fig. 17B). Após 7 dias de exposição em 2009 foi observado um aumento da atividade da GPx no grupo S1 (Fig. 17C), já nos demais pontos em 2009 e em 2010 a atividade da GPx foi equivalente ao grupo REF (Fig. 17C e 17D).

Em relação a enzima GR, foi observada uma diminuição da sua atividade no grupo S1 após 2 dias de exposição no ano de 2010 (Fig. 18B), quando comparado ao grupo REF. Esta diminuição também foi observada no grupo S1 após 7 dias de exposição no ano de 2009 (Fig. 18C). Não foram evidenciadas alterações na atividade da GR nos demais grupos e períodos (Fig. 18).

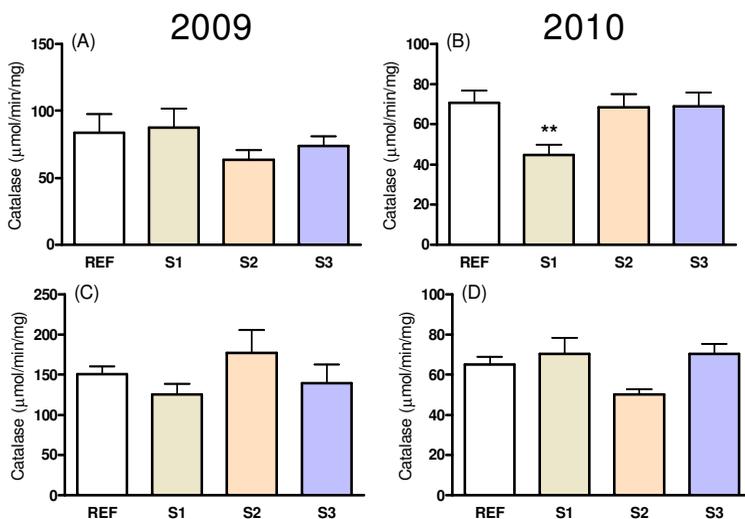


Figura 16. Atividade da enzima catalase (CAT) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da enzima CAT após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da enzima CAT após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da enzima CAT após 7 dias de exposição em 2009 (C), atividade da enzima CAT após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). ** $p < 0,01$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

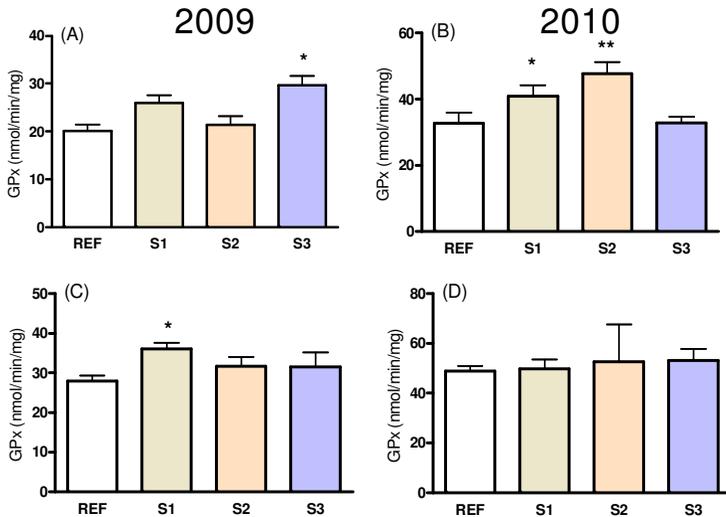


Figura 17. Atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da enzima GPx após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da enzima GPx após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da enzima GPx após 7 dias de exposição em 2009 (C), atividade da enzima GPx após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão (n = 3 – 10). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

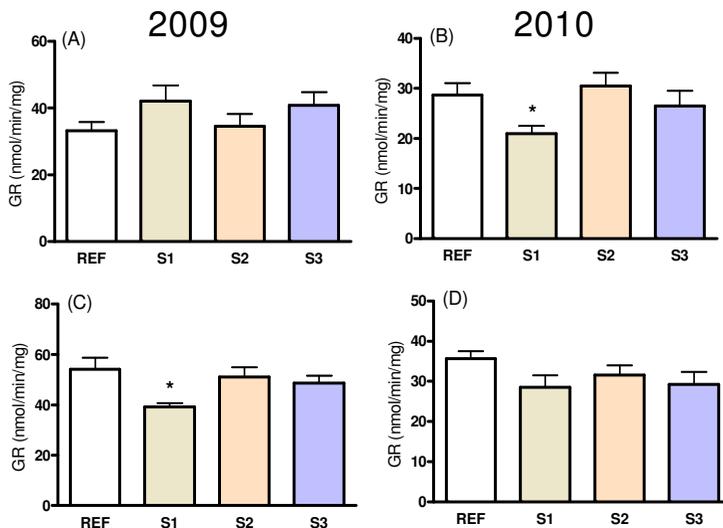


Figura 18. Atividade da enzima glutationa redutase (GR) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da enzima GR após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da enzima GR após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da enzima GR após 7 dias de exposição em 2009 (C), atividade da enzima GR após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

A Figura 19 mostra a atividade da enzima G6PDH nos experimentos de 2009 e 2010. Foi observada uma diminuição da atividade da G6PDH nos grupos S1 e S3 após 2 dias de exposição no ano de 2010 (Fig. 19B), quando comparados ao grupo REF. Nos demais períodos não foram encontradas alterações na atividade desta enzima (Fig. 19).

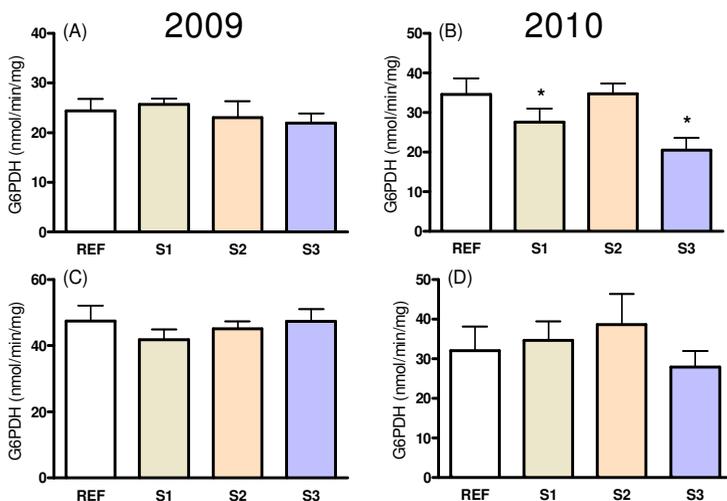


Figura 19. Atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da enzima G6PDH após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da enzima G6PDH após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da enzima G6PDH após 7 dias de exposição em 2009 (C), atividade da enzima G6PDH após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

Além das enzimas acima citadas, também foram analisadas as atividades das enzimas TrxR, glioxalase e GST após 2 e 7 dias de exposição, em 2009 e 2010 (Fig. 20, 21 e 22). A atividade da enzima TrxR apresentou uma diminuição no grupo S1 após 2 dias de exposição no ano de 2010, como mostra a Figura 20B. Não foram observadas alterações na atividade da TrxR nos demais períodos (Fig. 20).

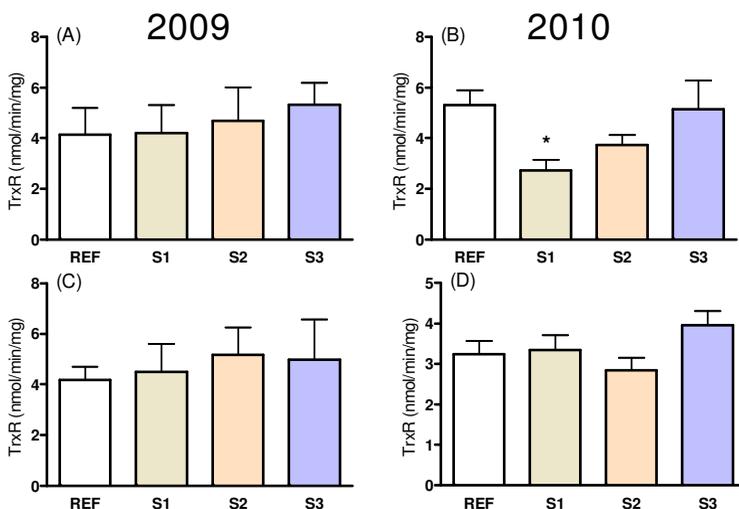


Figura 20. Atividade da enzima tioredoxina redutase (TrxR) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da enzima TrxR após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da enzima TrxR após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da enzima TrxR após 7 dias de exposição em 2009 (C), atividade da enzima TrxR após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

Em 2009, após 2 dias de exposição foi observado um aumento na atividade da enzima glicoxalase nos grupos S2 e S3 (Fig. 21A), já após 7 dias de exposição observou-se uma diminuição na atividade desta enzima no grupo S3 (Fig. 21C). Em 2010, após 2 dias de exposição a atividade da glicoxalase diminuiu nos grupos S1 e S3 (Fig. 21B). Na campanha de 2010, após 7 dias de exposição, uma diminuição na atividade da glicoxalase foi observada no grupo S2, sendo que nos grupos S1 e S3 a atividade foi equivalente ao grupo REF (Fig. 21D).

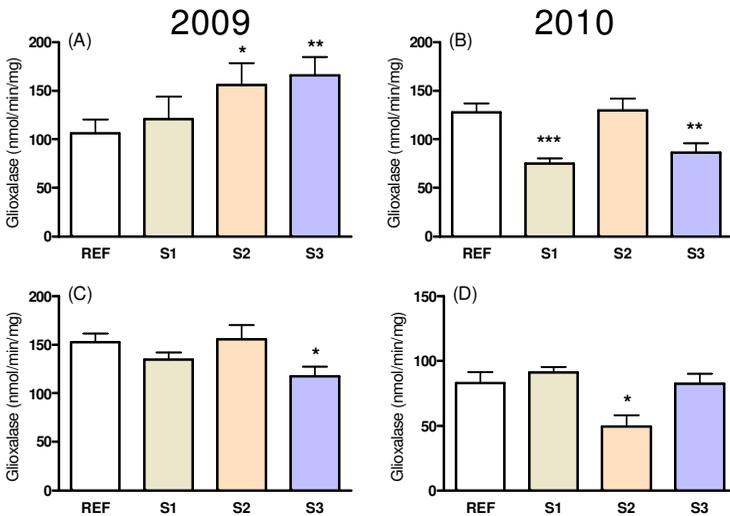


Figura 21. Atividade da enzima glioxalase na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da enzima glioxalase após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da enzima glioxalase após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da enzima glioxalase após 7 dias de exposição em 2009 (C), atividade da enzima glioxalase após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

A atividade da enzima GST não foi alterada em nenhum grupo ou período estudado (Fig. 22).

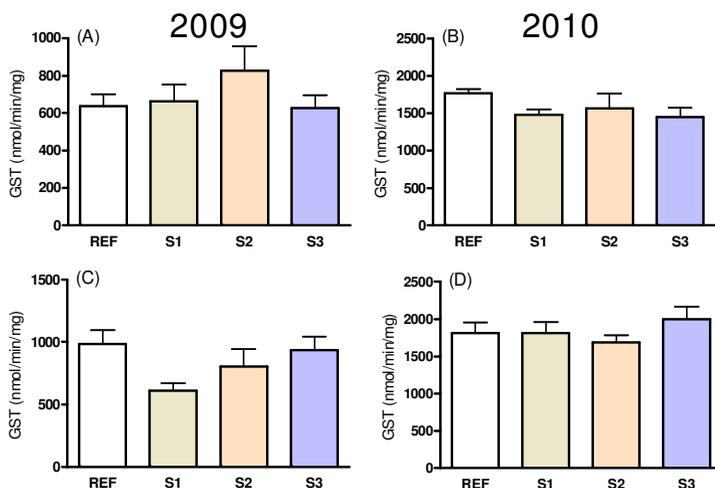


Figura 22. Atividade da enzima glutationa S-transferase (GST) na fração solúvel do fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da enzima GST após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da enzima GST após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da enzima GST após 7 dias de exposição em 2009 (C), atividade da enzima GST após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

5.8.2 Atividade colinesterásica

Além das atividades das enzimas antioxidantes no fígado, também foi analisada a atividade colinesterásica no plasma dos animais após 2 e 7 dias de exposição nos experimentos de 2009 e 2010 (Fig. 23 e 24). Após 2 dias de exposição em 2010 as atividades das enzimas AChE (Fig. 23B) e BuChE (Fig. 24B) diminuíram no ponto S1, quando comparadas ao grupo REF. No entanto, nos demais grupos as atividades da AChE e BuChE foram equivalentes ao grupo REF (Fig. 23 e 24A, C e D).

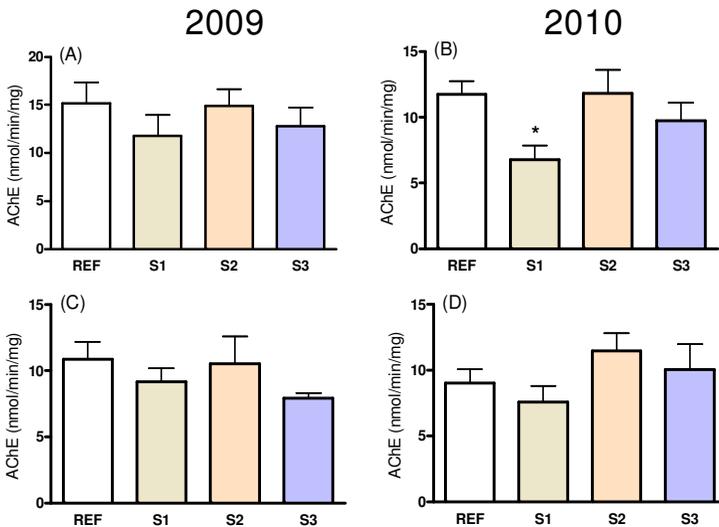


Figura 23. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no plasma de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da enzima AChE após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da enzima AChE após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da enzima AChE após 7 dias de exposição em 2009 (C), atividade da enzima AChE após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

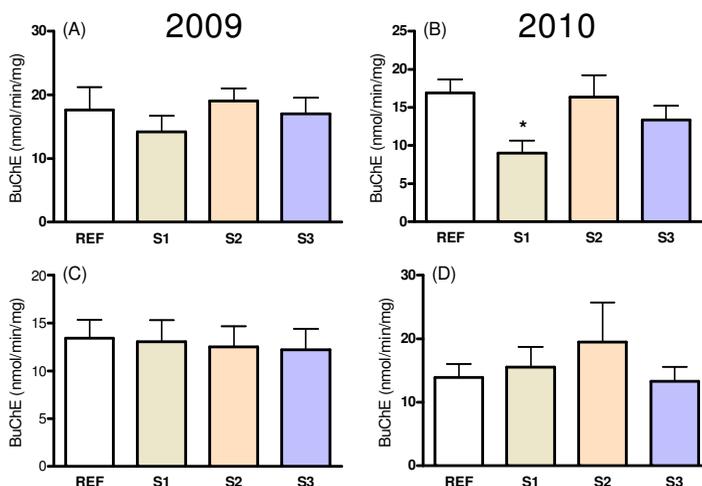


Figura 24. Atividade da enzima butirilcolinesterase (BuChE) no plasma de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Atividade da enzima BuChE após 2 dias de exposição em 2009 (A), atividade da enzima BuChE após 2 dias de exposição em 2010 (B), atividade da enzima BuChE após 7 dias de exposição em 2009 (C), atividade da enzima BuChE após 7 dias de exposição em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

5.9 Imunodeteção da Prx6 e da clivagem da proteína PARP1

No fígado dos animais também foi realizada a imunodeteção da clivagem da proteína de reparo aos danos no DNA, PARP1, e da enzima antioxidante Prx6 (dados 2010). Após 2 dias de exposição não foi encontrada nenhuma alteração na expressão de ambas as proteínas, como mostram as Figuras 25A e 26A. No entanto após 7 dias de exposição foi observado um aumento na clivagem da PARP1 e um aumento na expressão da Prx6 no grupo S2 (Fig. 25B e 26B), quando comparadas ao grupo REF.

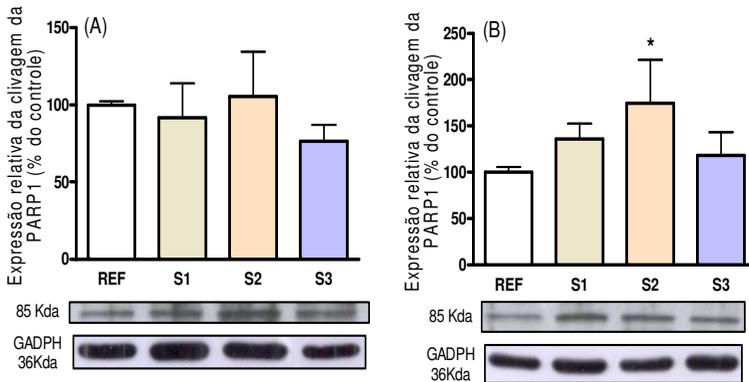


Figura 25. Imunodeteção da clivagem da proteína poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1) no fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, dados 2010. Expressão da clivagem da PARP1 após 2 dias de exposição em 2010 (A) e expressão da clivagem da PAPP1 após 7 dias de exposição em 2010 (B). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média do percentual em relação ao controle \pm erro padrão ($n = 8$), normalizados pela proteína constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

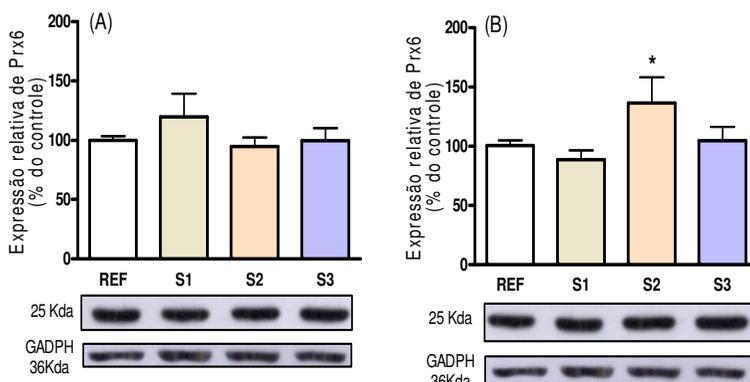


Figura 26. Imunodeteção da peroxirredoxina 6 (Prx6) no fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, dados 2010. Expressão da Prx6 após 2 dias de exposição em 2010 (A) e expressão da Prx6 após 7 dias de exposição em 2010 (B). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média do percentual em relação ao controle \pm erro padrão ($n = 3 - 8$), normalizados pela proteína constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

5.10 Dano ao DNA estimado pelo teste cometa

O teste cometa foi realizado no sangue dos animais para observar possíveis danos oxidativos ao DNA (somente no experimento de 2010). Após 2 dias de exposição foi observado um aumento no dano ao DNA nos três grupos de estudo (S1, S2 e S3), como mostra a Figura 27A. Já após 7 dias de exposição o dano ao DNA nos três pontos de exposição permaneceu equivalente ao grupo REF, entretanto com índice de dano basal mais elevado (200) quando comparado ao grupo REF de 2 dias de exposição (150; Fig. 27B).

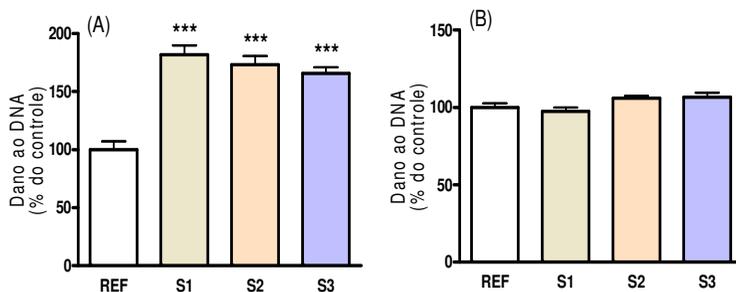


Figura 27. Dano ao DNA estimado pelo teste cometa no sangue de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, dados 2010. Dano ao DNA no sangue após 2 dias exposição em 2010 (A) e dano ao DNA no sangue após 7 dias de exposição em 2010 (B). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média do percentual em relação ao controle \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). *** $p < 0,001$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

5.11 Hemoglobina

No sangue dos animais também foi analisado os níveis de Hb após 2 e 7 dias de exposição nos anos de 2009 e 2010. Observou-se uma diminuição nos níveis de Hb no grupo S2 após 2 dias de exposição no ano de 2009 (Fig. 28A). Nos demais grupos experimentais não foram observadas alterações nos níveis de Hb (Fig. 28B, C e D).

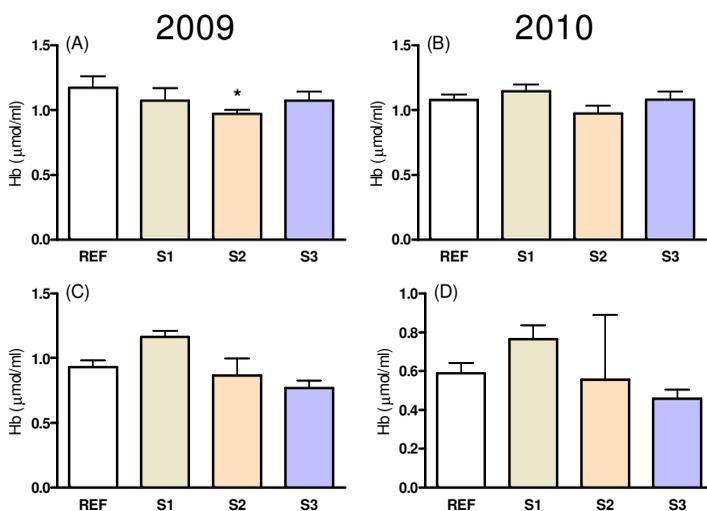


Figura 28. Níveis de hemoglobina (Hb) no sangue de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC. Níveis de Hb no sangue após 2 dias em 2009 (A), níveis de Hb no sangue após 2 dias em 2010 (B), níveis de Hb no sangue após 7 dias em 2009 (C), níveis de Hb no sangue após 7 dias em 2010 (D). REF indica o ponto de manutenção dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho; S1, S2 e S3 indicam os pontos de exposição em Joinville, SC. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n = 3 - 10$). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan.

6. DISCUSSÃO

6.1 Parâmetros químicos e físicos da água nos pontos de exposição

Fatores abióticos podem influenciar as respostas antioxidantes, no entanto nos experimentos realizados, tanto em 2009, quanto em 2010, não foram observadas diferenças significativas em parâmetros abióticos como temperatura, pH e O₂ dissolvido da água (Tabela 1).

Os valores normais de O₂ dissolvido na água situam-se em torno de 8 mg/L a 25 °C (DERISIO, 1992). Os menores valores de O₂ dissolvido foram encontrados nos pontos S2 e S3, em 2009 e 2010, respectivamente (Tabela 1). Apesar de valores abaixo de 8 mg/L (5,6 a 7,3 mg/L), os valores encontrados são aceitáveis, sendo descartada a hipótese de hipóxia.

Variações na temperatura também podem afetar os organismos aquáticos, principalmente organismos ectotérmicos, sendo que diferentes mecanismos são responsáveis pela indução de estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2010). Os valores médios de temperatura encontrados, oscilando entre 21 e 22,5 °C (Tabela 1), estão dentro de valores esperados para a época do ano.

A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais dá-se diretamente devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies. O efeito indireto também é muito importante, podendo, determinadas condições de pH, contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos, como metais pesados (POLEO *et al.*, 1997). Os valores de pH nos pontos de exposição oscilaram entre 5,6 e 7,2 (Tabela 1), valores estes que estão dentro ou próximos dos valores recomendados pela Resolução CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986, para proteção da vida aquática.

6.2 Parâmetros biológicos

Após as exposições de 2 ou 7 dias não foram observadas alterações no peso e comprimento dos animais, assim como no peso do fígado e das gônadas, nos dois anos de experimentos (Tabela 2). Alterações dos parâmetros biológicos podem estar associadas ao estado nutricional dos animais cativos e alterações no tamanho do fígado

também podem estar relacionadas a toxicidade de compostos químicos, sendo que alterações no tamanho do fígado de peixes já foram relatadas após exposição prolongada a contaminantes, tais como compostos orgânicos (HPAs) (FLETCHER *et al.*, 1982; FERREIRA *et al.*, 2006).

Muitos químicos lançados no ambiente aquático exercem efeitos diretos na reprodução da população aquática interferindo nos processos fisiológicos, sendo que estudos recentes demonstraram redução do tamanho das gônadas, assim como sua deterioração após exposição crônica a poluentes (LINDEROTH *et al.*, 2006; MARCHAND *et al.*, 2008; LOUIZ *et al.*, 2009), entretanto, no presente estudo, não foram encontradas diferenças no peso das gônadas dos animais estudados. Apesar de possível, o curto período de exposição limita observações de alterações no peso de órgãos, tais como o fígado e gônadas.

6.3 Contaminação aquática e metabolismo de xenobiontes

A análise de contaminantes orgânicos do sedimento e no fígado dos animais nos 3 pontos de estudo, mostrou diferentes perfis de impacto, como pode ser visualizado nas Tabelas 3 a 5.

6.3.1 LABs

Sistemas costeiros recebem grande quantidade de surfactantes por diversas vias. O intenso uso destes compostos em produtos de limpeza lidera sua presença nos esgotos domésticos devido sua forte adsorção em sedimentos lodosos. Os LABs podem ter como origem o esgoto doméstico ou industrial que não sofrem tratamento adequado antes de ser descartado em rios ou oceanos (TAKADA *et al.*, 1992). Desta maneira, as contribuições de LABs na região de estudo podem ter como origem esgotos que são lançados sem tratamento. As concentrações de LABs nas amostras de Joinville foram similares as encontradas por Martins e colaboradores (2008) na Baía de Santos (<116,5 ng/g), litoral do estado de São Paulo, onde existe um emissário submarino. A mesma região foi estudada por Medeiros e Bicego (2004), que encontraram concentrações de 25,3 a 430,6 ng/g. As concentrações de LABs totais analisados nas amostras de sedimento na região de Joinville variaram de <0,99 a 655 ng/g de sedimento (Tabela 4), sendo no ponto S2 a maior concentração, claramente indicando contaminação de origem antropogênica.

A determinação de LABs no fígado dos animais mostrou que os animais expostos ao ponto S2 apresentaram as maiores concentrações (Tabela 5). A presença destes compostos no sedimento da região e no fígado dos animais sugere o lançamento de efluentes domésticos e/ou industriais na região, principalmente nos pontos S2 e S3.

6.3.2 Organoclorados

A entrada dos pesticidas organoclorados, como os DDTs, no ambiente aquático ocorre de diversas maneiras, como pelo carreamento dos compostos pelas chuvas, lençóis freáticos e rios. Ocorre também introdução devido ao transporte atmosférico dos defensivos que se dispersaram durante a sua aplicação e se associaram a matéria orgânica da água (CLARK, 1992). A análise de pesticidas organoclorados mostrou o *p,p'*-DDT como composto mais abundante nas amostras do grupo REF, S2 e S3 (Tabela 4), sendo no ponto S2 a maior concentração, o que pode significar a presença de resíduos do produto. Entretanto, a Portaria 329 de 02/09/85 do Ministério da Agricultura proíbe seu uso desde 1997. Não há informações a respeito da sua utilização nessa região e não se pode determinar a origem destes contaminantes.

6.3.3 Esteróis

O uso dos esteróis como indicadores de poluição por esgotos domésticos é particularmente aplicável a regiões próximas a grandes centros populacionais e industriais onde são encontradas fontes de descarga de efluentes domésticos, na maioria das vezes tratada primariamente, e sendo o homem, a principal fonte dos esteróis fecais (VENKATESAN, 1990). Segundo Gonzalez-Oreja e Saiz-Salinas (1998), concentrações de coprostanol maiores que 0,10 µg/g indicam que o ambiente está contaminado por esgotos, o que foi observado em todos os pontos de coleta. A contaminação pode ser considerada alta com valores de coprostanol acima de 0,5 µg/g. Com exceção do ponto S1, todos os pontos de coleta apresentaram concentração de coprostanol acima ou muito próximo do limite de 0,5 µg/g, sendo a contaminação por esgotos domésticos considerada alta, mesmo no ponto REF.

A razão entre coprostanol e colestanol permite avaliar a origem da contaminação fecal. Os isômeros 5β (coprostanol) são mais associados com o trato intestinal de mamíferos superiores, enquanto os compostos 5α (colestanol) são produtos termodinâmicos formados por

processos bacterianos nos sedimentos. A razão coprostanol/(coprostanol + colestanol) de 0,70 a 1,0 indica um local contaminado por esgoto (GRIMALT *et al.*, 1990). A amostra do ponto S2 mostrou uma razão dentro destes limites (0,96) (Tabela 4), sugerindo a descarga de esgoto doméstico nesta região.

O epicoprostanol também é um esteroide fecal, epímero do coprostanol, praticamente ausente nas fezes humanas (SHERWIN *et al.*, 1993). Porém, pode estar associado ao material fecal, devido sua formação a partir de processos de digestão aeróbica de lodos de estações de tratamento de esgotos (MUDGE e SEGUEL, 1999). A presença de traços de epicoprostanol, desde que haja concentrações de coprostanol, sugere uma possível contaminação dos sedimentos por esgoto (GREEN e NICHOLS, 1995). Todas as amostras apresentaram epicoprostanol acima do limite de detecção do método, mais uma vez mostrando impacto por esgotos domésticos.

6.3.4 Hidrocarbonetos alifáticos

Existem várias fontes de hidrocarbonetos no ambiente e, por isso, sua distribuição varia muito de um local para outro. Grande parte desses compostos se deposita no sedimento, podendo permanecer ali durante anos (VOLKMAN *et al.*, 1992). Concentrações de alifáticos totais encontrados em sedimentos não poluídos normalmente apresentam, em média, valores de 5 µg/g (UNEP, 1992), chegando a 10 µg/g em sedimentos estuarinos e até maiores onde há contribuição significativa de plantas superiores (VOLKMAN *et al.*, 1992). As concentrações de alifáticos totais encontradas nas amostras de sedimento de Joinville, SC, variaram de 2,4 a 203 µg/g de sedimento, sendo as maiores concentrações nos pontos S2 e S3 (Tabela 4), sugerindo que estes pontos podem ter contribuição de fontes naturais de hidrocarbonetos alifáticos. Um dos métodos para se diferenciar os hidrocarbonetos do petróleo dos biogênicos é o Índice de Preferência de Carbonos (CPI). CPI próximo a 1 mostra que não há predominância de n-alcenos ímpares sobre pares, o que é uma indicação da introdução dos hidrocarbonetos provenientes do petróleo na região amostrada. Por outro lado, valores entre >5 e 7 apresentam uma contribuição biogênica predominante (BOULOUBASSI *et al.*, 1997). Com este critério, a indicação é de que há predominância de hidrocarbonetos derivados de plantas superiores em todos os pontos de estudo. Usando-se outro critério, a razão pristano/fitano (Pri/Fit), que é um parâmetro para avaliar o domínio de fontes biogênicas, tipicamente com valores entre 3 e 5 (STEIHAUER

e BOEHM, 1992), observou-se que apenas os pontos S2 e S3 indicaram uma influência antrópica na região (Tabela 4), o que também foi indicado pela elevação da linha de base na cromatografia gasosa (Fig. 6).

6.3.5 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Os HPAs, além de estarem presentes na composição do petróleo e derivados, originam-se da queima de combustíveis fósseis e, em menor proporção, da queima de biomassa vegetal e diagênese de precursores naturais (LAW e BISCAYA, 1994). As principais fontes de HPAs resultam da ação antrópica pelos processos de combustão parcial de combustíveis, derramamento acidental de petróleo e descarte de efluentes industriais e domésticos (COLOMBO *et al.*, 1989).

Baseado na análise de amostras de sedimento de regiões costeiras do Golfo de Trieste (Mar Adriático), caracterizada por ser uma área portuária de intensa atividade industrial, Notar e colaboradores (2001) sugeriram que um sedimento pode ser considerado contaminado quando a soma de HPAs atinge valores superiores a 500 ng/g, enquanto um sedimento moderadamente poluído apresenta concentrações entre 250 e 500 ng/g. As amostras de sedimento de Joinville apresentaram uma variação de 11,6 a 1179 ng/g (Tabela 3), o que segundo os intervalos sugeridos por esses autores, pode caracterizar as regiões S2 (1179 ng/g) e S3 (857 ng/g) como muito contaminadas por HPAs.

Alguns HPAs como o perileno podem ser derivados de fontes diferentes da combustão de material orgânico, como por exemplo, a transformação diagenética de precursores *in situ*. Concentrações de perileno acima de 10% dos HPAs totais podem ser atribuídas a fontes naturais (VENKATESAN, 1988). Trabalhos realizados por Aizenshtat (1973) encontraram níveis de perileno em sedimentos marinhos ricos em produtos derivados de plantas superiores, sugerindo aporte terrestre. As amostras de sedimento analisadas apresentaram um intervalo da porcentagem de perileno em relação aos HPAs totais de 9 a 69%. Entretanto, o perfil das amostras, considerando os HPAs sem o perileno, mostrou que o ponto S2 apresenta concentração similar ao ponto S3 (708 e 777 ng/g), que ainda podem ser consideradas altas (Tabela 3), mantendo a classificação anterior, como sendo estas regiões muito contaminadas por HPAs.

Em relação a análise de contaminantes orgânicos no fígado, os animais expostos ao ponto S2 apresentaram maior concentração de HPAs seguidas do ponto S1 e S3 (Tabela 5). A presença de HPAs tem

um efeito adverso na vida aquática. O acúmulo dos contaminantes pode ocorrer pela assimilação direta da água e através da ingestão de alimentos (GAGNON e DODSON, 1990). Os peixes expostos ao petróleo da coluna d'água e no sedimento podem assimilar hidrocarbonetos rapidamente. Estes compostos podem ser encontrados posteriormente nos tecidos, tais como fígado, cérebro e músculos (MALINS e HODGINS, 1981). O mecanismo de metabolização dos HPAs nos peixes é eficiente e os metabólitos polares são excretados facilmente via bile. Devido a esse processo e a simples excreção dos HPAs não transformados, os peixes que vivem em ambientes contaminados por HPAs normalmente não mostram evidências de sua bioconcentração (VARANASI *et al.*, 1989). No entanto, o fígado dos animais dos 3 pontos de exposição mostrou níveis mais altos de HPAs, quando comparados ao grupo REF, mostrando a bioacumulação de HPAs nestes tecidos (Tabela 5).

O processo de biotransformação destes compostos foi demonstrado através do aumento dos níveis de HPAs na bile dos animais expostos nos pontos S2 e S3 (Fig. 7B). O aumento na capacidade de metabolização destes compostos pode estar relacionado à indução da isoforma CYP1A, como demonstrado neste trabalho (Fig. 9), levando ao acúmulo de derivados de HPAs na bile.

6.4 Biliverdina e HPAs na bile

No presente estudo, a análise de metabólitos de HPAs por fluorescência na bile dos animais mostrou um aumento nos metabólitos do tipo bezo(a)pireno e naftaleno após a exposição aos pontos S2 e S3 (Fig. 7B). Nestas áreas, a análise de compostos orgânicos no sedimento demonstrou a presença destes mesmos compostos (Tabela 3), assim como a presença de outros derivados de HPAs, sendo que os pontos S2 e S3 mostraram as maiores concentrações de HPAs no sedimento coletado e no fígado dos animais (Tabelas 3 e 5). Os maiores níveis de HPAs na bile dos animais dos pontos S2 e S3 concordam com os dados do sedimento, que apontaram estes pontos como sendo os mais contaminados.

Estes achados sugerem que as fases II e III de biotransformação podem estar sendo ativadas, uma vez que, além da GST, outras enzimas como as uridina difosfato glicoronosil transferases, sulfotransferases e metiltransferases são importantes no processo de biotransformação de

fase II (ZAMEK-GLISZCZYNSKI *et al.*, 2006). Estes dados, juntamente com o aumento da expressão do CYP1A e da atividade da EROD (Fig. 8 e 9), são fortes indicativos de consequências negativas futuras devido a presença de contaminantes oriundos de ação antrópica nestas regiões.

Estes xenobiontes podem ativar o receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR), ativando a transcrição de CYPs e de outras enzimas (HAHN, 2002), mostrando uma regulação no sistema de biotransformação destes animais. Além disso, os CYPs produzem ERO durante o processo de metabolização destes compostos (LEE e ANDERSON, 2005), contribuindo para um aumento do estresse oxidativo, com consumo das defesas antioxidantes não enzimáticas, como observado pela diminuição da GSH-t (Fig. 12A, 12C e 14A), NPSH (Fig. 13A e 13B) e tióis do plasma (Fig. 15A). Neste sentido, o retorno de vários parâmetros para os níveis basais após 7 dias de exposição, indicam uma diminuição da condição de estresse oxidativo e concordam com os indicativos de inibição da atividade EROD aos 7 dias, bem como com a indução de defesas antioxidantes.

Apesar da redução dos níveis de GSH-t ter sido consistentemente observado em 2005 (FRANCO *et al.*, 2010) e no experimento de 2009, em 2010 somente foi observada uma redução nos níveis de NPSH no ponto S1 (2 dias) e nos tióis plasmáticos em 7 dias. As razões para tais discrepâncias não puderam ser apuradas. Ainda aguardam-se os resultados das análises de contaminantes orgânicos de 2010, o que pode ajudar a esclarecer estes fatos.

Além dos metabólitos de HPAs, também foi realizada a análise de biliverdina na bile dos animais (Fig. 7A). A biliverdina é o produto da quebra do grupamento heme da hemoglobina e de outras hemeproteínas. O excesso de grupamento heme é metabolizado no fígado, onde as heme oxigenases (HO) catalisam a conversão deste grupamento a biliverdina (DENNERY, 2004). Sendo assim, a excreção de biliverdina na bile é modulada pela atividade HO. Se a atividade da HO é modulada por estressores químicos, aumentos na dosagem de biliverdina também podem ser alterados em resposta ao estresse químico. Estudos prévios relatam que a atividade HO em peixes pode ser aumentada por poluentes ambientais, mais especificamente metais pesados (JORGENSEN *et al.*, 1998; ALAM e COOK, 2003). Em outro estudo, van den Hurk (2006) demonstrou que a atividade HO no fígado do bagre (*Ictalurus punctatus*) aumentou proporcionalmente aos níveis de biliverdina e HPAs na bile após a exposição a HPAs, indicando uma amplificação da atividade HO. Estes dados estão de acordo com os

achados do presente estudo, que mostrou um aumento nos níveis de biliverdina nos pontos S2 e S3 (Fig. 7A) após 7 dias de exposição, além da correlação positiva entre os níveis de biliverdina e HPAs da bile, indicando que a indução do CYP1A e da HO estão ocorrendo em paralelo.

No ponto S2 também foi demonstrada uma diminuição nos níveis de Hb após 2 dias de exposição em 2009 (Fig. 28A). Franco e colaboradores (2010), também encontraram redução nos níveis de Hb nos animais expostos ao ponto S2 durante 7 dias. Uma diminuição no conteúdo de Hb e no hematócrito foi relatada em peixes após a exposição aguda a óleo diesel (ALKINDI *et al.*, 1996; SIMONATO *et al.*, 2008). Hemólise e estresse oxidativo já foram relatados como fatores induzidos pela atividade HO (STOCKER, 1990; JORGENSEN *et al.*, 1998), sugerindo que a exposição a contaminantes levou a hemólise de células vermelhas com conseqüente liberação de grupamentos heme, que quando metabolizados por HO produzem biliverdina (DENNERY, 2004). Estes dados estão de acordo com os achados do presente estudo. Entretanto, já foi relatado aumento no conteúdo de Hb após a exposição aguda e crônica a frações de óleo diesel (DAVISON *et al.*, 1992; DAVISON *et al.*, 1993).

6.5 Alterações na expressão de CYP450 e na atividade da EROD

Diferentes estudos têm mostrado que peixes de áreas impactadas têm aumento da atividade e expressão de CYPs (KIRBY *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2010). A subfamília de proteínas CYP1A tem sido largamente usada como biomarcador de contaminação aquática, uma vez que apresenta notável indução por compostos tóxicos como PCBs e HPAs (BUCHELI e FENT, 1995; VENTURA *et al.*, 2002). Vários estudos já demonstraram aumento na expressão de CYP1A, assim como na atividade da EROD, que representa a atividade catalítica do CYP1A, em peixes expostos a ambientes contaminados (BAINY *et al.*, 1999; PEDROSA *et al.*, 2001; WILHELM FILHO *et al.*, 2001b; ALVES, 2003; SEN *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010). Da mesma forma, um estudo com espécimes de *Poecilia vivipara* expostas a frações de óleo diesel demonstrou a indução de genes do CYP1A associado ao aumento na atividade da EROD (MATTOS, 2010). Achados que corroboram com os dados deste estudo, onde foi encontrado um aumento na expressão de CYP1A (Fig. 9),

associado ao aumento na atividade da EROD (Fig. 8A e B) após 2 dias de exposição no ponto S2, e uma tendência ao aumento no ponto S3 em 2009 e 2010. Estes pontos representam duas áreas impactadas por atividades industriais, onde a análise de compostos orgânicos mostrou maiores níveis de HPAs, LABs, esteróis e hidrocarbonetos alifáticos, provenientes de aporte antrópico, no sedimento destas áreas (Tabelas 3 e 4).

A detecção de níveis elevados de CYP1A aos 7 dias de exposição no ponto S2, não foi correspondente a atividade EROD, que permaneceu ao nível do grupo REF. Em 2001 (ALVES, 2003) e em 2005 (FRANCO *et al.*, 2010), estudos já reportaram o aumento da expressão de CYP1A no ponto S2, não deixando dúvidas a respeito desta resposta que parece ser bastante consistente e reprodutível ao longo de 9 anos. Entretanto, a atividade EROD permanecendo ao nível do grupo REF pode sugerir uma inibição, uma vez que o imunocorrelato foi significativamente maior em 2 e 7 dias. Esta suposta inibição da atividade EROD poderia explicar o retorno aos níveis basais de sua atividade aos 7 dias de exposição. Uma menor atividade da EROD poderia diminuir o estresse oxidativo, permitindo a recuperação dos níveis tiólicos, como observado (Fig. 13C e 15C). Entretanto, estas possibilidades precisam ser confirmadas com experimentos adicionais.

A expressão de CYP2B é induzida em roedores quando expostos a HPAs, PCBs, dieltrin e clordanas (LEWIS e LAKE, 1996), no entanto, peixes também já demonstraram indução de CYP2B após exposição a ambientes contaminados (BAINY *et al.*, 1999; SCHLEZINGER e STEGEMAN, 2001; FRANCO *et al.*, 2010). No presente estudo, após 7 dias de exposição, foi demonstrado um aumento na expressão da isoforma CYP2B no ponto S2 (Fig. 10C), sugerindo uma possível indução pela presença de HPAs ou outros contaminantes orgânicos no ambiente (Tabela 3 e 4). Entretanto, em 2005 (FRANCO *et al.*, 2010) este aumento foi observado somente no ponto S1, não permitindo maiores discussões.

Em mamíferos e peixes a subfamília de CYP3A possui considerável importância no metabolismo de drogas e xenobióticos e são tipicamente induzidos por rifampicina, fenobarbital e dexametasona (HEGELUND e CELANDER, 2003; LEE e BUHLER, 2003; NALLANI *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2008). Os animais expostos no presente estudo não apresentaram alterações significativas na expressão de CYP3A (Fig. 11), concordando com os dados de Franco e colaboradores (2010). Tseng e colaboradores (2005) sugerem que a indução de CYP3A pode estar associada a interação de várias drogas e

compostos, o que indica que a regulação da indução das proteínas CYP3A precisa ser melhor estudada.

6.6 Correlação entre atividade da EROD, expressão de CYP1A e contaminantes orgânicos

A Tabela 6 apresenta os dados de correlação entre os valores médios de CYP1A, EROD, HPAs e biliverdina da bile e os níveis de contaminantes orgânicos (N = 1) encontrados no sedimento e no fígado. As correlações negativas entre os níveis de alcanos totais no fígado e aqueles encontrados no sedimento, assim como as correlações negativas com a atividade da EROD (2 dias), CYP1A (2 e 7 dias) e biliverdina indicam uma forte atividade de eliminação destes compostos. Já as fortes correlações positivas entre HPAs no sedimento, HPAs na bile e biliverdina, juntamente com as correlações positivas destes compostos com a atividade EROD (2 dias) e CYP1A (2 dias), sugerem que os elevados níveis destes compostos no sedimento levam a indução das fases I e II de biotransformação, permitindo maior eliminação destes compostos na bile. Uma vez que os HPAs totais do fígado não apresentaram correlação com nenhum dos parâmetros, tentou-se correlacionar com alguns dos compostos detectados. Nesta análise, observou-se que o fenantreno no fígado tem boa correlação positiva com a expressão do CYP1A (2 e 7 dias), alcanos do sedimento, e negativa com os alcanos do fígado. A presença de fenantreno em uma mistura de água e óleo diesel já demonstrou indução de CYP1A e EROD em peixes (*Poecilia vivípara*) (MATTOS, 2010), sugerindo que sua bioacumulação no fígado e/ou excreção para a bile é proporcional ao nível de contaminação e a expressão de CYP1A. Por outro lado, os níveis de alcanos do fígado podem se relacionar com a capacidade do fígado em eliminar HPAs. Esta possibilidade é reforçada pela excelente correlação negativa entre alcanos e CYP1A de 2 e de 7 dias de exposição ($r = -0,99$; $p < 0,01$) e com EROD de 2 dias ($r = -0,96$; $p < 0,05$). Em conjunto, esta análise de correlação indica a indução de CYP1A frente a exposição a contaminantes orgânicos, especialmente HPAs, resultando em uma maior metabolização dos animais nos pontos S2 e S3, permitindo assim, uma maior eliminação de seus metabólitos na bile.

Após 7 dias de exposição, somente a expressão de CYP1A permaneceu aumentada no ponto S2 (Fig. 9C), uma vez que a atividade da EROD retornou para níveis basais após este período (Fig. 8C). Na

análise de correlação a atividade da EROD de 7 dias não se correlaciona significativamente com a expressão de CYP1A aos 7 dias de exposição, no entanto há uma boa correlação entre a atividade EROD de 2 dias e a expressão de CYP1A após 2 dias de exposição. A expressão de CYP1A aos 7 dias de exposição correlaciona-se fortemente com a atividade EROD e com a expressão de CYP1A aos 2 dias de exposição. Da mesma forma que a expressão CYP1A aos 7 dias de exposição também correlaciona-se positivamente com os níveis de HPAs no sedimento e na bile e negativamente com os níveis de alcanos totais no fígado. A falta de correlação da atividade EROD (7 dias) com a expressão de CYP1A aos 7 dias, juntamente com o retorno da sua atividade para níveis basais após 7 dias de exposição (Fig. 8C), indicam que a enzima pode estar inibida, possivelmente pela influência dos contaminantes presentes na água.

6.7 Alterações no metabolismo de tióis

O estado tiólico dos animais demonstrou diferentes padrões nas exposições de 2 e 7 dias em 2009 e 2010. Após 2 dias de exposição em 2009, foi demonstrado uma diminuição nos níveis de GSH-t (Fig. 12A) e NPSH no fígado (Fig. 13A), bem como menores níveis de tióis no plasma (Fig. 15A) nos 3 grupos de estudo, e uma diminuição nos níveis de GSH-t do sangue nos grupos S2 e S3 (Fig. 14A). Já no ano de 2010, após 2 dias de exposição, somente os níveis de NPSH do fígado diminuíram no grupo S1 (Fig. 13B). Estas alterações do experimento de 2009 sugerem uma situação de estresse oxidativo após a exposição aguda destes animais a um ambiente contaminado. No estudo de campo de 2005 (FRANCO *et al.*, 2010), também foi encontrado menores níveis de GSH-t nos animais expostos ao ponto S2 e uma relação GSH/GSSG indicativa de estresse oxidativo nos dois pontos de estudo (S1 e S2). Em outros estudos, a depleção de GSH já foi demonstrada sob condições laboratoriais em peixes expostos a uma variedade de compostos (metais e compostos orgânicos), sendo considerado como um biomarcador de estresse ambiental (GALLAGHER *et al.*, 1992; AHMAD *et al.*, 2006; SANCHEZ *et al.*, 2007). Um estudo recente com robalos (*Dicentrarchus labrax*) capturados em áreas contaminadas também demonstrou diminuição nos níveis de GSH-t e NPSH do fígado (MARIA *et al.*, 2009). O estado tiólico também foi comprometido em

hepatócitos de tainhas (*Mugil cephalus*) coletadas em áreas estuarinas poluídas (PADMINI e RANI, 2009).

O conteúdo de GSH intracelular depende do balanço entre depleção, regeneração e o processo de síntese (DICKINSON *et al.*, 2004). A GSH está em constante renovação dentro da célula, com síntese hepática e transporte para o plasma, a fim de fornecer substrato para sua síntese e para a síntese protéica em outros tecidos. A GGT é a enzima responsável pela clivagem da GSH extracelular para posterior incorporação da célula, a fim de fornecer os precursores necessários para sua síntese, atuando na manutenção da homeostase da GSH e tendo papel importante no transporte de aminoácidos (MEISTER *et al.*, 1979; WHITFIELD, 2001). Franco e colaboradores (2010) demonstraram uma diminuição na atividade da enzima GGT em tilápias mantidas Rio do Braço (Joinville, SC), sugerindo que o decréscimo nos níveis de GSH pode estar relacionado a diminuição na atividade da GGT. A diminuição nos níveis de GSH também pode ser decorrente da ação das bombas de efluxo dependentes de ATP que exportam GSSG e conjugados de GSH das células hepáticas durante estresse oxidativo (KEPPLER, 1999). A depleção de GSH também pode ser decorrente da inibição da sua síntese, sugerindo que a diminuição dos níveis de GSH-t após a exposição a contaminantes pode ser provocada pela inibição da enzima GCL, que regula a síntese de GSH (GIORDANO *et al.*, 2008).

Sun e colaboradores (2008) encontraram diminuição dos níveis de GSH em peixes após a exposição ao HPA pireno, associado ao aumento nos níveis de $\cdot\text{OH}$, sugerindo que a GSH seria o primeiro passo na proteção contra ERO, uma vez que a GSH pode estar sendo conjugada com agentes eletrofílicos ou com seus metabólitos através da ação catalítica da GST, ou ainda que a situação de estresse oxidativo pode suprimir os níveis de GSH devido a perda de mecanismos adaptativos e oxidação da GSH para GSSG. Apesar da atividade GST não ter sido alterada após 2 dias de exposição em nenhum dos anos de estudo (Fig. 22A e 22B), a presença de elevados níveis de substratos podem levar a conjugação da GSH, e sua eliminação na bile, como foi demonstrado na Figura 7.

Após 7 dias de exposição os níveis de GSH-t no fígado permaneceram abaixo do grupo REF nos grupos S1 e S3 (Fig. 12C) no ano de 2009. Os níveis de NPSH no fígado e tióis plasmáticos após 7 dias de exposição no ano de 2009, retornaram para valores próximos dos valores basais nos 3 grupos de estudo (Fig. 13C e 15C). No ano de 2010, após 7 dias de exposição apenas no grupo S1 os níveis de tióis do plasma permaneceram baixos (Fig. 15D). A ausência de alterações nos

níveis tiólicos no ano de 2010, juntamente com o retorno dos níveis de NPSH do fígado e tióis plasmáticos para os níveis basais (Fig. 13C e 15C) podem indicar o desenvolvimento de mecanismos adaptativos, uma vez que após 7 dias de exposição também não foram observados danos ao DNA (Fig. 27B). Sugere-se também, que o retorno da atividade da EROD para níveis próximos dos basais (Fig. 8C) após 7 dias de exposição, poderia diminuir o estresse oxidativo, com restauração das defesas antioxidantes não-enzimáticas.

Oliveira e colaboradores (2010) encontraram aumento nos níveis de GSH-t e NPSH do rim de peixes (*Liza aurata*) capturados em áreas poluídas, sugerindo que peixes que se adaptam em áreas contaminadas apresentam aumento dos níveis de antioxidantes não-enzimáticos (PENA-LLOPIS *et al.*, 2001; PARVEZ *et al.*, 2006), como a GSH que tem importante papel na detoxificação e excreção de xenobiontes (WANG e BALLATORI, 1998). Essa restauração dos níveis de tióis pode estar relacionada com a síntese de GSH, como um mecanismo compensatório. O fator de transcrição primário responsável por iniciar a resposta ao estresse oxidativo é o “fator 2 relacionado ao NF-E2” (Nrf2). Sob condições normais, o Nrf2 está presente no citosol, mas compostos oxidantes podem ativar sua translocação para o núcleo, onde se liga nas sequências de DNA, como o elemento de resposta antioxidante (ARE) (RUSHMORE *et al.*, 1991; VENUGOPAL e JAISWAL, 1996). Desta forma, o Nrf2 regula a transcrição de vários genes de detoxificação. A enzima GCL, responsável por uma das etapas da síntese de GSH, é regulada positivamente pelo Nrf2 em células endoteliais de mamíferos (CORTESE *et al.*, 2008), aumentando a síntese de GSH.

Não foi encontrada razão aparente para a discordância dos dados de 2009 e 2010 em relação aos níveis tiólicos. Assim, aguardam-se os resultados dos níveis de contaminantes no sedimento e na bile, para eventualmente entender as razões que induziram respostas distintas entre 2009 e 2010.

6.8 Alterações enzimáticas

6.8.1 Atividades de enzimas antioxidantes

Uma vez que a indução de enzimas antioxidantes representa um mecanismo de defesa celular contra a toxicidade de ERO, elas têm sido largamente usadas em estudos de avaliação da contaminação aquática

(GOKSOYR, 1995). No presente estudo, após 2 dias de exposição, foi demonstrado um aumento na atividade da enzima GPx no grupo S3 em 2009 e nos grupos S1 e S2 no ano de 2010 (Fig. 17A e 17B). Já após 7 dias de exposição a atividade da GPx retornou para os níveis basais em 2010 (Fig. 17D) e em 2009 sua atividade permaneceu maior no grupo S1 (Fig. 17C). A atividade da GR apresentou uma diminuição da atividade no grupo S1 após 2 dias de exposição no ano de 2010 (Fig. 18B) e após 7 dias de exposição no ano de 2009 (Fig. 18C). Franco e colaboradores (2010), em um estudo similar, demonstraram um aumento nas atividades da CAT, GPx e GR no fígado de tilápias do Nilo após 7 dias de exposição no Rio do Braço, em Joinville, SC. Nesta mesma região, Alves (2003) já havia encontrado o aumento na atividade da GST e CAT em tilápias do Nilo. No entanto, Padmini e Rani (2009) encontraram uma redução da atividade destas enzimas em tainhas (*Mugil cephalus*) capturadas em uma área estuarina impactada por diversos compostos químicos. Da mesma forma Wilhelm Filho e colaboradores (2001a) encontraram diminuição na atividade das enzimas CAT e GPx e aumento na atividade das enzimas GR e SOD em peixes capturados em regiões poluídas do litoral de Santa Catarina. Estes mesmos autores, em outro estudo, relataram aumento da atividade da CAT em carás (*Geophagus brasiliensis*) coletados em Florianópolis, SC (WILHELM FILHO *et al.*, 2001b). Já em outro estudo a menor atividade da CAT veio acompanhada de um aumento na atividade das enzimas GPx e G6PDH em eritrócitos de tilápias do Nilo capturadas em áreas poluídas de São Paulo (BAINY *et al.*, 1996). No presente estudo a enzima G6PDH mostrou uma diminuição na sua atividade após 2 dias de exposição no ano de 2009 nos grupos S1 e S3 (Fig. 19B) e a CAT não apresentou alteração da sua atividade, exceto pela menor atividade no ponto S1 após 2 dias de exposição no experimento de 2010 (Fig. 16B).

O aumento da atividade da GPx (Fig. 17) pode proporcionar um aumento na taxa de detoxificação de peróxidos, os quais podem estar sendo produzidos em maior velocidade em decorrência da exposição a contaminantes. Durante este processo a GPx utiliza GSH produzindo GSSG, o que corrobora com os achados deste estudo, onde os níveis de GSH-t diminuíram após 2 dias de exposição a contaminantes (Fig. 12A e 14A).

A análise de metais não foi realizada neste estudo, no entanto a contaminação ambiental por metais no Rio Cubatão também pode ser constatada por um estudo realizado no Canal do Linguado (UNIVILLE, 2004), canal este onde deságuam as águas do rio Cubatão. Segundo

análises feitas no Rio Cubatão, nas proximidades da Baía da Babitonga, e na própria Baía, foi observada a presença de elevados níveis de metais como cádmio (Cd), chumbo, cobre (Cu), cromo, e níquel na coluna da água e no sedimento. Nos animais os níveis, muitas vezes, ultrapassaram os limites permitidos. Desta forma, não se pode descartar a possível interferência de metais-traço sobre as respostas encontradas.

A diminuição da atividade da GR (Fig. 18B e 18C) também contribui para a diminuição dos níveis da forma reduzida da GSH. O substrato GSSG é continuamente reduzido pela enzima GR, sendo que esta tem um papel crucial na reciclagem da GSH e manutenção do ambiente redutor intracelular (SIES e MOSS, 1978; BERKHOLZ *et al.*, 2008). Cossu e colaboradores (1997) também relataram diminuições na atividade da GR relacionada à depleção de GSH. Hasspieler e colaboradores (1994) demonstraram que uma baixa atividade da GR em peixe-gato (*Ameiurus nebulosus*) impediu a restauração dos níveis de GSH, que foi oxidada após a exposição a xenobiontes. A diminuição da atividade GR pode ser atribuída a oxidação celular do NADPH, que é a maior fonte de equivalentes redutores para ação enzimática da GR durante exposição a xenobiontes (HERMES-LIMA, 2004). Entretanto, a menor atividade avaliada neste estudo indica que pode haver menor concentração protéica ou que a enzima encontra-se inibida. Nosso grupo já demonstrou a inibição da GR *in vivo* em peixes (FRANCO *et al.*, 2008) e em bivalves (FRANCO *et al.*, 2006) após a exposição a Zn, o que não pode ser descartado neste trabalho (UNIVILLE, 2004).

Foram analisadas também as atividades das enzimas TrxR e glioxalase I (Fig. 20 e 21), sendo encontrada uma diminuição da atividade da TrxR após 2 dias de exposição em 2010 no grupo S1 (Fig. 20B). A TrxR é uma importante enzima relacionada ao sistema Trx/Prx, responsável pela manutenção dos níveis de Trx reduzida, participando da detoxificação de peróxidos e também de outros processos enzimáticos e regulatórios (ARNÉR e HOLMGREN, 2000). Mitozo (2010), em um trabalho usando inibidores do sistema Trx/TrxR, demonstrou que a inibição deste sistema diminuiu a capacidade de reciclagem da Prx2, além de causar diminuição da taxa de consumo de peróxidos, diminuição da viabilidade celular e danos ao DNA em modelos de células neuronais, demonstrando que o comprometimento deste sistema acarreta em inúmeras conseqüências negativas para a célula. Trevisan e colaboradores (2010) demonstraram uma redução na atividade da TrxR em bivalves marinhos (*Mytilus edulis*) expostos ao Cu, demonstrando seu potencial como um novo biomarcador. Branco e colaboradores (2010) demonstraram a inibição da TrxR em peixes

(*Diplodus cervinus*) expostos a diferentes concentrações de metil-mercúrio (MeHg), indicando que contaminantes como metais, podem diminuir a eficiência do sistema Trx/Prx através da limitação da taxa de redução da Trx, aumentando a susceptibilidade ao dano oxidativo. Estes dados sugerem que a diminuição na atividade da TrxR no ponto S1 pode ser decorrente da contaminação por metais (UNIVILLE, 2004).

A enzima glioalase I detoxifica ceto-aldeídos produzidos durante processos peroxidativos. Estudos envolvendo bivalves marinhos expostos a metais demonstraram indução do sistema de detoxificação da glioalase (REGOLI e PRINCIPATO, 1995; REGOLI, 1998; REGOLI *et al.*, 2002a). No presente estudo, a atividade da glioalase mostrou diferentes padrões, com aumento da sua atividade após 2 dias de exposição no ano de 2009 nos grupos S2 e S3 (Fig. 21A), diminuição da atividade após 2 dias de exposição no ano de 2010 nos pontos S1 e S3 e após 7 dias de exposição apresentou diminuição da atividade nos pontos S3 e S2, em 2009 e 2010, respectivamente (Fig. 21C e 21D). Desta forma, este mecanismo precisa ser mais estudado para obtenção de informações conclusivas.

A enzima GST tem importante papel na detoxificação e excreção de xenobiontes por catalisar a conjugação da GSH a compostos hidrofóbicos na fase II de biotransformação, promovendo sua eliminação do organismo (BUCHELI e FENT, 1995; MARIONNET *et al.*, 2006). Franco e colaboradores (2010) e Alves (2003) demonstraram um aumento da atividade GST no fígado de tilápias do Nilo expostas nas mesmas regiões do presente estudo, assim como outros estudos com tilápias do Nilo e dourados (*Carassius auratus*) expostos a contaminantes também já relataram o aumento na atividade desta enzima (LIMA *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2010). Um aumento da expressão da GST já foi relatado como um efeito protetor contra carcinógenos ambientais (GULICK e FAHL, 1995), assim como foi encontrado aumento na expressão gênica da GST em peixes (*Poecilia vivipara*) expostos a óleo diesel (MATTOS, 2010). Apesar de não ter sido encontrado aumento na atividade GST no presente estudo (Fig. 22), ela tem sido largamente utilizada como biomarcador de contaminação aquática, respondendo ao estresse químico com alta relevância toxicológica.

O método usado neste trabalho para dosar a GST, através da conjugação com substrato CDNB, é usado para dosar várias isoformas da enzima, ou seja, não é um método específico. Desta forma, apesar da ausência de indução da GST demonstrada neste estudo, é possível que

algumas isoformas tenham sido induzidas, mas não detectadas pelo método empregado (SHEEHAN *et al.*, 2001).

As isoformas da GST podem ser diferencialmente induzidas ou inibidas pela exposição a contaminantes, assim como podem ser mais sensíveis e seletivas na resposta a diferentes xenobiontes (SHEEHAN *et al.*, 2001). Por exemplo, a atividade da GST citosólica no fígado de trutas (*Oncorhynchus mykiss*), na análise com ácido etacrínico, é induzida após a exposição a PCBs e pesticidas organoclorados, mas não altera a sua atividade após a exposição a dioxina (MACHALA *et al.*, 1998). Da mesma maneira, Sun e colaboradores (2008) observaram que a atividade da GST em peixe japonês (*Carassius auratus*) é significativamente induzida após a exposição a baixas concentrações do HPA pireno (< 0,005 mg/L), enquanto é fortemente inibida em altas concentrações (0,1 mg/L) deste mesmo composto. Esta diferença na resposta da GST ainda foi observada por Vieira e colaboradores (2008), onde peixes expostos ao HPA benzo(a)pireno e a uma mistura de substâncias petroquímicas mostraram indução da atividade GST, ao mesmo tempo que o HPA antraceno levou a inibição desta enzima. Assim, fica claro que diferentes xenobiontes, ou diferentes concentrações, induzem efeitos opostos na atividade GST.

Em estudos de campo, geralmente uma mistura complexa de xenobiontes está presente no ambiente, sendo que os resultados globais podem resultar da sobreposição das respostas de diferentes isoformas da enzima. Gowland e colaboradores (2002) encontraram que HPAs de alto peso molecular (5 – 6 anéis) tem efeitos mais pronunciados que os de baixo peso molecular (2 – 4 anéis) na indução da atividade da GST. Esta diferença pode estar relacionada a afinidade do HPA pelo AHR, que promove a indução de enzimas da fase II de biotransformação (GOKSOYR e HUSOY, 1998). Outra explicação dada para a alteração da atividade GST é que os HPAs podem se ligar diretamente a enzima causando sua inibição, da mesma maneira que a depleção dos níveis de GSH no processo de estresse oxidativo também pode alterar a função da GST (VIEIRA *et al.*, 2008).

A análise de contaminantes orgânicos do sedimento dos pontos de exposição e do fígado dos animais deixou evidente a presença de HPAs no ambiente (Tabelas 3 e 4), sendo que o sedimento mostrou a predominância de vários tipos de HPAs (Tabela 4), o que associada a diminuição dos níveis de GSH-t encontrada após 2 dias de exposição (Fig. 12A e 14A), podem ser responsáveis pela ausência de alteração na atividade da GST, por sua inibição ou sobreposição das respostas das isoformas desta enzima.

Outra enzima antioxidante que pode estar envolvida na resposta ao estresse oxidativo induzido por xenobíontes é a Prx. A Prx6 é oxidada através da formação de pontes dissulfeto na presença de H_2O_2 , levando a degradação deste peróxido. Sugere-se que a GSH participe do processo de redução da Prx6 em seu ciclo catalítico, e consequentemente, de sua reativação (FISHER *et al.*, 1999; RHEE *et al.*, 2005). O aumento na expressão gênica da Prx6 já foi relatado em ostras (*Crassostrea gigas*) coletadas de estuários contaminados (DAVID *et al.*, 2007), assim como em peixes (*Platichthys flesus*) tratados com Cd (SHEADER *et al.*, 2006). Kling e colaboradores (2008) relataram aumento na expressão da Prx6 em *Danio rerio* tratados com um mistura de compostos organobromados. O aumento da expressão da Prx6 no ponto S2 após 7 dias de exposição (Fig. 26B), juntamente com o conjunto de alterações encontradas nos animais expostos neste ponto, indicam a indução de uma resposta adaptativa através do aumento das defesas antioxidantes, possivelmente em decorrência dos compostos tóxicos presentes nesta área como demonstrado nas Tabelas 3 e 4. A Prx6 se apresenta como um biomarcador em potencial.

6.8.2 Atividade colinesterásica

O sistema neuromuscular de peixes é principalmente colinérgico e a atividade colinesterásica é essencial para a função e comportamento muscular (PAYNE *et al.*, 1996). Apesar dos relatos de inibição específica por carbamatos e organofosforados, outros estudos têm indicado que substâncias como metais pesados, organoclorados e HPAs também podem causar inibição colinesterásica (PAYNE *et al.*, 1996; AKAISHI *et al.*, 2004; FERRARI *et al.*, 2007). No presente estudo foi encontrada uma diminuição das atividades das enzimas AChE e BuChE no plasma de tilápias expostas durante 2 dias no ponto S1, no ano de 2010 (Fig. 23B e 24B), uma região com predominância de atividades agrícolas, principalmente com cultivo de arroz, podendo receber efluentes como pesticidas. Nesta mesma região, um estudo com tilápias do Nilo mantidas por 7 dias em gaiolas também demonstrou a inibição da AChE e da BuChE na fração solúvel do fígado no mesmo ponto de coleta, também sugerindo a predominância de pesticidas nesta região, ou ainda um efeito aditivo de muitos contaminantes (FRANCO *et al.*, 2010). No entanto, com 7 dias de exposição em 2010 a atividade retornou para níveis basais (Fig. 23C e 24C). Um estudo recente realizado em laboratório demonstrou uma diminuição na atividade da AChE no músculo e cérebro de peixes (*Prochilodus lineatus*) expostos

por 96h a um herbicida a base de glifosato contendo surfactantes (MODESTO e MARTINEZ, 2010). Da mesma maneira, Firat e Kargin (2010) demonstraram a inibição da atividade colinesterásica no plasma de tilápias do Nilo expostas por 7 dias em laboratório a uma mistura de Zn e Cd.

Apesar da inibição encontrada no ponto S1, a análise de contaminantes orgânicos, incluindo pesticidas organoclorados, do sedimento desta região mostrou concentrações equivalentes ao ponto REF (Tabela 4). Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade da contaminação por metais nesta região, como já relatado no estudo realizado pela UNIVILLE (2004).

6.9 Danos ao DNA

A exposição de 2 dias nos Rios Cubatão e do Braço induziu um aumento nos danos ao DNA no sangue dos animais nos 3 pontos de exposição (Fig. 27A). Durante o processo de biotransformação produtos intermediários altamente reativos podem ser produzidos, o que pode ter induzido danos no DNA, que em última análise, pode iniciar processos mutagênicos que podem resultar em câncer (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Da mesma forma, a geração de ERO, como o $\cdot\text{HO}$, devido a exposição a diferentes xenobiontes pode gerar quebras na fita de DNA ou gerar adutos de DNA (DIZDAROGLU *et al.*, 2002). A indução de danos ao DNA já foi relatada em linguados (*Solea solea*) expostos a uma mistura de HPAs (WESSEL *et al.*, 2010). O ensaio do cometa tem sido largamente aplicado para detecção de danos ao DNA induzidos por xenobiontes como Cd (DESAI *et al.*, 2006; FOURIE *et al.*, 2007), mercúrio (Hg) (TRAN *et al.*, 2007) e compostos orgânicos (COSTA *et al.*, 2008). Os resultados mostram claramente que os animais de todos os pontos estão sob condições que aumentam os danos ao DNA após 2 dias de exposição (Fig. 27A).

O aumento na expressão e atividade do CYP1A (Fig. 8A, 8B e 9) associado com aumento dos níveis de metabólitos de HPAs na bile dos animais (Fig. 7A), sugere que a biotransformação de xenobiontes pode estar contribuindo para a geração de ERO (LEE e ANDERSON, 2005) e estresse oxidativo, com depleção das reservas tiólicas (Fig. 12A, 13A, 14A e 15A) e danos oxidativos a biomoléculas, como demonstrado no ensaio do cometa após 2 dias de exposição (Fig.27A).

Após 7 dias de exposição pode-se sugerir que os animais desenvolveram mecanismos adaptativos, uma vez que os níveis de danos ao DNA foram comparáveis aos do grupo REF (Fig. 27B), podendo ser uma consequência da indução de mecanismos de reparo ou defesas antioxidantes, uma vez que os níveis NPSH do fígado (Fig. 13C) e tióis do plasma (Fig. 15C) retornam para os níveis basais após este período (2009). Por outro lado, a menor atividade EROD pode ter reduzido o estresse oxidativo, o que favoreceria o retorno dos níveis tiólicos aos valores basais.

Associado ao aumento dos danos ao DNA após 2 dias de exposição nos 3 pontos de estudo (Fig. 27A), foi encontrado um aumento significativo na expressão da clivagem da PARP1 no ponto S2 após 7 dias de exposição e uma tendência ao aumento nos pontos S1 e S3 (Fig. 26A). Como já descrito anteriormente, a PARP1 é uma proteína nuclear ligada ao DNA que detecta quebras na fita do DNA e usa NAD^+ como substrato. Em situações patológicas, nas quais as ERO causam danos excessivos ao DNA, a ativação da PARP1 pode debilitar as reservas celulares de NAD^+ , induzindo a clivagem da PARP1 e processos de apoptose (SHALL e DE MURCIA, 2000). A ativação da PARP1 é umas das primeiras respostas aos danos no DNA (LINDAHL *et al.*, 1995). A clivagem da PARP1 também já foi relacionada a apoptose de células epiteliais humanas após a exposição a Cd (KALARIYA *et al.*, 2010). O aumento nos danos ao DNA (Fig. 27A) associado ao aumento na expressão da clivagem da PARP1 (Fig. 26A) sugere processos oxidativos envolvendo morte celular por apoptose decorrente da exposição a uma complexa mistura de xenobíotes.

6.10 Biomarcadores de contaminação aquática

As análises de contaminantes orgânicos mostraram a presença de HPAs, LABs, hidrocarbonetos alifáticos e esteróis em todos os pontos de exposição (Tabelas 3 e 4). Entretanto, os pontos S2 e S3 apresentaram as maiores concentrações de todos os contaminantes no sedimento, assim como no fígado dos animais (Tabela 5), sendo que as análises mais específicas mostraram aporte antrópico destes compostos em ambas as regiões.

Os ensaios realizados mostraram que os animais expostos aos pontos S2 e S3 apresentaram maiores alterações no metabolismo de

biotransformação, com aumento da atividade da EROD e expressão de CYP1A (Fig. 8 e 9), assim como depleção dos níveis tiólicos (Fig. 12A, 13A, 14A e 15A), danos ao DNA (Fig. 27A) e ativação de enzimas antioxidantes (Fig. 17 e 26B). Estes dados, associados a comprovada contaminação de compostos orgânicos, indicam que estas regiões são impactadas pela atividade industrial e/ou urbana.

Já o ponto S1, na análise de compostos orgânicos mostrou baixo impacto antrópico. Entretanto, várias alterações foram encontradas neste ponto, incluindo inibição colinesterásica (Fig. 23B e 24B) e das enzimas TrxR (Fig. 20B) e GR (Fig. 18B e 18C), assim como depleção do estado tiólico após 2 dias de exposição (Fig. 12A, 13A, 14A e 15A) e danos ao DNA (Fig. 27A). Estes dados demonstram que esta região está sendo impactada por efluentes oriundos de fontes diversas. A inibição da AChE é característica da ação de pesticidas organoclorados ou carbamatos, entretanto, não foram detectados níveis elevados destes compostos. Como esta região apresenta predominância de atividades agrícolas, a hipótese inicial era uma inibição por pesticidas, o que não foi descartado ainda. Entretanto, devido aos baixos níveis de pesticidas, sugere-se um possível envolvimento de metais-traço advindos de fontes industriais, o que é apoiado pelo estudo da UNIVILLE (2004), que demonstrou elevados níveis de metais-traço no sedimento e na biota aquática da Baía da Babitonga.

As exposições realizadas mostraram que o protocolo de 2 dias de exposição, nos dois experimentos (2009 e 2010), mostrou maiores alterações no metabolismo dos animais, indicando que o estado tiólico, os danos ao DNA e a atividade e expressão de CYP1A são bons biomarcadores de contaminação aquática. Fortes correlações foram encontradas entre a presença de contaminantes no sedimento e na bile com atividade e expressão do CYP1A, evidenciando a metabolização e excreção destes compostos pelos animais.

Após 7 dias de exposição, apesar de várias alterações terem sido encontradas no estudo de Franco e colaboradores (2010), o presente estudo encontrou um maior número de alterações significativas aos 2 dias de exposição. Vários parâmetros alterados aos 2 dias de exposição, tiveram seus valores equivalentes ao do grupo REF aos 7 dias de exposição.

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que um protocolo de 2 dias de exposição seria mais adequado para o biomonitoramento da contaminação aquática com tilápias do Nilo, entretanto, a análise de novos biomarcadores como a expressão da PARP1 e da Prx6 mostrou

bons resultados após 7 dias, com aumento da expressão de ambas as proteínas no ponto S2 (Fig. 25B e 26B).

Diferentemente do estudo de Franco e colaboradores (2010), o presente trabalho teve o cuidado de aclimatar os animais ao confinamento por 15 dias antes do experimento. Este procedimento teve o objetivo de reduzir o estresse de confinamento, o que pode explicar a resposta mais rápida apresentada pelos animais neste estudo, quando comparado ao estudo de Franco e colaboradores (2010).

No conjunto, houve pouca reprodutividade nas alterações encontradas em 2009 e 2010 no que se refere aos parâmetros de estresse oxidativo. Em 2009 as variáveis mais relevantes foram relacionadas ao estado tóxico, já em 2010 um comprometimento da atividade de várias enzimas antioxidantes foram os biomarcadores mais impactados. Por outro lado, observou-se grande consistência nos dados de expressão de CYP1A e HPAs na bile e contaminantes nos sedimentos.

Independente do período de exposição, o conjunto de dados indica claramente que o ponto S2 é o mais contaminado, seguido do ponto S3, enquanto os pontos REF e S1 se mostraram relativamente menos impactados por aporte antrópico.

Os dados encontrados indicam que o uso de marcadores de processos de detoxificação, como a expressão dos CYPs, são muito mais eficientes quando associados aos marcadores de danos celulares (DNA, ativação de apoptose, entre outros) em conjunto com a medida de antioxidantes. Esta abordagem multiparâmetro tem auxiliando no diagnóstico e no desenvolvimento de estratégias de mitigação (MOORE *et al.*, 2004). Entretanto, as diferenças obtidas entre as respostas nos 2 protocolos (2 e 7 dias), deixa evidente a necessidade do conhecimento dos mecanismos envolvidos no metabolismo celular, para evitar interpretações errôneas e auxiliar no desenvolvimento de estratégias eficientes e eficazes, uma vez que inúmeros fatores externos podem alterar a resposta do organismo, assim como o tempo e a intensidade da exposição.

Em suma, através de uma análise global, percebe-se que as alterações bioquímicas se correlacionaram muito bem com os níveis de contaminantes ambientais, demonstrando a eficiência desta abordagem para o biomonitoramento. Em paralelo a este trabalho, a expressão diferencial de genes já está em fase adiantada, onde foi possível encontrar, em um primeiro ensaio, mais de 100 clones que apresentam a expressão diferencial de alguns genes, e que poderão contribuir ainda mais com as conclusões deste trabalho.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicam que as tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas durante 2 e 7 dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC, foram submetidas a uma situação de estresse oxidativo decorrentes da exposição a contaminantes.

Os organoclorados apresentaram-se em concentrações muito baixas e não foram relacionados a nenhuma fonte existente no local. Os LABs e esteróis mostraram que existe uma fonte de contaminação por esgotos domésticos principalmente nos pontos REF, S2 e S3. Os resultados da maioria dos compostos avaliados nas amostras de sedimento indicaram que o ponto S2 é a região mais contaminada dentre as áreas amostradas, seguida da região S3.

A presença de contaminantes orgânicos no sedimento dos pontos S2 e S3, principalmente a presença de HPAs, está correlacionada ao aumento da expressão de CYP1A, e ao aumento da atividade da EROD, mostrando a ativação da fase I de biotransformação após 2 dias de exposição.

As fortes correlações encontradas entre a presença de contaminantes no sedimento e na bile com atividade da EROD e expressão do CYP1A após 2 dias de exposição, evidenciam a metabolização destes compostos pelos animais. Assim como a ausência de correlação da EROD após 7 dias com os demais parâmetros, indica uma provável inibição desta enzima.

Apesar da atividade GST não ter sido aumentada, foram encontrados aumentos nos níveis de metabólitos de HPAs na bile nos pontos S2 e S3, sugerindo a ativação da fase II de biotransformação.

A diminuição dos níveis tiólicos (2009) após 2 dias de exposição, associado a indução de danos ao DNA (2010) nos 3 pontos de exposição, deixa claro a indução de estresse oxidativo, decorrente da contaminação aquática e da produção de ERO durante a metabolização destes compostos.

Após 7 dias de exposição os níveis de NPSH do fígado e tióis plasmáticos, assim como os danos ao DNA, nos pontos de exposição foram equivalentes ao grupo REF, sugerindo a indução de mecanismos adaptativos com aumento de defesas antioxidantes e reparo celular.

A menor atividade colinesterásica encontrada no ponto S1 sugere a inibição por pesticidas ou por metais.

A alteração das atividades da GR, TrxR, CAT, glioxalase, G6PDH, GPx, e da expressão da Prx6, mostra diferentes padrões de

resposta, dificultando uma conclusão sobre um possível mecanismo de controle.

A análise de novos biomarcadores, como a clivagem da PARP1 e a expressão da Prx6, mostrou bons resultados.

Neste contexto, pode ser concluído que as águas dos Rios Cubatão e do Braço demonstraram um potencial oxidativo a tilápias do Nilo expostas por 2 e 7 dias as suas águas. O protocolo permitiu identificar o nível de contaminação nos 3 pontos de estudo, sendo o ponto S2 o mais impactado, seguido do S3, e o menos impactado o ponto S1. Esta identificação foi corroborada pela análise de contaminantes orgânicos.

As análises de 2009 e 2010 mostraram diferentes padrões de resposta sugerindo a existência de fatores não previstos ou a uma grande heterogeneidade de contaminantes, resultando em respostas heterogêneas.

Os dados comprovam que animais que habitam a região da Bacia do Rio Cubatão do Norte em Joinville, SC, estão expostos a contaminantes de origem antrópica e que estes têm ação negativa sobre os indivíduos, necessitando de medidas corretivas a curto e em longo prazo.

REFERÊNCIAS

ADAMS, S. M., SHEPARD, K. L., GREELEY, M. S. J., JIMENEZ, B. D., RYON, M. G., SHUGART, L. R. e MCCARTHY, J. F. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environmental Research**, v. 28, p. 459–464, 1989.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 121-6, 1984.

AGRADI, E., BAGA, R., CILLO, F., CERADINI, S. e HELTAI, D. Environmental contaminants and biochemical response in eel exposed to Po river water. **Chemosphere**, v.41, p. 1555-62, 2000.

AHMAD, I., MARIA, V. L., OLIVEIRA, M., PACHECO, M. e SANTOS, M. A. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to beta-naphthoflavone. **Mutation Research**, v.608, p. 16-28, 2006.

AIZENSHTAT, Z. Perylene and its geochemical significance. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.37, p. 559-567, 1973.

AKAISHI, F. M., DE ASSIS, H. C., JAKOBI, S. C., EIRAS-STOFELLA, D. R., ST-JEAN, S. D., COURTENAY, S. C., LIMA, E. F., WAGENER, A. L., SCOFIELD, A. L. e RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.46, p. 244-53, 2004.

AKERBOOM, T. P. e SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzymology**, v.77, p. 373-82, 1981.

ALAM, J. e COOK, J. L. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, p. 2499-511, 2003.

ALKINDI, A. Y. A., BROWN, J. A., WARING, C. P. e COLLINS, J. E. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. **Journal of Fish Biology**, v.49, p. 1291–1305, 1996.

ALLEN, R. E., LO, T. W. e THORNALLEY, P. J. A simplified method for the purification of human red blood cell glyoxalase. I. Characteristics, immunoblotting, and inhibitor studies. **Journal of Protein Chemistry**, v.12, p. 111-9, 1993.

ALLEN, J.I., MOORE, M.N. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? **Marine Environmental Research**, v.58, p.227-32, 2004.

ALMROTH, B. C., ALBERTSSON, E., STURVE, J. e FÖRLIN, L. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.70 p. 370–378, 2008.

ALVES, S. R. C. Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFSC, Florianópolis, 2003.

ARNER, E. S., ZHONG, L. e HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v.300, p. 226-39, 1999.

ARNÉR, E. S. J. e HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p. 6102-6109, 2000.

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

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

BAUD, O., GREENE, A. E., LI, J., WANG, H., VOLPE, J. J. e ROSENBERG, P. A. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v.24, p. 1540-1531, 2004.

BERKHOLZ, D. S., FABER, H. R., SAVVIDES, S. N. e KARPLUS, P. A. Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.382, p. 371-84, 2008.

BOULOUBASSI, I., LIPIATOU, E., SALIOT, A., TOLOSA, I., BAYONA, J. M. e ALBAIGES, J. Carbon sources and cycle in the western Mediterranean-the use of molecular markers to determine the origin of organic matter. **Deep-Sea Research II**, v.44, p. 781-799, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-54, 1976.

BRANCO, V., CANARIO, J., HOLMGREN, A. e CARVALHO, C. Inhibition of the thioredoxin system in the brain and liver of zebra-seabreams exposed to waterborne methylmercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, p. 2010.

BRUNK, U.T., TERMAN, A. Lipofuscin: Mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, p.33-611, 2002.

BUCHELI, T. D. e FENT, K. Induction of Cytochrome-P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.25, p. 201-268, 1995.

BURKE, M. D. e MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v.2, p. 583-8, 1974.

CAJARAVILLE, M. P., BEBIANNO, M. J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C. e VIARENGO, A. The use of

biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v.247, p. 295-311, 2000.

CARLBERG, I. e MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v.113, p. 484-90, 1985.

CARMONA, G. M., JURGENSEN, A., MORAES, J. S. e CORREA, L. A. G. Relatório sobre a concentração dos poluentes do ecossistema aquático na Bacia da Babitonga - Canal do Linguado. FATMA. Florianópolis. 1985

CELANDER, M., RONIS, M. e FÖRLIN, L. Initial characterization of a constitutive cytochrome P-450 isoenzyme in rainbow trout liver. **Marine Environmental Research**, v.28, p. 9-13, 1989.

CHAE, H. Z., KANG, S. W. e RHEE, S. G. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. **Methods in Enzymology**, v.300, p. 219-26, 1999.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p. 7-15, 2002.

CHONG, Z. Z., LI, F. e MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Progress in Neurobiology**, v.75, p. 207-246, 2005.

CLARK, R. B. Marine Pollution. Oxford: Claredon Press, 1992.

COLLIER, T. K., CONNOR, S. D., EBERHART, B. T. L., ANULACION, B. F., GOKSOYR, A. e VARANASI, U. Using cytochrome P450 to monitor the aquatic environment: initial results from regional and national surveys. **Marine Environmental Research**, v.34, p. 195-199, 1992.

COLOMBO, J. C., PELLETIER, E., BROCHU, C., KHALIL, M. e CATOGGIO, J. A. Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study:

Rio de la Plata estuary, Argentina. **Environmental Science and Technology**, v.23, p. 888-894, 1989.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986: Diário Oficial da União 1986. Disponível em: <http://www.aguasdoparaopeba.org.br/arquivos/doc_resolucao_25664.pdf>. Acesso em: 05/01/2010.

CORTESE, M. M., SUSCHEK, C. V., WETZEL, W., KRONCKE, K. D. e KOLB-BACHOFEN, V. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.44, p. 2002-12, 2008.

COSSU, C., DOYOTTE, A., JACQUIN, M. C., BABUT, M., EXINGER, A. e VASSEUR, P. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.38, p. 122-31, 1997.

COSTA, P. M., LOBO, J., CAEIRO, S., MARTINS, M., FERREIRA, A. M., CAETANO, M., VALE, C., DELVALLS, T. A. e COSTA, M. H. Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): effects of metallic and organic contaminants. **Mutation Research**, v.654, p. 29-37, 2008.

DAVID, E., TANGUY, A. e MORAGA, D. Peroxiredoxin 6 gene: a new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, v.84, p. 389-98, 2007.

DAVISON, W., FRANKLIN, C. E., MCKENZIE, J. C. e DOUGAN, M. C. R. The effects of acute exposure to the water soluble fraction of fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.102C, p. 185-188, 1992.

DAVISON, W., FRANKLIN, G. E., MCKENZIE, J. C. e CAREY, P. W. The effects of chronic exposure to the water soluble

fraction of fuel oil on an Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.104C, p. 67–70, 1993.

DELEVE, L. D. e KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v.52, p. 287-305, 1991.

DENNERY, P. A. Introduction to serial review on heme oxygenase in human disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.37, p. 1095-6, 2004.

DERISIO, J. C. **Introdução ao controle de poluição ambiental**. São Paulo: Cetesb, 1992.

DESAI, S. R., VERLECAR, X. N., NAGARAJAPPA e GOSWAMI, U. Genotoxicity of cadmium in marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* using the alkaline Comet assay. **Ecotoxicology**, v.15, p. 359-63, 2006.

DICKINSON, D. A., LEVONEN, A. L., MOELLERINO, D. R., ARNOLD, E. K., ZHANG, H., DARLEY-USMAR, V. M. e FORMAN, H. J. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. **Free Radical Biology and Medicine**, v.37, p. 1152–1159, 2004.

DIZDAROGLU, M., JARUGA, P., BIRINCI OGLU, M. e RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radical Biology and Medicine**, v.32, p. 1102-15, 2002.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.82, p. 70-7, 1959.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., JR. e FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p. 88-95, 1961.

FARRINGTON, J. W., FREW, N. M., GESHWNEND, P. M. e TRIPP, R. W. Hydrocarbons in cores of northwestern Atlantic coastal

and continental margin sediments. **Estuarine and Coastal Marine Science**, v.5, p. 793-808, 1977.

FATMA, Fundação de Amparo ao Meio Ambiente. **Atlas Ambiental da Região de Joinville: Complexo Hídrico da Baía da Babitonga**. ed. 2003. p.168.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v.205, p. 223-40, 2004.

FERRARI, A., VENTURINO, A. e PECHEN DE D'ANGELO, A. M. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146C, p. 308-13, 2007.

FERREIRA, M., MORADAS-FERREIRA, P. e REIS-HENRIQUES, M. A. The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary, Portugal. **Marine Environmental Research**, v.61, p. 326-38, 2006.

FERREIRA, M., MORADAS-FERREIRA, P. e REIS-HENRIQUES, M. A. The effect of long-term depuration on levels of oxidative stress biomarkers in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to contaminants. **Marine Environmental Research**, v.64, p. 181-90, 2007.

FIRAT, O. e KARGIN, F. Biochemical alterations induced by Zn and Cd individually or in combination in the serum of *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.36, p. 647-53, 2010.

FISHER, A. B., DODIA, C., MANEVICH, Y., CHEN, J. W. e FEINSTEIN, S. I. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, p. 21326-34, 1999.

FLETCHER, G. L., KING, M. J., KICENIUK, J. W. e ADDISON, R. F. Liver hypertrophy in winter flounder following exposure to experimentally oiled sediments. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.73C, p. 457-62, 1982.

FOURIE, F., REINECKE, S. A. e REINECKE, A. J. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.67, p. 361-8, 2007.

FRANCO, J. L., POSSER, T., MATTOS, J. J., SANCHEZ-CHARDI, A., TREVISAN, R., OLIVEIRA, C. S., CARVALHO, P. S., LEAL, R. B., MARQUES, M. R., BAINY, A. C. e DAFRE, A. L. Biochemical alterations in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) exposed to zinc: glutathione reductase as a target. **Marine Environmental Research**, v.66, p. 88-9, 2008.

FRANCO, J. L., TREVISAN, R., POSSER, T., TRIVELLA, D. B., HOPPE, R., MARTINS ROSA, J., FERNANDES DINSLAKEN, D., DECKER, H., INES TASCA, C., BAINY LEAL, R., FREIRE MARQUES, M. R., DIAS BAINY, A. C. e LUIZ DAFRE, A. Biochemical alterations in caged Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p. 864-72, 2010.

FRANCO, J. L., TRIVELLA, D. B., TREVISAN, R., DINSLAKEN, D. F., MARQUES, M. R., BAINY, A. C. e DAFRE, A. L. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p. 232-40, 2006.

GAGNON, M. M. e DODSON, J. J. Congener-specific analysis of the accumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by aquatic organism in the maximum turbidity zone of the St. Lawrence estuary, Québec, Canada. **Science of the Total Environment**, v.97/98, p. 739-759, 1990.

GALLAGHER, E. P., HASSPIELER, B. M. e DI GIULIO, R. T. Effects of buthionine sulfoximine and diethyl maleate on glutathione turnover in the channel catfish. **Biochemical Pharmacology**, v.43, p. 2209-15, 1992.

GALLOWAY, T. S., BROWN, R. J., BROWNE, M. A., DISSANAYAKE, A., LOWE, D., JONES, M. B. e DEPLEDGE, M. H. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project-a multi-biomarker approach to ecosystem management. **Marine Environmental Research**, v.58, p. 233-7, 2004.

GIORDANO, G., KAVANAGH, T. J. e COSTA, L. G. Neurotoxicity of a polybrominated diphenyl ether mixture (DE-71) in mouse neurons and astrocytes is modulated by intracellular glutathione levels. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.232, p. 161-8, 2008.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. The **Journal of Lipid Research**, v.39, p. 1529-42, 1998.

GLOCK, G. E. e MC LEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v.55, p. 400-8, 1953.

GOKSOYR, A. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. **Archives of Toxicology Supplement**, v.17, p. 80-95, 1995.

GOKSOYR, A. e HUSOY, A. M. Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. **Experientia**, v.86, p. 165-202, 1998.

GONZALEZ-OREJA, J. A. e SAIZ-SALINAS, J. I. Short-term spatio-temporal changes in urban pollution by means of faecal sterols analysis. **Marine Pollution Bulletin**, v.36, p. 868-875, 1998.

GOWLAND, B., MCINTOSH, A., DAVIES, I., MOFFAT, C. e WEBSTER, L. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. **Marine Environmental Research**, v.54, p. 231-5, 2002.

GRANT, C. M. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. **Journal of Biology**, v.7, p. 1, 2008.

GREEN, G. e NICHOLS, P. D. Hydrocarbons and sterols in marine sediments and soils at Davis Station, Antarctica: a survey for human-derived contaminants. **Antarctic Science**, v.7, p. 137-144, 1995.

GRIMALT, J. O., FERNANDEZ, P., BAYONA, J. M. e ALBAIGES, J. Assessment of fecal sterols and ketones as indicator of urban sewage inputs to coastal waters. **Environmental Science and Technology**, v.24, p. 357-363, 1990.

GULICK, A. M. e FAHL, W. E. Mammalian glutathione S-transferase: regulation of an enzyme system to achieve chemotherapeutic efficacy. **Pharmacology and Therapeutics**, v.66, p. 237-57, 1995.

GUTTERIDGE, J. M. e HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the Lyceum of Natural History of New York**, v.899, p. 136-47, 2000.

HABIG, W. H. e JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods in Enzymology**, v.77, p. 218-31, 1981.

HAHN, M. E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. **Chemico-biological interactions**, v.141, p. 131-60, 2002.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Third edition. ed. Oxford: 2007. 936p.

HANSON, N. e LARSSON, A. Fixed wavelength fluorescence to detect PAH metabolites in fish bile: increased statistical power with an alternative dilution method. **Environmental monitoring and assessment**, v.144, p. 221-8, 2008.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **The Journals of Gerontology**, v.11, p. 298-300, 1956.

HASSPIELER, B. M., BEHAR, J. V. e DI GIULIO, R. T. Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameriurus nebulosus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.28, p. 82-90, 1994.

HEGELUND, T. e CELANDER, M. C. Hepatic versus extrahepatic expression of CYP3A30 and CYP3A56 in adult killifish (*Fundulus heteroclitus*). **Aquatic Toxicology**, v.64, p. 277-91, 2003.

HELMA, C. e UHL, M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. **Mutation research**, v.466, p. 9-15, 2000.

HERCEG, Z. e WANG, Z. Q. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. **Mutation research**, v.477, p. 97-110, 2001.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). Functional metabolism: regulation and adaptation. New York: John Wiley & Sons: 2004. p.319-368

HOFMANN, B., HECHT, H. J. e FLOHE, L. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**, v.383, p. 347-64, 2002.

HOU, W.-C., CHEN, H.-J., HAN, C.-H., LIN, C.-Y. e LIN, Y.-H. Glutathione peroxidase-like activity of 33 kDa trypsin inhibitor from roots of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam [[^]]Tainong 57'). **Plant Science**, v.166, p. 1541-1546, 2004.

IBGE, Instituto brasileiro de geografia e estatística. Dados do Censo 2010 publicados no Diário Oficial da União: 04/11/2010. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/index.php?uf=42>. Acesso em: 04/01/2010.

INSAUSTI, D., CARRASSON, M., MAYNOU, F., CARTES, J. E. e SOLE, M. Biliary fluorescent aromatic compounds (FACs) measured by fixed wavelength fluorescence (FF) in several marine fish species from the NW Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, v.58, p. 1635-42, 2009.

JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v.666-667, p. 387-392, 2003.

JORGENSEN, M., GROSVIK, B. E., HAMRE, K. e GOKSOYR, A. Induction of heme oxygenase in fish by heavy metals, phenylhydrazine and high lipid diets. **Marine Environmental Research**, v.46, p. 559-561, 1998.

KALARIYA, N. M., NAIR, B., KALARIYA, D. K., WILLS, N. K. e VAN KUIJK, F. J. G. M. Cadmium-induced induction of cell death in human lens epithelial cells: Implications to smoking associated cataractogenesis. **Toxicology Letters**, v.198, p. 56-62 2010.

KAWAKAMI, S. K. e MONTONE, R. C. An Efficient Ethanol-Based Analytical Protocol to Quantify Faecal Steroids in Marine Sediments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.13, p. 226-232, 2002.

KENSLER, T. W., WAKABAYASHI, N. e BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.47, p. 89-116, 2007.

KEPPLER, D. Export pumps for glutathione S-conjugates. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v.27, p. 985-91, 1999.

KIRBY, M. F., NEALL, P. e TYLOR, T. EROD activity measured in flatfish from the area of the Sea Empress oil spill. **Chemosphere**, v.38, p. 2929-49, 1999.

KLING, P., NORMAN, A., ANDERSSON, P. L., NORRGREN, L. e FORLIN, L. Gender-specific proteomic responses in zebrafish liver following exposure to a selected mixture of brominated flame retardants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, p. 319-27, 2008.

KLOTZ, A. V., STEGEMAN, J. J., WOODIN, B. R., SNOWBERGER, E. A., THOMAS, P. E. e WALSH, C. Cytochrome P-450 isozymes from the marine teleost *Stenotomus chrysops*: their roles in steroid hydroxylation and the influence of cytochrome b5. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.249, p. 326-38, 1986.

LAW, R. J. e BISCAYA, J. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. **Marine Pollution Bulletin**, v.29, p. 235-241, 1994.

LEE, R. F. e ANDERSON, J. W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic

compounds in marine wildlife following oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v.50, p. 705-23, 2005.

LEE, S. J. e BUHLER, D. R. Cloning, tissue distribution, and functional studies of a new cytochrome P450 3A subfamily member, CYP3A45, from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal ceca. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.412, p. 77-89, 2003.

LEPPÄNEN, H., MARTTINEN, S. e OIKARI, A. The use of fish bile metabolite analyses as exposure biomarkers to pulp and paper mill effluents. **Chemosphere**, v.36, p. 2621-2634, 1998.

LEWIS, D. F. e LAKE, B. G. Molecular modelling of CYP1A subfamily members based on an alignment with CYP102: rationalization of CYP1A substrate specificity in terms of active site amino acid residues. **Xenobiotica**, v.26, p. 723-53, 1996.

LEWIS, N. A., WILLIAMS, T. D. e CHIPMAN, J. K. Functional analysis of a metal response element in the regulatory region of flounder cytochrome P450 1A and implications for environmental monitoring of pollutants. **Toxicological Sciences**, v.92, p. 387-93, 2006.

LI, D., YANG, X. L., ZHANG, S. J., LIN, M., YU, W. J. e HU, K. Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.147C, p. 17-29, 2008.

LIMA, P. L., BENASSI, J. C., PEDROSA, R. C., DAL MAGRO, J., OLIVEIRA, T. B. e WILHELM FILHO, D. Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.50, p. 23-30, 2006.

LINDAHL, T., SATOH, M. S., POIRIER, G. G. e KLUNGLAND, A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. **Trends in Biochemical Sciences**, v.20, p. 405-11, 1995.

LINDEROTH, M., HANSSON, T., LIEWENBORG, B., SUNDBERG, H., NOAKSSON, E., HANSON, M., ZEBUHR, Y. e BALK, L. Basic physiological biomarkers in adult female perch (*Perca fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden). **Marine Pollution Bulletin**, v.53, p. 437-50, 2006.

LOUIZ, I., BEN-ATTIAB, M. e BEN-HASSINE, O. K. Gonadosomatic index and gonad histopathology of *Gobius niger* (Gobiidea, Teleost) from Bizerta lagoon (Tunisia): Evidence of reproduction disturbance. **Fisheries Research**, v.100, p. 266–273, 2009.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v.101, p. 13-30, 2010.

MACHALA, M., DRABECK, P., NECA, J., KOLAROVA, J. e SVOBODOVA, Z. Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.41, p. 107–111, 1998.

MACLEOD, W. D., BROWN, D. W., FRIEDMAN, A. J., BURROWS, D. G., MAYNES, O., PEARCE, R. W., PEARCE, R. W., WIGREN, C. A. e BOGAR, R. G. Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986. Extractable Toxic Organic Components. Second edition, U. S. Department of Commerce, NOAA/NMFS. NOAA National Status and Trends Program. NMFS F/NWC-92, 121.

MALINS, D. C. e HODGINS, H. O. Petroleum and marine fishes: a review of uptake, disposition and effects. **Environmental Science and Technology**, v.15, p. 1272-1280, 1981.

MARCHAND, M. J., PIETERSE, G. M. e BARNHOORN, I. E. J. Preliminary results on sperm motility and testicular histology of two feral fish species, *Oreochromis mossambicus* and *Clarias gariepinus*, from a currently DDT-sprayed area, South Africa. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p. 423–429, 2008.

MARI, M., MORALES, A., COLELL, A., GARCIA-RUIZ, C. e FERNANDEZ-CHECA, J. C. Mitochondrial glutathione, a key survival

antioxidant. **Antioxidants and redox signaling**, v.11, p. 2685-700, 2009.

MARIA, V. L., AHMAD, I., OLIVEIRA, M., SERAFIM, A., BEBIANNO, M. J., PACHECO, M. e SANTOS, M. A. Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 1861-70, 2009.

MARIGÓMEZ, I., BAYBAY-VILLACORTA, L. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. **Aquatic Toxicology**, v.64, p.235-57, 2003.

MARIONNET, D., DESCHAUX, P. e REYNAUD, S. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Shellfish Immunology**, v.21, p. 80-91, 2006.

MARTINEZ-ALVAREZ, R. M., MORALES, A. E. e SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. **Reviews of Fish Biology and Fisheries**, v.15, p. 75-88, 2005.

MARTINS, C. C., FERREIRA, J. A., TANIGUCHI, S., MAHIQUES, M. M., BÍCEGO, M. C. e MONTONE, R. C. Spatial distribution of sedimentary linear alkylbenzenes and faecal steroids of Santos Bay and adjoining continental shelf, SW Atlantic, Brazil: Origin and fate of sewage contamination in the shallow coastal environment. **Marine Pollution Bulletin**, v.56 p. 1353–1376, 2008.

MATOS, M. A. C. Resíduos de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em sedimentos e algas de Santos e Cananéia, SC, Brasil. Instituto de Química Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MATTOS, J. J. Respostas bioquímicas e moleculares no peixe *Poecilia vivipara* exposto a fração de óleo diesel acomodada em água. Bioquímica, UFSC, Florianópolis, 2010.

MAULIK, N. e DAS, D. K. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1780, p. 1368-1382, 2008.

MEDEIROS, P. M. e BÍCEGO, M. C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.49, p. 761–769, 2004.

MEISTER, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p. 9397-9400, 1994.

MEISTER, A. e ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, p. 711-60, 1983.

MEISTER, A., GRIFFITH, O. W., NOVOGRODSKY, A. e TATE, S. S. New aspects of glutathione metabolism and translocation in mammals. **Ciba Foundation Symposia**, p. 135-61, 1979.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, BRASIL. Proíbe a comercialização, uso e a distribuição de produtos agrotóxicos, salvo exceções: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Portaria nº 329/85 1985. Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7321>>.

Acesso em: 06/01/2010.

MITOZO, P. A. Comparação entre sistemas de degradação de peróxidos tendo como modelo fatias de hipocampo de ratos e duas linhagens celulares, glioma de ratos (C6) e neuroblastoma de camundongos (N2a). Programa de pós-graduação em neurociências, UFSC, Florianópolis, 2010.

MODESTO, K. A. e MARTINEZ, C. B. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v.81, p. 781-7, 2010.

MOORE, M. N. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. **Histochemical Journal**, v.22, p.187-91, 1990.

MOORE, M.N., ALLEN, J.I., MCVEIGH, A. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. **Marine Environmental Research**, v.61, p.278-304, 2006.

MOORE, M. N., DEPLEDGE, M. H., READMAN, J. W. e PAUL LEONARD, D. R. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation research**, v.552, p. 247-68, 2004.

MUDGE, S. M. e SEGUEL, C. G. Organic Contamination of San Vicente Bay, Chile. **Marine Pollution Bulletin**, v.38, p. 1011-1021, 1999.

NADIN, S. B., VARGAS-ROIG, L. M. e CIOCCA, D. R. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.49, p. 1183-1186, 2001.

NALLANI, S. C., GOODWIN, B., BUCKLEY, A. R., BUCKLEY, D. J. e DESAI, P. B. Differences in the induction of cytochrome P450 3A4 by taxane anticancer drugs, docetaxel and paclitaxel, assessed employing primary human hepatocytes. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.54, p. 219-29, 2004.

NIYOGI, S., BISWAS, S., SARKER, S. e DATTA, A. G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v.52, p. 13-26, 2001.

NOTAR, M., LESKOV, H. e FAGANELI, J. Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p. 36-44, 2001.

OLIVEIRA, M., AHMAD, I., MARIA, V. L., PACHECO, M. e SANTOS, M. A. Monitoring pollution of coastal lagoon using *Liza aurata* kidney oxidative stress and genetic endpoints: an integrated biomarker approach. **Ecotoxicology**, v.19, p. 643-53, 2010.

OLIVEIRA, T. M. N., RIBEIRO, J. M. G. e MAGNA, D. J. **Diagnóstico ambiental do Rio do Braço**. ed. Joinville, SC: Univille, 2009.

PADMINI, E. e RANI, M. U. Evaluation of oxidative stress biomarkers in hepatocytes of grey mullet inhabiting natural and polluted estuaries. **The Science of the Total Environment**, v.407, p. 4533-41, 2009.

PARK, S. S., MILLER, H., KLOTZ, A. V., KLOPPER-SAMS, P. J., STEGEMAN, J. J. e GELBOIN, H. V. Monoclonal antibodies to liver microsomal cytochrome P-450E of the marine fish *Stenotomus chrysops* (scup): cross reactivity with 3-methylcholanthrene induced rat cytochrome P-450. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.249, p. 339-50, 1986.

PARKERTON, T. F., ARNOT, J. A., WEISBROD, A. V., RUSSOM, C., HOKE, R. A., WOODBURN, K., TRAAS, T., BONNELL, M., BURKHARD, L. P. e LAMPI, M. A. Guidance for evaluating in vivo fish bioaccumulation data. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.4, p. 139-55, 2008.

PARVEZ, S., PANDEY, S., ALI, M. e RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress in Wallago attu (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. **The Science of the Total Environment**, v.368, p. 627-36, 2006.

PATHIRATNE, A., PATHIRATNE, K. A. e DE SERAM, P. K. Assessment of biological effects of pollutants in a hyper eutrophic tropical water body, Lake Beira, Sri Lanka using multiple biomarker responses of resident fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology**, v.19, p. 1019-26, 2010.

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

PEDRAJAS, J. R., KOSMIDOU, E., MIRANDA-VIZUETE, A., GUSTAFSSON, J. A., WRIGHT, A. P. e SPYROU, G. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin

system in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Biology**, v.274, p. 6366-73, 1999.

PEDROSA, R. C., GEREMIAS, R., SILVA, M. H., FIGNA, V., LOCATELLI, C. e D., W. F. Biomonitoramento do estuário do rio Itajaí-açu/SC, utilizando a indução do citocromo P4501A e glutathiona-S-transferase de bagres como biomarcadores. In: MORAES, R. T., V.; CRAPEZ, M.; PFEIFFER, W; FARINA, M.; BAINY, A. (Ed.). Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos. São Paulo: Villipress, 2001.

PENA-LLOPIS, S., PENA, J. B., SANCHO, E., FERNANDEZ-VEGA, C. e FERRANDO, M. D. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. **Chemosphere**, v.45, p. 671-81, 2001.

PESKIN, A. V., LOW, F. M., PATON, L. N., MAGHZAL, G. J., HAMPTON, M. B. e WINTERBOURN, C. C. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H(2)O(2) is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. **Journal of Chemical Biology**, v.282, p. 11885-92, 2007.

POLEO, A. B., K, O. S., OXNEVAD, S. A., ANDERSEN, R. A., HEIBO, E. e VOLLESTAD, L. A. Toxicity of acid aluminium-rich water to seven freshwater fish species: a comparative laboratory study. **Environmental Pollution**, v.96, p. 129-39, 1997.

REGOLI, F. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.34, p. 48-63, 1998.

REGOLI, F., GORBI, S., FRENZILLI, G., NIGRO, M., CORSI, I., FOCARDI, S. e WINSTON, G. W. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**, v.54, p. 419-23, 2002a.

REGOLI, F., PELLEGRINI, D., WINSTON, G. W., GORBI, S., GIULIANI, S., VIRNO-LAMBERTI, C. e BOMPADRE, S. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses

and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p. 912-22, 2002b.

REGOLI, F. e PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v.31, p. 143-164, 1995.

REISCHL, E., DAFRE, A. L., FRANCO, J. L. e WILHELM FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146C, p. 22-53, 2007.

REQUENA, J. R., FU, M. X., AHMED, M. U., JENKINS, A. J., LYONS, T. J. e THORPE, S. R. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v.11 Suppl 5, p. 48-53, 1996.

RHEE, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Experimental and Molecular Medicine**, v.31, p. 53-9, 1999.

RHEE, S. G., CHAE, H. Z. e KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v.38, p. 1543-1552, 2005.

ROSA, R. M., HOCH, N. C., FURTADO, G. V., SAFFI, J. e HENRIQUES, J. A. P. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. **Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.633, p. 35-45, 2007.

RUSHMORE, T. H., MORTON, M. R. e PICKETT, C. B. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. **Journal of Chemical Biology**, v.266, p. 11632-9, 1991.

SANCHEZ, W., AIT-AISSA, S., PALLUEL, O., DITCHE, J. M. e PORCHER, J. M. Preliminary investigation of multi-biomarker

responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus L.*) sampled in contaminated streams. **Ecotoxicology**, v.16, p. 279-87, 2007.

SANCHO, E., CERON, J. J. e FERRANDO, M. D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.46, p. 81-6, 2000.

SCHLEZINGER, J. J. e 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*). **Aquatic Toxicology**, v.52, p. 101-15, 2001.

SEN, A., ULUTAS, O. K., TUTUNCU, B., ERTAS, N. e COK, I. Determination of 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) induction in leaping mullet (*Liza saliens*) from the highly contaminated Aliaga Bay, Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, 165, p. 87-96, 2009.

SHALL, S. e DE MURCIA, G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? **Mutation Research**, v.460, p. 1-15, 2000.

SHEADER, D. L., WILLIAMS, T. D., LYONS, B. P. e CHIPMAN, J. K. Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray. **Marine Environmental Research**, v.62, p. 33-44, 2006.

SHEEHAN, D., MEADE, G., FOLEY, V. M. e DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical Journal**, v.360, p. 1-16, 2001.

SHELTON, M. D., CHOCK, P. B. e MIEYAL, J. J. Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.7, p. 348-66, 2005.

SHERWIN, M. R. E. S., VAN VLEET, V. U. e FOSSATO, F. D. Coprostanol (5 β -cholestan-3 β -ol) in lagoonal sediments and mussels of Venice, Italy. **Marine Pollution Bulletin**, v.26, p. 501-507, 1993.

SHUVAEVA, T. M., NOVOSELOV, V. I., FESENKO, E. E. e LIPKIN, V. M. Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.35, p. 523-537, 2009.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p. 291-295, 1997.

SIES, H. e MOSS, K. M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. **European Journal of Biochemistry**, v.84, p. 377-83, 1978.

SIMONATO, J. D., GUEDES, C. L. e MARTINEZ, C. B. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p. 112-20, 2008.

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. e SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p. 184-191, 1988.

STAP, Scientific and technical advisory panel of the global environment facility. The use of bioindicators, biomarkers and analytical methods for the analysis of POPs in developing countries: 2004.

STEGEMAN, J. J., BINDER, R. L. e ORREN, A. Hepatic and extrahepatic microsomal electron transport components and mixed-function oxygenases in the marine fish *Stenotomus versicolor*. **Biochemical Pharmacology**, v.28, p. 3431-9, 1979.

STEGEMAN, J. J., KLOTZ, A. V., WOODIN, B. R. e PAJOR, A. M. Induction of hepatic cytochrome p-450 in fish and the Indication of environmental, induction in scup (*Stenotomus chrysops*). **Aquatic Toxicology**, v.1, p. 197-212, 1981.

STEGEMAN, J. J., WOODIN, B. R. e SMOLOWITZ, R. M. Structure, function and regulation of cytochrome P-450 forms in fish. **Biochemical Society Transactions**, v.18, p. 19-21, 1990.

STEIHAUER, M. S. e BOEHM, P. D. The composition and distribution of saturated and aromatic hydrocarbons in nearshore sediments, river sediments, and coastal peat of the Alaskan Beaufort Sea: implications for detecting anthropogenic hydrocarbon inputs. **Marine Environmental Research**, v.33, p. 223-253, 1992.

STOCKER, R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. **Free Radical Research Communications**, v.9, p. 101-12, 1990.

SUN, Y., YIN, Y., ZHANG, J., YU, H., WANG, X., WU, J. e XUE, Y. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, p. 446-53, 2008.

TAKADA, H., ISHIWATARI, R. e OGURA, N. Distribution of linear alkybenzenes (LABs) and Linear alkybenzene-sulphonates (LAS) in Tokyo Bay sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.35, p. 141-156, 1992.

TENTORI, L. e SALVATI, A. M. Hemoglobinometry in human blood. **Methods in Enzymology**, v.76, p. 707-15, 1981.

TERAMITSU, I., YAMAMOTO, Y., CHIBA, I., IWATA, H., TANABE, S., FUJISE, Y., KAZUSAKA, A., AKAHORI, F. e FUJITA, S. Identification of novel cytochrome P450 1A genes from five marine mammal species. **Aquatic Toxicology**, v.51, p. 145-53, 2000.

THANNICKAL, V. J. e FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology. Lung cellular and Molecular Physiology**, v.279, p. L1005-28, 2000.

TRACHOOTHAM, D., LU, W., OGASAWARA, M. A., NILSA, R. D. e HUANG, P. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.10, p. 1343-74, 2008.

TRAN, D., MOODY, A. J., FISHER, A. S., FOULKES, M. E. e JHA, A. N. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. **Aquatic Toxicology**, v.84, p. 11-8, 2007.

TREVISAN, R., MELLO, D. F., FISHER, A. S., SCHUWERACK, P. M., DAFRE, A. L. e MOODY, A. J. Selenium in water enhances antioxidant defenses and protects against copper-induced DNA damage in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v.101, p. 64-71, 2010.

TSENG, H. P., HSEU, T. H., BUHLER, D. R., WANG, W. D. e HU, C. H. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.205, p. 247-58, 2005.

TSUZUKI, T., NAKATSU, Y. e NAKABEPPU, Y. Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. **Cancer Science**, v.98, p. 465-70, 2007.

UNEP, United Nations Environment Programme. Determinations of petroleum hydrocarbons in sediment. Reference methods for marine pollution studies. v.20, p. 97, 1992.

UNIVILLE, Universidade da Região de Joinville. Projeto canal do Linguado: Estudos da Biota Marinha e Química Ambiental da Baía da Babitonga. Pró-Reitoria de Extensão e Assuntos Comunitários. p.368, 2004.

VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M. e SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p. 178-89, 2006.

VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. e MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p. 1-40, 2006.

VAN DEN HURK, P. Bile fluorescence, heme oxygenase induction, and increased biliverdin excretion by mixtures of environmental toxicants. **Aquatic Toxicology**, v.77, p. 202-209 2006.

VAN DER OOST R., BEYER J. e N.P.E., V. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p. 57-149, 2003.

VARANASI, U., STEIN, J. E. e NISHIMOTO, M. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Florida: CRC Press, 1989. p.93-150.

VENKATESAN, M. I. Occurrence and Possible Sources of Perylene in Marine Sediments-a Review. **Marine Chemistry**, v.25 p. 1-27, 1988.

VENKATESAN, M. I., KAPLAN, I. R. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica Basin, southern California. **Environmental Science and Technology**, v.24, p. 208-214, 1990.

VENTURA, E. C., GAELZER, L. R., ZANETTE, J., MARQUES, M. R. e BAINY, A. C. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**, v.54, p. 775-9, 2002.

VENUGOPAL, R. e JAISWAL, A. K. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p. 14960-5, 1996.

VIEIRA, L. R., SOUSA, A., FRASCO, M. F., LIMA, I., MORGADO, F. e GUILHERMINO, L. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (*Teleostei, Gobiidae*). **The Science of the total environment**, v.395, p. 87-100, 2008.

VOLKMAN, J. K., HOLDSWORTH, D. G., NEILL, G. P. e BAVOR, H. J., JR. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. **Science of the total environment**, v.112, p. 203-19, 1992.

WALKER, C. H., HOPKIN, S. P., SIBLY, R. M. e PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, 1996. p.321.

WANG, C., LU, G. H., SONG, W. T., XU, S. e WANG, P. F. Integrated biomarker response index for the assessment of environmental stress of the Yangtze River (Nanjing section). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.36, p. 1069-78, 2010.

WANG, W. e BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, v.50, p. 335-56, 1998.

WARNHOLTZ, A., WENDT, M. e MUNZEL, T. When sleeping beauty turns ugly: mitochondria in hypoxia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.22, p. 525-7, 2002.

WEISBROD, A. V., BURKHARD, L. P., ARNOT, J., MEKENYAN, O., HOWARD, P. H., RUSSOM, C., BOETHLING, R., SAKURATANI, Y., TRAAS, T., BRIDGES, T., LUTZ, C., BONNELL, M., WOODBURN, K. e PARKERTON, T. Workgroup report: review of fish bioaccumulation databases used to identify persistent, bioaccumulative, toxic substances. **Environmental Health Perspectives**, v.115, p. 255-61, 2007.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.77, p. 325-33, 1981.

WESSEL, N., SANTOS, R., MENARD, D., LE MENACH, K., BUCHET, V., LEBAYON, N., LOIZEAU, V., BURGEOT, T., BUDZINSKI, H. e AKCHA, F. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). **Marine Environmental Research**, v.69 Suppl, p. S71-3, 2010.

WHITFIELD, J. B. Gamma glutamyl transferase. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.38, p. 263-355, 2001.

WHO, World Health Organization. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. In: Environmental Health Criteria. Geneva, v.222, 2001. p.238.

WILHELM FILHO, D., TORRES, M. A., TESTA, C. P., TRIBESS, T., GEREMIAS, R., PEDROSA, R. C. e SILVA, M. H.

Estresse Oxidativo em Bagres *Genidens genidens* (Arridae) do Litoral de Santa Catarina. In: MORAES, R. T., V.; CRAPEZ, M.; PFEIFFER, W.; FARINA, M.; BAINY, A. (Ed.). Efeitos de poluentes em organismos marinhos. São Paulo: Villipress, 2001a.

WILHELM FILHO, D., TORRES, M. A., TRIBESS, T. B., PEDROSA, R. C. e SOARES, C. H. L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p. 719-726, 2001b.

WINSTON, G. W. e DIGIULIO, R. T. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. **Aquatic Toxicology**, 19: 137-161 p. 1991.

WINTERBOURN, C. C. e HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v.45, p. 549-561, 2008.

WOOD, Z. A., SCHRÖDER, E., ROBIN HARRIS, J. e POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences**, v.28, p. 32-40, 2003.

YAO, D. F. e DONG, Z. Z. Hepatoma-related gamma-glutamyl transferase in laboratory or clinical diagnosis of hepatocellular carcinoma. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, v.6, p. 9-11, 2007.

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J., HOFFMASTER, K. A., NEZASA, K., TALLMAN, M. N. e BROUWER, K. L. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.27, p. 447-86, 2006.