

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



MARLYETE CHAGAS DE ARAÚJO

**Biomonitoramento em um Riacho Urbano Utilizando Marcadores
Bioquímicos, Genotóxicos e Hematológicos de *Hoplosternum littorale*;
Hancock, 1828 (Actinopterygii: Callichthyidae)**

RECIFE

2019

MARLYETE CHAGAS DE ARAÚJO

**Biomonitoramento em um Riacho Urbano Utilizando Marcadores
Bioquímicos, Genotóxicos e Hematológicos de *Hoplosternum littorale*;
Hancock, 1828 (Actinopterygii: Callichthyidae)**

Tese apresentada ao Programa de **Pós-Graduação em
Ciências Biológicas**, da **Universidade Federal de
Pernambuco**, como parte dos requisitos à obtenção do
título de Doutora em **Ciências Biológicas**.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Co-orientadores: Profa. Dr. Ranilson de Souza Bezerra.

Dr. Caio Rodrigo Dias Assis

RECIFE

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Araújo, Marlyete Chagas de

Biomonitoramento em um riacho urbano utilizando marcadores bioquímicos, genéticos e hematológicos de *Hoplosternum littorale*; Hancock, 1828 (Actinopterygii: Callichthyidae) / Marlyete Chagas de Araújo – 2019.

156 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira

Coorientadores: Ranilson de Souza Bezerra e Caio Rodrigo Dias Assis

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019. Inclui referências.

1. Peixes 2. Ecossistema aquático 3. Biomarcadores I. Oliveira, Maria Betânia Melo de (orient.) II. Bezerra, Ranilson de Souza (coorient.) III. Assis, Caio Rodrigo Dias (coorient.) IV. Título

597

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-114

MARLYETE CHAGAS DE ARAÚJO

**Biomonitoramento em um Riacho Urbano Utilizando Marcadores
Bioquímicos, Genotóxicos e Hematológicos de *Hoplosternum littorale*;
Hancock, 1828 (Actinopterygii: Callichthyidae)**

Aprovada em 28/11/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira – Orientadora
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra – Membro interno
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Valdir Luna da Silva – Membro externo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Mônica Lúcia Adam – Membro externo
Universidade Federal de Pernambuco – CAV/UFPE

Dra. Renata Cristina da Penha França – Membro externo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

A minha querida e eterna mãe Edileusa Araújo
pelo cuidado e amor que me dedicou
durante toda a sua vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aquele que é dono de toda ciência, sabedoria e poder. Agradeço ao meu Deus que é fiel para cumprir as suas promessas. Obrigada Senhor por toda misericórdia e amor. Por sempre estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida, sendo o meu refúgio e fortaleza, me sustentando e sendo meu socorro na hora da angústia. Obrigada por me abençoar e me permitir alcançar essa graça.

Agradeço a minha mãe Edileusa Araújo, a quem dedico esta tese, que hoje é uma estrelinha e está no céu vibrando por essa minha conquista como ela sempre fez. Agradeço a toda minha família, em especial ao meu esposo Rafael Gomes, pelo convívio diário, por aceitar as minhas escolhas e estar sempre ao meu lado me incentivando e apoiando. Agradeço a minha filhinha Luísa que foi o combustível que meu deu força para que eu conseguisse seguir em frente mesmo depois da perda da minha mãe. Agradeço a minha sogra Gilvanice Gomes que foi meu braço direito me dando todo o suporte ao cuidar de minha filha nos momentos em que eu estava na faculdade correndo atrás desse sonho. Agradeço aos meus três irmãos por todo amor, apoio e palavras de incentivo e as minhas sobrinhas em especial minha best Aninha que tem sido minha amiga e companheira fiel.

Agradeço ao prof. Dr. Ranilson Bezerra por ter aceitado me orientar me recebendo de braços abertos no Labenz e por sempre estar solícito a me ajudar. Agradeço em especial a minha orientadora amada e querida prof. Dra. Maria Betânia que sempre acreditou em meu potencial. A ela agradeço pela confiança, por todos esses anos de parceria, por todos os ensinamentos, apoio, amizade, dedicação e carinho. Devo um agradecimento especial também a Caio Assis, meu amigo e co-orientador. Obrigada pela amizade e confiança, por todo o conhecimento a mim transmitido, pelas horas do seu tempo que dedicou a me ensinar e me ajudar. E não posso me esquecer de agradecer ao Professor Valdir Luna que me acolheu com tanto carinho no laboratório de fisiologia o qual hoje me sinto parte e a professora Mônica Adam por ter aceitado a parceria que resultou em um dos trabalhos que compõe essa tese.

Agradeço aos meus amigos que muito contribuíram para que eu conseguisse chegar ao final dessa jornada, seja me ajudando nas coletas e/ou experimentos, seja me dando um apoio moral e incentivo, Ana Vitória, Kaline, Kelma, Anderson, Luciano, Rafael, Rici e Flávia. Agradeço também a seu Hildes pela alegria com que me recebia e me cumprimentava diariamente quando eu chegava no departamento de fisiologia, sempre com um elogio e muito bom humor. Por fim, agradeço a Adenilda pela preocupação e disponibilidade de ajudar para que eu cumprisse com êxito todas as etapas desse doutorado. Por fim agradeço aos meus amigos da vida que estão sempre torcendo por mim e me desejando o melhor. Agradeço a Capes, pelo apoio financeiro.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem sucedidos”.
(Provérbios 16 :3)

RESUMO

O riacho Cavouco é um afluente do rio Capibaribe – um dos principais rios do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil) – e ao longo do seu percurso recebe descargas de resíduos químicos, hospitalares e domésticos. Essa carga poluidora pode induzir nas espécies desse ecossistema uma série de alterações bioquímicas, genéticas e hematológicas, podendo comprometer sua adaptabilidade e sobrevivência. O objetivo deste trabalho foi realizar o biomonitoramento no riacho Cavouco por meio de marcadores bioquímicos, genotóxicos e hematológicos da espécie *Hoplosternum littorale*. Coletas semestrais foram realizadas durante os anos de 2015 e 2016 em três pontos (P1, P2, P3) desse riacho, em períodos de chuva e estiagem. Os espécimes do grupo controle foram coletados nesse ambiente e depurados por 35 dias em aquários com aeração constante. Os animais foram anestesiados e após sedação foi coletado o sangue para realização dos ensaios genotóxicos (ensaio cometa, teste de micronúcleos e anormalidades nucleares) e hematológicos (contagem diferencial de leucócitos). Em seguida, foram retirados os tecidos (cérebro, músculo e fígado) para análise das enzimas acetilcolinesterase (AChE), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Para investigação do estresse oxidativo foram analisadas espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO) através de espectrofluorimetria. Concomitantemente, dois litros de água foram coletados em cada ponto de amostragem para determinação analítica de sete íons metálicos (cádmio, chumbo, cobre, cromo, ferro, manganês e zinco) e a medição de cinco variáveis ambientais (pH, temperatura, condutividade, sólidos totais dissolvido e oxigênio dissolvido) foram realizadas por meio de uma sonda multiparâmetro. A AChE cerebral de *H. littorale* foi caracterizada e mostrou potencial como biomarcador de pesticidas (principalmente Diclorvós) e íons metálicos (principalmente Mercúrio). Picos máximos de atividade foram obtidos em pH 8,0 e 30 °C. A atividade enzimática foi moderadamente termoestável ($\approx 45\%$ de atividade a 45 °C). A enzima foi capaz de reduzir a energia de ativação da reação de hidrólise da acetilcolina para 8,338 kcal.mol⁻¹ obtendo uma aceleração catalítica de 10⁶. Este estudo apresenta ainda o primeiro relato de inibição da AChE cerebral de siluriformes por novaluron e piriproxifeno. Os resultados evidenciaram, também, a presença de agentes genotóxicos no riacho Cavouco. Altos índices de danos e frequências de danos ao DNA foram constatados em relação aos espécimes controle (ID₂₀₁₅ = 4,03x; FD%₂₀₁₅ = 2,45x; ID₂₀₁₆ = 5,46x; FD%₂₀₁₆ = 2,46x) em todos os períodos analisados. No que se refere ao teste de micronúcleo (MN), o ponto P3 (à jusante dos demais e com predomínio de efluentes hospitalares) foi o único que não apresentou diferença significativa em relação ao controle, todavia foi o ponto que mais diferiu em termos de anormalidades nucleares (AN). A quantificação de AN resultou na seguinte ordem: P3 > P1 > P2. Em relação às análises hematológicas os tipos leucocitários eosinófilo e basófilo, não foram encontrados nos espécimes de *H. littorale*, por outro lado todos espécimes apresentaram alta relação neutrófilos/linfócitos nos períodos analisados, indicando que os peixes estão infectados. Os resultados da análise da atividade da AChE evidenciaram a presença de agentes anticolinesterásicos nas águas deste riacho, uma vez que ocorreu decréscimo significativo na atividade dessa enzima, nas amostras de cérebro e músculo de Tamoatá provenientes do Cavouco, em relação as amostras controle (1312,0 mU.mg de proteína⁻¹), em todos os períodos analisados. As análises das enzimas detoxificadoras CAT e SOD demonstraram maior estresse oxidativo nos espécimes dos três pontos em relação ao controle (29,6 e 31,1 mU.mg de proteína⁻¹, respectivamente) e estes resultados foram corroborados pelo TBARS, geração de ROS e NO[•]. Tais resultados podem ser atribuídos à presença de agentes anticolinesterásicos, poluentes específicos de efluentes laboratoriais e hospitalares e a presença de agentes infecciosos na água do riacho Cavouco. De modo geral, os resultados das análises físico-química da água estão dentro dos limites estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (resolução nº 357/2005), porém é verificável a contaminação por origem antrópica, devido ao baixo teor de oxigênio dissolvido e presença de alguns metais pesados (ferro, manganês, zinco, chumbo e cobre), os quais mesmo em concentrações subletais podem afetar os ecossistemas aquáticos. Estes resultados apontam para a necessidade de um manejo e descarte adequado dos resíduos que atualmente são lançados sem tratamento neste ecossistema.

Palavras - Chave: Monitoramento ambiental. Biomarcadores. Ecossistema aquatic. Peixes.

ABSTRACT

The Cavouco stream is a tributary of the Capibaribe River - one of the main rivers in the state of Pernambuco (Northeast Brazil) - and along its course receives discharges of chemical, hospital and domestic waste. This pollutant charge may induce in the species of this ecosystem a series of biochemical, genetic and hematological alterations, which may compromise its adaptability and survival. The objective of this work was to perform biomonitoring in the Cavouco stream using biochemical, genotoxic and hematological markers of the species *Hoplosternum littorale*. Semi-annual collections were carried out during 2015 and 2016 at three points (P1, P2, P3) of this stream, during periods of rain and drought. The control group specimens were collected in this environment and cleaned for 35 days in aquariums with constant aeration. The animals were anesthetized and after sedation, blood was collected for genotoxic (comet assay, micronucleus and nuclear abnormalities) and hematological (differential leukocyte count) assays. The tissues (brain, muscle and liver) were then removed for analysis of acetylcholinesterase (AChE), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes. For the investigation of oxidative stress reactive oxygen (ROS) and nitrogen (NO) species were analyzed by spectrofluorimetry. At the same time, two liters of water were collected at each sampling point for analytical determination of seven metal ions (cadmium, lead, copper, chromium, iron, manganese and zinc) and the measurement of five environmental variables (pH, temperature, conductivity, total dissolved solids and dissolved oxygen) were performed using a multiparameter probe. *H. littorale* cerebral AChE was characterized and showed potential as a biomarker of pesticides (mainly Dichlorvos) and metal ions (mainly Mercury). Maximum activity peaks were obtained at pH 8.0 and 30 °C. Enzyme activity was moderately thermostable ($\approx 45\%$ activity at 45 °C). The enzyme was able to reduce the activation energy of the acetylthiocoline hydrolysis reaction to 8,338 kcal.mol⁻¹ obtaining a catalytic acceleration of 106. This study also presents the first report of brain AChE inhibition of siluriform by novaluron and pyriproxyfen. The results also showed the presence of genotoxic agents in the Cavouco stream. High rates of damage and frequencies of DNA damage were found in relation to control specimens (ID2015 = 4.03x; FD% 2015 = 2.45x; ID2016 = 5.46x; FD% 2016 = 2.46x) in all periods analyzed. Regarding the micronucleus test (MN), the point P3 (downstream of the others and with predominance of hospital effluents) was the only one that did not present significant difference in relation to the control, however it was the point that differed most in terms of nuclear abnormalities (AN). The quantification of AN resulted in the following order: P3 > P1 > P2. Regarding the hematological analyzes, the eosinophil and basophil leukocyte types were not found in *H. littorale* specimens. On the other hand, all specimens presented a high neutrophil / lymphocyte ratio in the analyzed periods, indicating that the fish are infected. The results of the analysis of AChE activity showed the presence of anticholinesterase agents in the waters of this stream, since there was a significant decrease in the activity of this enzyme in the brain and muscle samples of Tamoatá from Cavouco, in relation to the control samples (1312; 0 mU.mg of protein⁻¹) in all periods analyzed. The analyzes of CAT and SOD detoxifying enzymes showed higher oxidative stress in the three-point specimens in relation to the control (29.6 and 31.1 mU.mg of protein⁻¹, respectively) and these results were corroborated by TBARS, ROS generation. and NO[·]. These results can be attributed to the presence of anticholinesterase agents, specific laboratory and hospital effluent pollutants and the presence of infectious agents in the Cavouco stream water. In general, the results of the physicochemical analysis of water are within the limits established by the National Environment Council - CONAMA (Resolution No. 357/2005), but contamination by anthropic origin is verifiable due to the low dissolved oxygen content. and presence of some heavy metals (iron, manganese, zinc, lead and copper), which even in sublethal concentrations can affect aquatic ecosystems. These results point to the need for proper management and disposal of waste that is currently discharged without treatment in this ecosystem.

Keywords: Environmental monitoring. Biomarkers. Aquatic ecosystem. Fish.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 -	Representação esquemática de uma sinapse colinérgica.....	24
Figura 2 -	Isoformas da enzima AChE	25
Figura 3 -	Inibição da AChE por organofosforado (OPs) e carbamato (CBs)	26
Figura 4 -	Formação de micronúcleo por efeito anugênico e clastogênico	30
Figura 5 -	Eritrócito de <i>Hoplosternum littorale</i>	31
Figura 6 -	Níveis de danificação no DNA de <i>Hoplosternum littorale</i>	33
Figura 7 -	Leucócitos de <i>Hoplosternum littorale</i>	34
Figura 8 -	Ciclo dos pesticidas no ambiente.....	37
Figura 9 -	Pesticidas organofosforado metil-paration (triésteres de ác. fosfórico) e carbamato carbofuran (ésteres derivados de ác. carbâmico).....	38
Figura 10 -	Imagem de um exemplar de <i>Hoplosternum littorale</i>	41
Figura 11 -	Malha de riachos urbanos – rio Capibaribe.....	42
Figura 12 -	Trajectoria do Riacho Cavouco da nascente até a foz.....	43
Figura 13 -	Trecho do riacho Cavouco mostrando margens canalizadas, área gramada na calha expandida, passeio para pedestre e ciclovia.....	45
Capítulo I -	Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish	
	Hoplosternum littorale: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring.	
Figure 1 -	Michaelis-Menten kinetics of the ChE from brain of <i>H. littorale</i> using the substrates acetylthiocholine (ASCh -) and propionylthiocholine (PSCh -).....	77
Figure 2 -	Effect of pH (A), temperature (B) on the brain AChE activity of <i>H. littorale</i> and thermal stability of the enzyme (C).....	78
Figure 3 -	Effect of selective inhibitors on the brain AChE activity of <i>H. littorale</i>	79
Figure 4 -	Effect of pesticides on the brain AChE activity of <i>H. littorale</i>	80
Figure 5 -	Effect of ions on the brain AChE activity of <i>H. littorale</i>	82

Capítulo II - Efeitos genotóxicos em *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) exposto ao impacto antrópico em um riacho urbano no nordeste do Brasil.

Figura 1 -	Pontos de amostragem em um trecho do riacho Cavouco, Recife, Pernambuco Brasil.....	88
-------------------	---	----

Capítulo III - Estresse oxidativo, marcadores enzimáticos e resposta hematológica em *Hoplosternum littorale*; Hancock, 1828 (Siluriformes; Callichthyidae) provenientes de um riacho urbano no nordeste do Brasil.

Figura 1 -	Pontos de amostragem em um trecho do riacho Cavouco, Recife, Pernambuco, Brasil	109
Figura 2 -	Atividade da AChE em amostras de cérebro e músculo de <i>H. littorale</i> provenientes da população controle e de três pontos do riacho do Cavouco em 2015 (A e B) e 2016 (C e D)	115
Figura 3 -	Atividade da CAT e SOD em amostras de fígado de <i>H. littorale</i> provenientes da população controle e de três pontos do riacho do Cavouco em 2015 (A e B) 2016 (C e D)	117
Figura 4 -	Peroxidação lipídica descrita em níveis de MDA em amostras de fígado de <i>H. littorale</i> provenientes da população controle e de três pontos do riacho do Cavouco em 2015 (A) e 2016 (B).....	118
Figura 5 -	Produção de óxido nítrico (NO [•]) em amostras de fígado de <i>H. littorale</i> provenientes da população controle e de três pontos do riacho do Cavouco nos períodos seco e chuvoso de 2015 (A e B, respectivamente) e períodos seco e chuvoso de 2016 (C e D, respectivamente)	120
Figura 6 -	Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em amostras de fígado de <i>H. littorale</i> provenientes da população controle e de três pontos do riacho do Cavouco nos períodos seco e chuvoso de 2015 (A e B, respectivamente) e períodos seco e chuvoso de 2016 (C e D, respectivamente).....	122
Figura 7 -	Relação entre neutrófilos e linfócitos de três pontos do riacho Cavouco nos anos de 2015 e 2016.....	124

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 -	Exemplos de biomarcadores promissores na avaliação da exposição a compostos químicos e estado de saúde de peixes.....	20
-------------------	---	----

Capítulo I - **Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring.**

Table 1 -	Kinetic and physicochemical parameters of AChE of several species of fish.....	70
Table 2 -	Inhibition parameters relative to selective inhibitors of ChEs.....	71
Table 3 -	Renewal number (kcat) and catalytic efficiency (kcat / Km) of several species.....	71
Table 4 -	Activation energy (AE) in the reactions between AChE of several species and the substrate acetylthiocholine (ASCh) and their respective rate enhancements.....	72
Table 5 -	Inhibition parameters for some pesticides of the classes of organophosphates, carbamates and benzoylureas under the same experimental conditions of exposure.....	72
Table 6 -	Inhibition parameters related to ions that exert significant inhibitory effect on some fish species	75

Capítulo II - **Efeitos genotóxicos em *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) exposto ao impacto antrópico em um riacho urbano no nordeste do Brasil.**

Tabela 1 -	Índice de dano (ID) em espécimes de <i>H. littorale</i> coletados em três pontos do riacho Cavouco nos períodos chuvoso e seco dos anos de 2015 e 2016.....	91
Tabela 2 -	Frequência de dano (FD) em espécimes de <i>H.littorale</i> coletados em três pontos do riacho Cavouco nos períodos chuvoso e seco dos anos de 2015 e 2016.....	92
Tabela 3 -	Frequência de micronúcleo (MN) em espécimes de <i>H.littorale</i> coletados em três pontos do riacho Cavouco nos períodos chuvoso e seco dos anos de 2015 e 2016.....	93

Tabela 4 -	Anormalidades nucleares (AN) em espécimes de <i>H.littorale</i> coletados em três pontos do riacho Cavouco nos períodos chuvoso e seco dos anos de 2015 e 2016.....	94
-------------------	---	----

Capítulo III - Estresse oxidativo, marcadores enzimáticos e resposta hematológica em *Hoplosternum littorale*; Hancock, 1828 (Siluriformes; Callichthyidae) provenientes de um riacho urbano no nordeste do Brasil.

Tabela 1 -	Perfil leucocitário de <i>H.littorale</i> em 2015.....	123
Tabela 2 -	Perfil leucocitário de <i>H.littorale</i> em 2016.....	123
Tabela 3 -	Análise físico-química da água em três pontos do riacho Cavouco no verão e inverno de 2015.....	125
Tabela 4 -	Análise físico-química da água em três pontos do riacho Cavouco no verão e inverno de 2016.....	126

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ChEs	Colinesterases
AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
PChE	Propionilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
BCh	Butirilcolina
PSCh	Propioniltiocolina
OPs	Organofosforados
CBs	Carbamatos
IC₅₀	Concentração que inibe 50% da atividade enzimática
IC₂₀	Concentração que inibe 20% da atividade enzimática
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante de Michaelis-Menten
V_{max}	Velocidade maxima de catálise atingida por uma enzima
AE	Activation energy
DTNB	Ácido 5,5' Ditiobis (2-nitrobenzóico)
Iso-OMPA	Tetraisopropil pirofosforamida
BW284c51	1, 5-bis (4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide
Tris	Tris-hidróximetil-aminometano
HCl	Ácido clorídrico
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoreto de fenilmetilsulfonil)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
DMSO	Dimetilsulfóxido
WHO	World Health Organization
FAO	Food and Agriculture Organization
ROS	Reactive Oxygen Species
RLs	Radicais Livres
NO[·]	Óxido Nítrico
CAT	Catalase
SOD	Superóxido Dismutase

GST	Glutathione-s-transferase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
MDA	Malonaldeído
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ID	Índice de dano
FD	Frequência de dano
MN	Micronúcleo
AN	Anormalidade nuclear
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
DAF-FM-DA	diacetato de FM-diaminofluoresceína
H₂DCFH-DA	diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCF	diclorofluoresceína
UF	Unidades de fluorescência
LG-PAS	Leucócitos granulares PAS-positivos
pH	Potencial hidrogeniônico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂O	Água
O²	Oxigênio molecular
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)
LABs	Alquiбенzenos lineares
APAC	Agência Pernambucana de águas e clima
UFPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico
LAMSA	Laboratório de Análises Minerais, Solos e Água
GEAQ	Laboratório de Engenharia Ambiental e da Qualidade
DGA	Diretoria de Gestão Ambiental
NuBIOMA	Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente
FACEPE	Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Geral.....	18
2.2	Específicos.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1	Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos.....	19
3.2	Biomarcadores Enzimáticos.....	23
3.2.1	Enzimas Colinesterases	23
3.2.2	Enzimas Antioxidantes e Estresse Oxidativo.....	27
3.3	Biomarcadores Genéticos	29
3.3.1	Teste de Micronúcleo e Anormalidade Nucleares.....	29
3.3.2	Ensaio Cometa.....	32
3.4	Biomarcadores Hematológicos	33
3.4.1	Contagem Diferencial de Leucócitos.....	33
3.5	Poluentes em Ambientes Aquáticos.....	36
3.5.1	Pesticidas Organofosforados, Carbamatos e Benzoiluréias.....	36
3.5.	Metais Pesados em Ambiente Aquático.....	39
3.6	Tamoatá (<i>Hoplosternum littorale</i>).....	41
3.7	Características Gerais do Riacho Cavouco.....	42
4	CHARACTERIZATION OF BRAIN ACETYLCHOLINESTERASE OF BENTONIC FISH <i>HOPLOSTERNUM LITTORALE</i> : PERSPECTIVES OF APPLICATION IN PESTICIDES AND METAL IONS BIOMONITORING...46	
5	EFEITOS GENOTÓXICOS EM <i>HOPLOSTERNUM LITTORALE</i> (HANCOCK, 1828) EXPOSTO AO IMPACTO ANTRÓPICO EM UM RIACHO URBANO NO NORDESTE DO BRASIL	84
6	ESTRESSE OXIDATIVO, MARCADORES ENZIMÁTICOS E RESPOSTA HEMATOLÓGICA EM <i>HOPLOSTERNUM LITTORALE</i> ; HANCOCK, 1828 (SILURIFORMES; CALLICHTHYIDAE) PROVENIENTES DE UM RIACHO URBANO NO NORDESTE DO BRASIL.....	104
7	CONCLUSÕES GERAIS.....	140
	REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	141

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o descarte de contaminantes aumentou de forma alarmante nos ecossistemas aquáticos como resultado das atividades antropogênicas. Esta prática tem provocado expressiva queda da qualidade da água, consequentemente perda de biodiversidade aquática, além de alterações em diferentes níveis ecológicos. Desta forma, a biota aquática se tornou uma ferramenta importante para a detecção do grau de impacto, uma vez que este meio está constantemente exposto a um grande número de substâncias tóxicas oriundas de diversas fontes de emissão (ARAÚJO e OLIVEIRA, 2013; GUPTA, 2014). Frente a essa problemática, grande atenção tem sido despendida com relação ao monitoramento de agentes poluentes e seus efeitos em espécies nativas no meio hídrico.

Atualmente, uma urgência maior tem sido dada ao desenvolvimento de métodos de acesso a esses efeitos, com técnicas diagnósticas e prognósticas mais informativas e efetivas. Nesse contexto, o uso de biomarcadores surge como uma ferramenta importante, pois são sinais precoces de alerta que refletem as respostas biológicas adversas a contaminantes sobre os organismos bioindicadores sendo capazes, portanto, de determinar a magnitude dos efeitos de tal contaminação resultante da exposição a substâncias tóxicas (COIMBRA et al., 2013; ARAÚJO, 2015). Dentre os organismos aquáticos, os peixes tem sido indicadores biológicos promissores em programas de monitoramento, dada sua capacidade de bioacumular muitos contaminantes que mesmo em baixas concentrações tem potencial para afetar suas funções fisiológicas (NIGAN et al., 2012; NUNES et al., 2014; WANG et al., 2015).

Hoplosternum littorale, conhecido como Tamoatá é um peixe da família Callichthyidae, encontrado geralmente em riachos, lagoas e pequenos rios. Devido sua capacidade de usar o intestino como órgão acessório para a respiração aérea, é uma espécie que suporta críticas variações abióticas do ambiente, como por exemplo, baixo oxigênio dissolvido (PINHEIRO et al., 2013). Esta característica confere a este peixe potencial como bioindicador em estudos de biomonitoramento de água doce. O Tamoatá é uma espécie não migratória de ampla distribuição (encontrado em toda a América Latina), que não se encontra ameaçada ou em perigo de extinção.

Esta espécie é encontrada no riacho Cavouco, um riacho urbano que recebe efluentes domésticos ao passar por comunidades desprovidas, em sua maioria, de saneamento básico, além de resíduos de natureza química e hospitalar. Ao final de seu trajeto, deságua na margem direita de um dos principais rios do Estado de Pernambuco, o rio Capibaribe que, por sua vez, deságua no Oceano Atlântico. Essa carga poluidora pode induzir a alterações bioquímicas,

fisiológicas, genéticas e hematológicas resultando em danos muitas vezes irreversíveis para os organismos que habitam esses ambientes impactados, podendo comprometer sua adaptabilidade e sobrevivência, uma vez que esses poluentes interagem com lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos modificando quimicamente essas biomoléculas causando diversas injúrias no organismo (COGO et al., 2009).

De acordo com Cabral et al. (2014), práticas voltadas para o monitoramento de riachos urbanos têm demonstrado ser uma boa alternativa para auxiliar no resgate das funções hidráulica, hidrológica, ecológica e social desses cursos d'água. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi monitorar o riacho Cavouco, situado no Nordeste do Brasil, por meio de uma análise integrada de marcadores bioquímicos, genotóxicos e hematológicos da espécie *Hoplosternum littorale*, bem como monitorar a qualidade da água por meio de variáveis físicas e químicas, a fim de contribuir com subsídios para a conservação desse riacho, bem como fornecer dados que auxiliem no monitoramento de outros ambientes aquáticos impactados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar o biomonitoramento no riacho Cavouco por meio de marcadores enzimáticos, genotóxicos e hematológicos de *Hoplosternum littorale*.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar físico-química e cineticamente a acetilcolinesterase (AChE) cerebral de *H. littorale*.
- Avaliar o efeito *in vitro* de pesticidas carbamatos, organofosforados e benzoiluréias, bem como investigar o efeito de íons metálicos sobre a atividade colinesterásica;
- Determinar a atividade colinesterásica presentes no cérebro e músculo de *H. littorale* em diferentes períodos/sazonalidade;
- Avaliar o dano genômico por macrolesões em células sanguíneas de *H. littorale* pelo Teste de Micronúcleo e Anormalidade Nucleares;
- Avaliar o dano genômico por microlesões em células sanguíneas de *H. littorale* pelo Ensaio Cometa;
- Avaliar o estresse oxidativo em *H. littorale* por meio das espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO).
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em tecidos de fígado de *H. littorale*.
- Avaliar parâmetros hematológicos de *H. littorale* através da contagem diferencial de leucócitos;
- Avaliar a qualidade da água do riacho do Cavouco por meio de parâmetros físicos e químicos e comparar os resultados com a legislação vigente nacional.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos

Nas últimas décadas o uso intensivo de compostos tóxicos em atividades humanas tem sido um dos principais problemas responsáveis pela contaminação dos ecossistemas aquáticos, dentre eles, os rios e riachos estão entre os ecossistemas de água doce que mais sofrem com os efeitos da poluição ocasionada por ação antrópica, tanto pela deposição e consequente acumulação dos contaminantes no ambiente, quanto pela sensibilidade dos organismos, razões pelas quais espécies desses meios têm se mostrado de grande utilidade como bioindicadores (PENATTI e GUIMARÃES, 2011).

Bioindicador é uma espécie ou grupo de espécies que indicam efeito de contaminação no seu habitat. Sua utilização permite a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição. São espécies escolhidas por sua sensibilidade ou tolerância a vários parâmetros toxicológicos (GODEFROID et al., 2014; MACEDA et al., 2015). Organismos pertencentes ao topo da cadeia alimentar são comumente utilizados como bioindicadores por possuírem intrínseca relação com toda a cadeia inferior, indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes no nível de cadeia, além de efeitos diretos no nível do indivíduo, fornecendo ampla faixa de respostas frente a diferentes níveis de contaminação ambiental (LINS et al., 2010).

Atualmente é crescente o número de trabalhos em que peixes são empregados como indicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos, uma vez que são sensíveis a uma vasta classe de contaminantes, muitos dos quais mesmo em baixas concentrações podem afetar sua fisiologia e capacidade de sobrevivência (NIGAN et al., 2012; NUNES et al., 2014; WANG et al., 2015). Estes organismos são fontes de moléculas biologicamente ativas que, quando tem seu funcionamento alterado, comprometem as funções fisiológicas do organismo como um todo, culminando em alterações genéticas, bioquímicas, morfológicas, ecológicas ou comportamentais (MANSOURI et al., 2012). Nesse contexto, os biomarcadores surgem como alternativa importante na detecção da exposição a substâncias tóxicas, pois são medidas de fluidos corporais, células, ou tecidos, que indicam em termos fisiológicos a presença de um contaminante no organismo (COIMBRA et al., 2013). Assim, os biomarcadores podem ser utilizados com diversas finalidades como, por exemplo, na detecção precoce de uma exposição a um contaminante, antes mesmo deste contaminante causar alterações

significativas na saúde do indivíduo exposto. Alguns exemplos de biomarcadores deste tipo são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de biomarcadores promissores na avaliação da exposição a compostos químicos e estado de saúde de peixes.

BIOMARCADOR	EFEITO	REFERÊNCIAS
CYP1A (mRNA, proteínas) Atividade da EROD induzida	Ativação do receptor aril Hidrocarboneto	Stegeman et al., 1992 Stagg et al., 2000
Metalotioneínas	Ligação aos íons metálicos	Roesijadi e Robinson, 1994
Vitelogenina mRNA CYP1A/aromatase Níveis de estrogênio	Desregulação endócrina	Sumpter e Jobling, 1995 Rotchell e Ostrander, 2003
Teste do micronúcleo Anormalidade nucleares Teste de Ames Ensaio cometa	Efeitos genotóxicos	Hussain, 2017 Kousar e Javed. 2015 Singh et al., 1991
Peroxidação lipídica Enzimas de fase II e co-fatores Enzimas antioxidantes	Danificação oxidativa	Stegeman et al., 1992 Van der Oost et al., 2003 Winston e Giulio, 1991 Clasen et al., 2018
Inibição da acetilcolinesterase	Neurotoxicidade	Silva et al., 2013 Araújo et al., 2016
Alteração no número de Leucócitos	Parâmetros hematológicos	Seriane et al., 2011 Gaber et al., 2013

Fonte: adaptado de Connon et al., 2012

Dentre os biomarcadores de exposição, estudos recentes demonstram grande interesse por biomarcadores enzimáticos como alternativa de uso no monitoramento de ambientes impactados, devido à sua alta especificidade e rapidez na resposta às alterações provenientes das substâncias-alvo (BOTTE et al., 2012; NIGAN et al., 2012; SILVA et al., 2013; GHAZALA et al., 2014, WANG et al., 2015, ARAÚJO et al., 2016). O uso de enzimas como biomarcadores baseia-se na interferência inibitória ou indutora, causada pelos contaminantes em sua atividade catalítica. Estes compostos tóxicos em sua maioria possuem alta afinidade por pares de elétrons encontrados nos aminoácidos que formam as enzimas, como o grupamento sulfidril - SH (IVANINA et al. 2008; ASSIS et al., 2015). Dentre as principais enzimas utilizadas extensivamente para esta finalidade destacam-se as enzimas envolvidas na

detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, tais como as enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante, como catalase, glutathione redutase e superóxido dismutase, e as enzimas moduladoras que indicam neurotoxicidade tais como as colinesterases (COGO et al., 2009 ; EL-BASSYOUNI et al., 2012; ASSIS et al., 2012; ASSIS et al., 2014).

Em termos genéticos, entre as metodologias no âmbito de biomarcadores para avaliação de dano no DNA, o teste de Micronúcleo (MN) se destaca por permitir de forma rápida, simples e minimamente invasiva, a observação de macrolesões no genoma, permitindo detectar danos provenientes tanto de agentes responsáveis por quebras cromossômicas (clastogênicos), como de agentes aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (ADAM et al., 2010; ANSARI et al., 2011; PINHEIRO et al., 2013). Além dos MNs, estudos recentes tem descrito a presença de alterações morfológicas nucleares (AMNs) em eritrócitos de peixes (BRAHAM, 2017; HUSSAIN, 2017; SILVA et al., 2017). Essas alterações são divididas em cinco categorias: *Blebbled*, *Lobed*, *Notched*, *Vacuolated* e *Binucleo*, e muito embora os mecanismos responsáveis pela formação das AMNs não tenham sido completamente elucidadas, sabe-se que os mesmos são induzidos em resposta à exposição a agentes genotóxicos, tais como metais pesados, aos quais são conhecidos por terem ação genotóxica, mutagênica e carcinogênica (MATSUMOTO et al., 2006), pois interagem quimicamente com o material genético, formando adutos (metal ligado ao DNA) ou até mesmo promovendo quebras da molécula de DNA. As alterações no DNA dos organismos podem ocasionar sérias consequências, já que em nível individual lesam células e órgãos, podendo afetar inclusive sua função reprodutiva (BOLOGNESI e HAYASHI, 2011). Além destes testes, o Ensaio Cometa também é um dos mais empregados na avaliação de danos genômicos, pois apresenta alta sensibilidade na detecção de lesões pré - mutagênicas em células individualizadas. As vantagens do Ensaio Cometa incluem simplicidade (fácil execução), rapidez, precisão e reprodutibilidade (SCALON, et al., 2010).

Além das abordagens Bioquímica e Genética, os parâmetros hematológicos também são empregados na avaliação do bem-estar dos peixes em programas de monitoramento. Um dos parâmetros comumente utilizado nessa avaliação é a contagem diferencial de leucócitos. De acordo com Vosylienė (1999), alterações na contagem relativa de células sanguíneas de defesa orgânica podem indicar a ocorrência de processos infecciosos. Desta forma, os parâmetros sanguíneos refletem o estado fisiológico do animal e podem ser utilizados como ferramenta para o diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas e de estresse (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Os estudos dos parâmetros hematológicos dos peixes têm sido

recomendados, sendo considerado um bom biomarcador para monitoramento ambiental, uma vez que constitui um método não invasivo e simples (SERIANI e RANZANI-PAIVA, 2012).

Por fim, visando realizar uma análise integrada da ação dos diferentes agentes poluidores e reforçar as causas de uma possível contaminação, muitos trabalhos têm utilizado parâmetros físico-químicos e microbiológicos como importantes ferramentas no monitoramento de ecossistemas aquáticos (SOUZA, 2016). Tais parâmetros possibilitam o enquadramento das águas conforme suas condições de uso e mediante comparação entre os valores detectados no ambiente e os limites máximos estabelecidos pela legislação vigente, permitem determinar o grau de impacto no recurso hídrico.

São várias as publicações em que biomarcadores bioquímicos, genéticos, hematológicos de peixes, e parâmetros físico-químicos são utilizados em conjunto para monitorar rios e riachos urbanos. Como exemplo, podemos citar o trabalho de Thomé et al (2016) que avaliou a genotoxicidade da água do rio Itapecerica (Minas Gerais, Brasil) utilizando frequência de micronúcleo (MN), anormalidades nucleares (NA) e contagem de leucócitos no sangue periférico de *Danio rerio*. Nesse trabalho foram escolhidos quatro pontos com condições ambientais diversas: ponto 1 no centro da cidade (área comercial e esgoto doméstico), ponto 2 a jusante da cidade (área com vegetação marginal preservada), ponto 3 em um córrego afluente do rio Itapecerica (drenagem fluvial e esgoto doméstico), ponto 4 a montante da cidade (ponto referência) e os autores verificaram que os maiores valores de ocorrência de MN e AN, assim como de leucócitos, foram registrados nos animais proveniente dos pontos 1 e 3, considerados os mais impactados pela influência de esgotos domésticos. Assim, através do estudo das células sanguíneas de *Danio rerio* foi possível detectar a presença de substâncias genotóxicas no rio Itapecerica e alertar às autoridades contribuindo para o avanço de políticas de saneamento na cidade. Nessa abordagem de monitoramento de rios urbanos, pode-se citar ainda o trabalho de Souza et al (2016) que avaliou a qualidade da água do Rio dos Sinos (Rio Grande do Sul, Brasil) por meio do teste de micronúcleos em *Cyprinus carpio* e de análises físico-químicas e microbiológicas, e embora tenha encontrado ausência de potencial genotóxico no período amostrado, para esta espécie de peixe, verificou redução da qualidade da água ao longo da extensão desse rio.

Levando em conta a união das abordagens Genética e Bioquímica vale ressaltar ainda o trabalho de Javed et al (2016) que avaliou a biocumulação, estresse oxidativo e genotoxicidade em peixes da espécie *Channa punctatus* expostos a um efluente de usina termoeletrônica. Os autores avaliaram bioacumulação e estresse oxidativo em tecidos de fígado, rim, músculo e tegumento e verificaram alterações significativas nos níveis de

lipoperoxidação (LPO) e das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) no fígado e nos rins dos peixes expostos quando comparados com os peixes provenientes do local de referência. O dano no DNA observados por meio do comprimento de cauda formada (ensaio cometa) foi significativamente alto nas células de peixes expostos (brânquias - 26,5 μm) em comparação ao peixe tido como controle (5,11 μm).

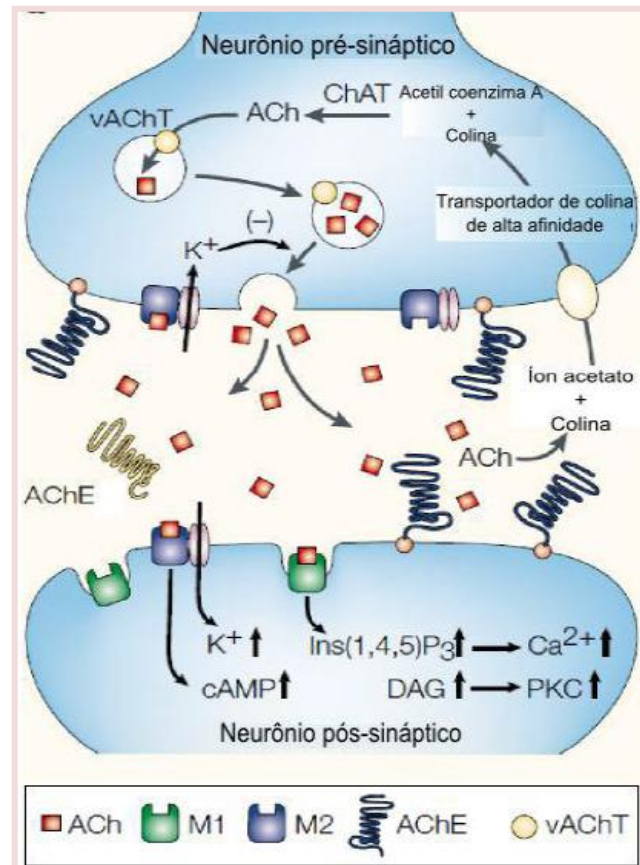
Os resultados dos trabalhos acima citados confirmam os biomarcadores genotóxicos, enzimáticos e hematológicos como uma ferramenta importante no monitoramento de rios urbanos impactados e corroboram o uso de peixes como bioindicadores promissores no monitoramento de ecossistemas aquáticos.

3.2. Biomarcadores Enzimáticos

3.2.1. Enzimas Colinesterases

Duas colinesterases distintas são encontradas nos organismos aquáticos vertebrados e invertebrados, a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8). A AChE é uma hidrolase que predomina principalmente nos eritrócitos, neurônios, gânglios do sistema nervoso autônomo e placas motoras terminais. Sua principal função é promover a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina liberando acetato e colina nas sinapses colinérgicas, como ilustrado na figura 1. Desta forma, devido à sua função chave no controle da transmissão sináptica, esta enzima se torna um dos alvos moleculares mais vulneráveis à ação de agentes neurotóxicos, e por este motivo tem sido amplamente estudada em organismos aquáticos e proposta para uso em programas de monitoramento, dada a sua sensibilidade (ASSIS et al., 2014; ARAÚJO et al., 2016). Já a BChE que por sua vez, predomina no plasma, fígado, neuróglias, pâncreas e paredes do tubo digestivo não tem sua função totalmente elucidada e ausência de sua atividade foi relatada no cérebro de várias espécies de peixe (PEZZEMENTI e CHATONNET, 2010; SILVA et al., 2013).

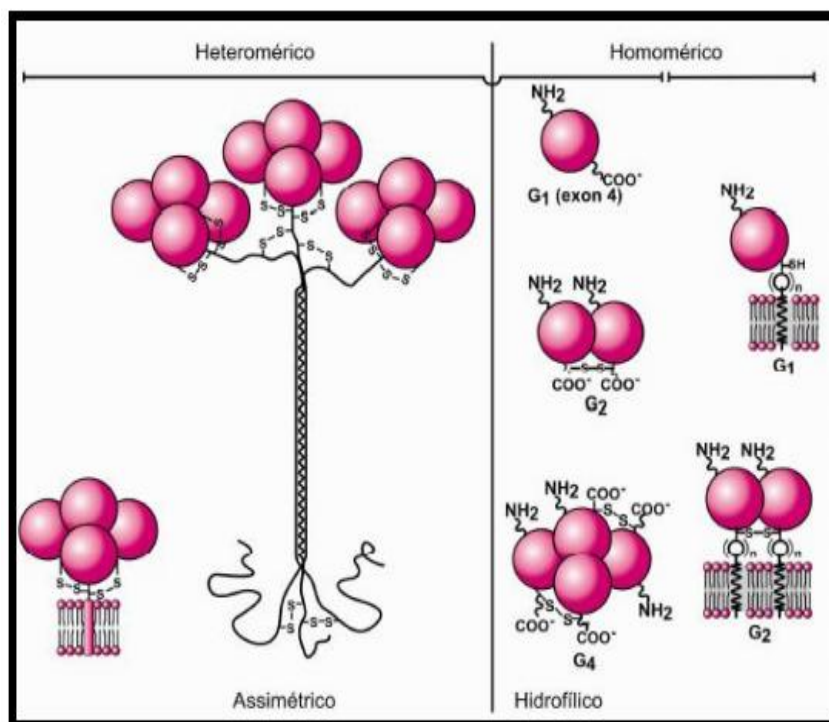
Figura 1. Representação esquemática de uma sinapse colinérgica. ACh é sintetizada no neurônio pré-sináptico a partir de colina e acetil-coenzima A pela enzima colina acetiltransferase, posteriormente é armazenada em vesículas via um transportador vesicular de ACh. Após o estímulo, as vesículas liberam ACh na fenda sináptica por exocitose, esta é rapidamente hidrolisada em acetato e colina pela ação da enzima AChE. Liberada na fenda a ACh pode ativar dois tipos de receptores: nicotínicos ou muscarínicos (M). ACh = acetilcolina; M1= receptor muscarínico tipo 1; M2= receptor muscarínico tipo 2; VAcHT= transportador de ACh vesicular.



Fonte: Adaptado de SOREQ e SEIDMAN, 2001.

As colinesterases (ChEs; EC 3.1.1.x) são altamente polimórficas tanto interespecífica quanto intraespecificamente com alta variabilidade de formas, podendo apresentar-se como monômeros, dímeros ou tetrâmeros entre as diferentes espécies e diferentes tecidos (figura 2). No caso da acetilcolinesterase, segundo Silman e Sussman (2005), o provável motivo para esta enzima apresentar-se em uma série de formas moleculares em um mesmo indivíduo seria o de atender aos diversos tipos de sinapses colinérgicas presentes no tecido nervoso. Desta forma, torna-se imprescindível caracterizá-la em condições de normalidade nas diversas espécies a fim de conhecer previamente suas propriedades e entender seus mecanismos antes de propor seu uso, por exemplo, como biomarcador em programas de monitoramento (ASSIS et al., 2010, HOWCROFT et al., 2011; NIGAM et al., 2012).

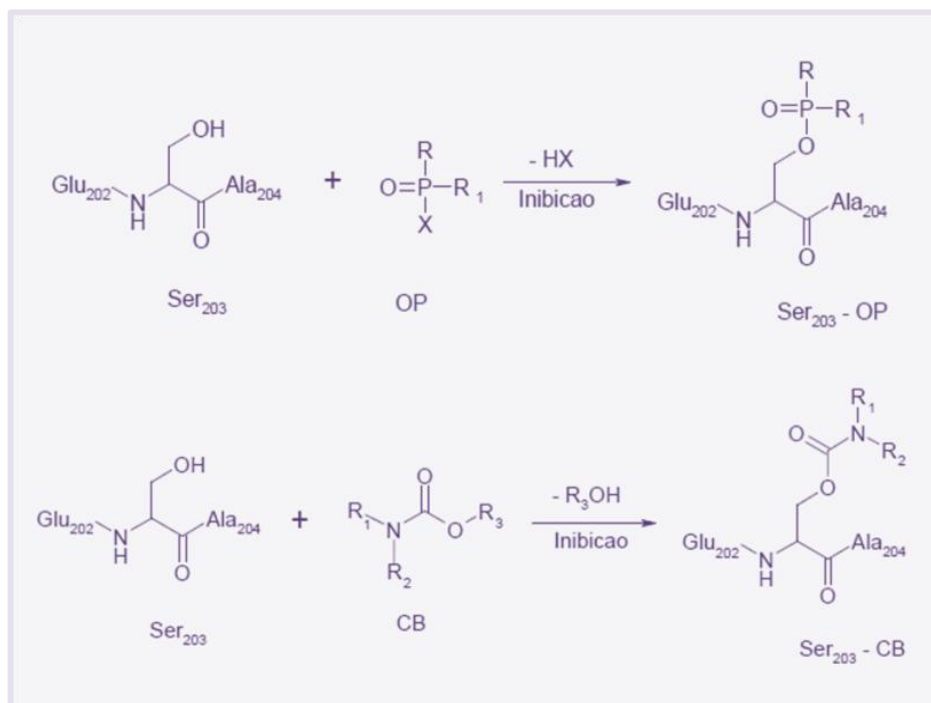
Figura 2. Isoformas da enzima AChE. A AChE existe em duas classes gerais de formas moleculares : como oligômeros homoméricos e como associações heteroméricas. Os oligômeros homoméricos simples aparecem como monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4), dando origem assim as formas globulares. As associações heteroméricas resultam nas formas assimétricas (A12)



Fonte: http://www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm

Como mencionado anteriormente, estas enzimas são amplamente utilizadas no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. São usadas como biomarcadores da presença de alguns metais pesados e um grupo específico de pesticidas, tais como carbamatos e organofosforados (os quais geralmente apresentam uma baixa persistência a nível ambiental, especialmente quando comparados aos pesticidas organoclorados). Essas substâncias agem inibindo a atividade enzimática pela interação com o sítio esterásico por fosforilação, no caso dos organofosforados, ou carbamilação, no caso dos carbamatos (figura 3) (ASSIS et al., 2011, MATOS, 2012). No que se refere aos metais pesados, a inibição ocorre por meio de ligações com grupamentos tióis proteicos, alterando o estado de hidratação do sítio ativo (MARQUES et al., 2011).

Figura 3. Inibição da AChE por organofosforado (OPs) e carbamato (CBs). Os OPs se ligam covalentemente ao resíduo catalítico Ser203, impedindo a ligação do substrato e tendendo à irreversibilidade. Os CBs também se ligam ao sítio ativo da enzima, entretanto, o grupo hidroxil do resíduo de serina promove um ataque nucleofílico ao grupo carbonil do CB, resultando em uma ligação que pode ser hidrolisada.



Fonte: HÖRNBERG et al., 2007; MATOS, 2012

A inibição uma vez iniciada tende a gerar quadros de intoxicação aguda ou crônica, e dependendo do grau de exposição à substância tóxica, o indivíduo pode vir a morrer, pela superestimulação de seu sistema nervoso já que, com a inibição da AChE, ocorre um acúmulo de acetilcolina nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas (VALBONESI et al., 2011; NUNES et al., 2014). Os sinais e sintomas de intoxicação por carbamatos são semelhantes a dos organofosforados, diferindo apenas na duração e na intensidade da toxicidade. Os efeitos moderados dos carbamatos comparativamente aos organofosforados devem-se ao fato de inibirem de forma reversível a acetilcolinesterase (hidrólise com regeneração da enzima) e serem rapidamente metabolizados *in vivo* (JEBALI et al., 2013). A ação anticolinesterásica desses pesticidas ocasiona, concomitantemente, a inibição da AChE do tecido nervoso central e periférico e as inibições da AChE eritrocitária e da BChE plasmática (ASSIS et al., 2010). Segundo dados da Food and Agriculture Organization (2007), uma inibição da atividade colinesterásica a partir de 20% caracteriza a ação de agentes anti-colinesterásicos. Após 50% de inibição, sinais clínicos são visualizados e após 90% de inibição, verifica-se a morte do organismo.

O estudo *in vitro* da atividade da acetilcolinesterase de várias espécies de peixes, tais como *Colossoma macropomum*, *Cichla ocellaris*, *Prochilodus lineatus*, *Parachromis managuensis*, *Arapaima gigas*, *Rachycentron canadum*, *Oreochromis niloticus* e *Danio rerio* tem sido proposto para serem utilizados na detecção dos efeitos fisiológicos deletérios causados por pesticidas e metais a estes organismos aquáticos (RODRÍGUEZ-FUENTES e GOLD-BOUCHOT, 2004; MADUENHO e MARTÍNEZ, 2008; ASSIS et al., 2010; SILVA et al., 2013; DAI et al., 2014; ASSIS et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016). Além destes, pode-se citar os trabalhos de Ghazala et al (2014) que testaram o efeito de três concentrações subletais dos pesticidas profenofós e carbofuran sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) no cérebro, guelras, músculo, rim, fígado e sangue da espécie *Labeo rohita* (carpa indiana). Estes autores verificaram que a exposição a ambos os pesticidas afetou as funções destes órgãos, incluindo metabolismo e neurotransmissão. Araújo et al (2016) também relataram inibição *in vitro* da acetilcolinesterase por pesticidas carbamatos e organofosforados no cérebro do ciclídio Jaguar e, adicionalmente, relataram inibição dessa enzima por alguns metais pesados, os quais apresentam alto grau de toxicidade.

Estes estudos têm confirmado os peixes como uma fonte prática e economicamente viável de acetilcolinesterase, capazes de tornar rotineiros os procedimentos de biomonitoramento de recursos hídricos, uma vez que esta enzima está disponível de forma abundante, principalmente no cérebro, órgão que é descartado juntamente com outras partes não aproveitadas do pescado.

3.2.2. Enzimas Antioxidantes e Estresse Oxidativo

A danificação oxidativa ou estresse oxidativo causado pela formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) em organismos aeróbios, tem-se tornado um tópico de crescente interesse nos estudos de toxicologia ambiental. Isto se deve ao fato de que os radicais livres produzidos pela presença de compostos tóxicos no organismo reagem com lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos resultando em diversas injúrias bioquímicas ou genéticas (COGO et al., 2009). Deste modo, a detoxificação das espécies reativas de oxigênio é um mecanismo fisiológico necessário para prevenir, interceptar e reparar danos celulares (CHANDRAN et al. 2005; GU, 2006; ATLI e CANLI, 2007; MONSERRAT et al. 2008). Esta detoxificação é realizada por compostos antioxidantes que são qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato

oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz (SILVA, *et al.*, 2012).

Os organismos aeróbicos apresentam diferentes mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante (sistema redox). Entre as enzimas antioxidantes que integram esse sistema destacam-se a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). A SOD protege as células aeróbicas da ação do radical superóxido (O_2^-), catalisando a conversão deste em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Por sua vez, as moléculas de H_2O_2 podem ser reduzidas a água (H_2O) e oxigénio molecular (O_2) pela ação da catalase (AVILEZ *et al.*, 2008). Estes mecanismos têm como objetivo limitar os níveis intracelulares das espécies reativas e controlar a ocorrência de danos (SHAMI e MOREIRA, 2004). Uma vez comprometido, um desequilíbrio pró-oxidante celular (estresse oxidativo) se estabelece e este, por sua vez, está associado a vários processos fisiopatológicos que podem comprometer a sobrevivência das espécies (SANDERS, 2010). Vale ressaltar que o mecanismo de produção das ROS é um processo fisiológico que ocorre naturalmente no organismo e que somente quando o balanço entre sua produção e degradação encontra-se desequilibrada, devido geralmente a um excesso, é que as ROS tornam-se prejudiciais, pois podem ocasionar a oxidação de moléculas biológicas importantes do organismo (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

Muitos contaminantes ou seus metabólitos tem potencial para exercer sua toxicidade gerando estresse oxidativo, como por exemplo, os metais pesados. Estes metais se acumulam no ambiente e, conseqüentemente, tendem a se biocumular no organismo, gerando um estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio e/ou radicais livres, tais como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxil. Estas moléculas atuam elevando a atividade das enzimas antioxidantes que utilizam esses compostos como seus substratos específicos (ATLI e CANLI, 2007). Assim, a avaliação das enzimas antioxidantes permite estimar o estado das defesas dos organismos e por este motivo tem sido bastante utilizadas como biomarcadores de danificação oxidativa em programas de monitoramento (COGO *et al.*, 2009). Nesse contexto, diversos estudos relatam estresse oxidativo em peixes expostos a uma variedade de contaminantes (MODESTO e MARTINEZ, 2010; ABDELKHALEK *et al.*, 2014; MORCILLO *et al.*, 2016; CLASEN *et al.*, 2018). Entre os peixes que habitam locais poluídos, taxas elevadas de lesões idiopáticas e neoplasias estão relacionadas com o aumento do estresse oxidativo associado à exposição a poluentes.

Dentre as inúmeras publicações recentes relativas a esse tema, pode-se citar o trabalho de Clasen *et al.* (2018) que avaliaram estresse oxidativo causado por pesticidas em *Cyprinus carpio*. Nesse estudo, foi avaliado o efeito de cinco pesticidas amplamente utilizados em

cultura de arroz (lambda-cyhalothrin, thiamethoxam, cloranthraniliprole, tebuconazole, trifloxystrobin) e, após 100 dias de exposição, as análises bioquímicas mostraram respostas aumentadas nos grupos em experimento em comparação com os controles. A atividade da catalase aumentou no fígado e a atividade da glutathione-S-transferase aumentou no fígado, brânquias e músculos. Assim, os autores concluíram que estes pesticidas induzem estresse oxidativo, evidenciado por alterações significativas nas atividades das enzimas antioxidantes.

Outra consequência do aumento de ROS e de radicais livres no organismo é a peroxidação lipídica. O processo de peroxidação lipídica leva ao desgaste dos lipídeos, especialmente na membrana celular, e também é um importante indicativo do dano oxidativo. A peroxidação lipídica pode ocorrer em tecidos, fluidos e lipoproteínas, podendo causar desde reduções localizadas na fluidez da membrana até a ruptura total da integridade da bicamada (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2005). Os produtos da peroxidação lipídica mais estudados são os hidroperóxidos lipídicos (LOOH), aldeídos (malondialdeído [MDA], hidroxihexenal [HHE] e 4-hidroxinonenal [4-HNE]), os fosfolípidos oxidados e os isoprostanos. Estes compostos têm alta capacidade para alterar a permeabilidade e integridade das membranas celulares levando ao dano oxidativo (AZEVEDO et al., 2018). Através da avaliação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) o malondialdeído (MDA) é amplamente estudado como marcador para peroxidação lipídica, principalmente devido ao baixo custo e rapidez desta metodologia.

Alguns estudos tem demonstrado o aumento da peroxidação lipídica em peixes expostos a diversos tipos de contaminantes, entre eles pode-se citar o trabalho de STEGEMAN et al. (1992) que verificou o aumento da peroxidação lipídica em Carpas expostas ao agrotóxico Paraquat e em bagres expostos a sedimento contaminado com PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbon). Assim, a peroxidação lipídica é um parâmetro com potencial para ser utilizada como biomarcador.

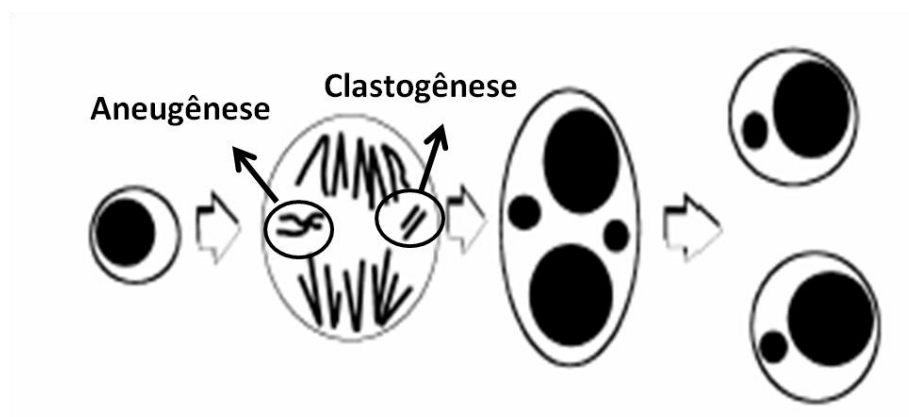
3.3. Biomarcadores Genéticos

3.3.1. Teste de Micronúcleo e Anormalidades Nucleares

Micronúcleos são corpúsculos citoplasmáticos extranucleares resultantes de fragmentos cromossômicos (cromossomos acêntricos) ou cromossomos inteiros não inseridos no núcleo principal das células filhas, durante o processo de divisão celular (figura 4), devido

a eventos clastogênicos ou aneugênicos, respectivamente (OBIAKOR e OKONKWO, 2012). Sua formação ocorre principalmente durante a anáfase, uma vez que, nesta fase da divisão as cromátides e os fragmentos acêntricos migram atrasados ou não são transportados pelas fibras do fuso para os polos opostos, e se completa na telófase onde esses fragmentos são envolvidos por uma membrana nuclear e, uma vez que, não são incluídos nos núcleos recém-formados, ficam dispersos no citoplasma (BOTELHO et al., 2015). Assim, os efeitos de substâncias que provoquem quebras cromossômicas ou ainda afetem os componentes do fuso ou da região centromérica podem ser detectados a partir da presença de micronúcleos, os quais não devem ultrapassar 1/3 do tamanho do núcleo principal, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refringência do núcleo (SCHMID, 1975; BOTELHO et al., 2015).

Figura 4. Formação de micronúcleo por efeito aneugênico e clastogênico.



Fonte: Fenech et al., 2000.

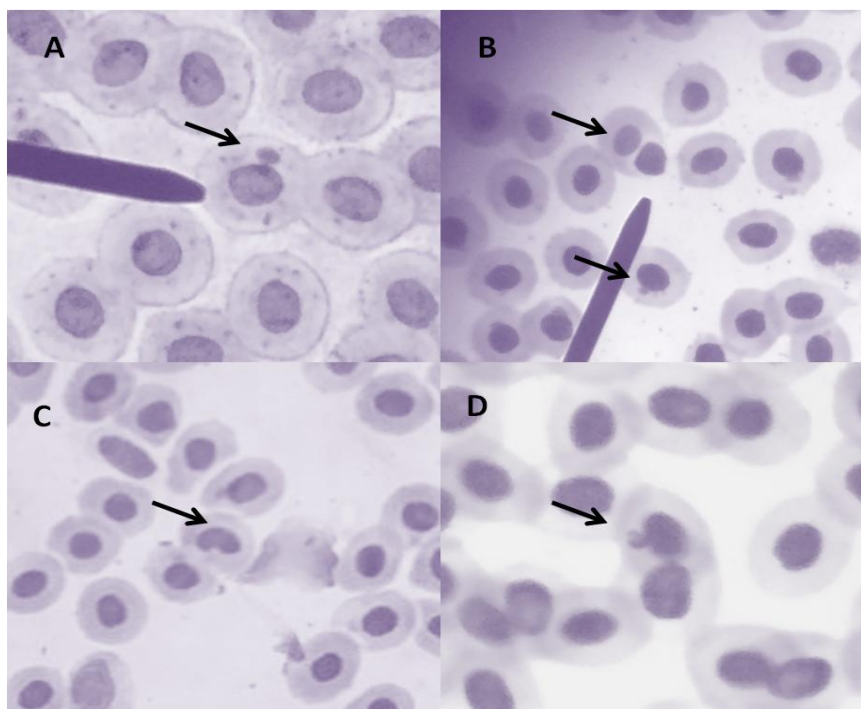
O teste do micronúcleo foi primeiramente realizado por Schmid, em 1975 para observar alterações cromossômicas causadas por agentes químicos em células da medula óssea de roedores. Posteriormente, foi modificado em 1982, por Hoofman e Raat, para a aplicação em eritrócitos de peixes na avaliação de compostos mutagênicos no ambiente aquático. Desde então, é crescente o número de trabalhos em que o teste de micronúcleo é aplicado em eritrócitos de peixes como uma alternativa na detecção de agentes genotóxicos em programas de biomonitoramento ambiental (AL-SABTI; METCALFE, 1995; BARŠIENE et al., 2006; BOLOGNESI e HAYASHI, 2011; OBIAKOR e OKONKWO, 2012; KOUSAR e JAVED 2015; BRAHAM, 2017). Atualmente, é um dos testes citogenéticos mais utilizados no campo da genética toxicológica por ser um teste simples, rápido e de sensível detecção de

alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas (GUTIERREZ et al., 2014; KOUSAR e JAVED 2015; MATEUS et al., 2016; HUSSAIN, 2017).

Além dos micronúcleos, vários estudos descrevem a presença de outras alterações morfológicas nucleares (AMNs) em células de peixes como resultado de exposição a substâncias genotóxicas, mutagênicas ou carcinogênicas (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; THOMÉ et al., 2016; HUSSAIN, 2017; SILVA et al., 2017). Entretanto, a origem dessas alterações ainda não está completamente elucidada (BOTELHO et al., 2015; BRAHAM et al., 2017).

Carrasco et al (1990), classificaram essas alterações nucleares em quatro categorias: a) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, ainda ligada ao núcleo, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. b) *Lobbed*: núcleos com evaginações mais largas e não tão definidas como as descritas para blebbed. c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos ausentes de qualquer material visível no seu interior d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma, geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Fenech (2000) adicionou ainda mais uma alteração nessa classificação que chamou de e) *Binúcleo*: núcleos em número de dois, bem definidos (figura 5).

Figura 5. Eritrócito de *Hoplosternum littorale*. (A) Micronúcleo; (B) Seta superior Binúcleo e seta inferior Lobed; (C) Blebbed; (D) Notched. Não foi verificado vacuolated nessa espécie.



Fonte: Acervo pessoal do autor

Nessa abordagem, vale ressaltar o estudo de Hussain (2017) que avaliou a frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares no eritrócito da espécie *Labeo rohita* em três locais poluídos diferentes do rio Chenab (Índia). A espectrofotometria de absorção atômica mostrou um alto nível de toxicidade dos metais Cd, Cu, Mn, Zn, Pb, Cr, Sn e Hg nesse rio e os autores concluíram que a população de *Labeo rohita* tem sido reduzida drasticamente no rio Chenab, devido à poluição por metais pesados. Ademais, concluíram que a redução de 96% da população desta espécie de peixe em uma área experimental do rio Chenab deve-se a alta frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares, devido à poluição.

3.3.2. Ensaio Cometa

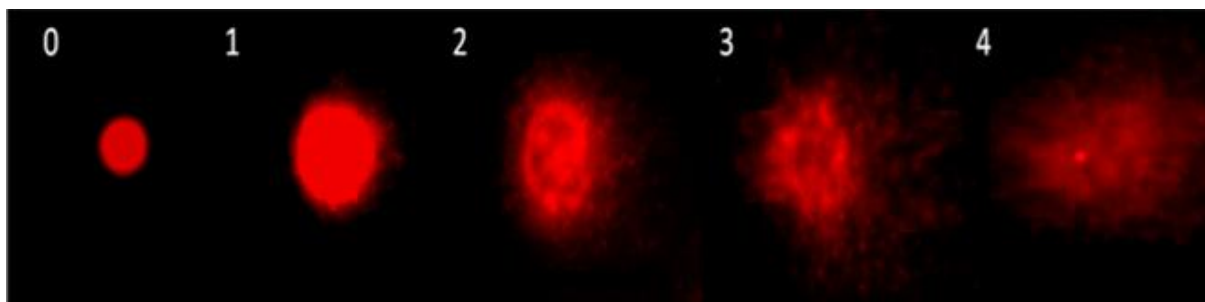
O Ensaio Cometa também conhecido como eletroforese em gel de células individuais (*Single cell gel*) é uma técnica capaz de detectar microlesões no DNA, ou seja, detecta lesões pré - mutagênicas que são lesões genômicas passíveis de reparo (SCALON, et al., 2010).

Esta técnica foi inicialmente desenvolvida por Ostling e Johanson em 1984 e, posteriormente, aprimorada por Singh et al, em 1988, que modificou a técnica realizando a eletroforese em condições alcalinas ($\text{pH} > 13$), ao contrário de Ostling e Johanson que a faziam em meio neutro, e com isso conseguiram avaliar não apenas quebras de cadeia dupla, mas também quebras de cadeia simples do DNA, além de sítio álcali-lábeis, sítios abásicos, excisão de sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas (SINGH et al., 1988).

O princípio desta técnica baseia-se no fato de que as células que possuem danos em seu DNA, formarão fragmentos diversos os quais tendem a migrar em velocidades diferentes durante a corrida eletroforética, uma vez que os fragmentos formados são de tamanhos variados. Desta forma, fragmentos menores tendem a migrar com mais velocidade que fragmentos maiores, formando então a típica figura de um cometa (COLLINS, 2004; NANDHAKUMAR et al., 2011).

A avaliação destes danos é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelos fragmentos de DNA e os efeitos genotóxicos são, então, classificados em níveis que variam do 0 (sem dano) ao nível 4 (dano máximo) (figura 6).

Figura 6: Níveis de danificação no DNA de *Hoplosternum littorale*.



Fonte: Acervo pessoal do autor

Kousar e Javed (2015) verificaram os efeitos genotóxicos individuais dos metais arsênio (As), cobre (Cu) e zinco (Zn) em eritrócitos de sangue periférico de quatro espécies de peixes de água doce; *Labeo rohita*, *Cirrina mrigala*, *Catla catla* e *Ctenopharyngodon idella* usando o ensaio Cometa. Os espécimes foram expostos a quatro diferentes concentrações (17, 25, 33 e 50% de CL50) de As, Cu e Zn por um período de 30 dias. Todas as quatro espécies de peixes apresentaram diferenças significativas em termos de porcentagem de células danificadas, índice de danos genéticos (IDG) e comprimento da cauda de cometas devido à ação dos metais. Este estudo indicou que metais existentes em habitats aquáticos podem induzir danos no DNA na fauna de peixes nativos.

3.4. Biomarcadores Hematológicos

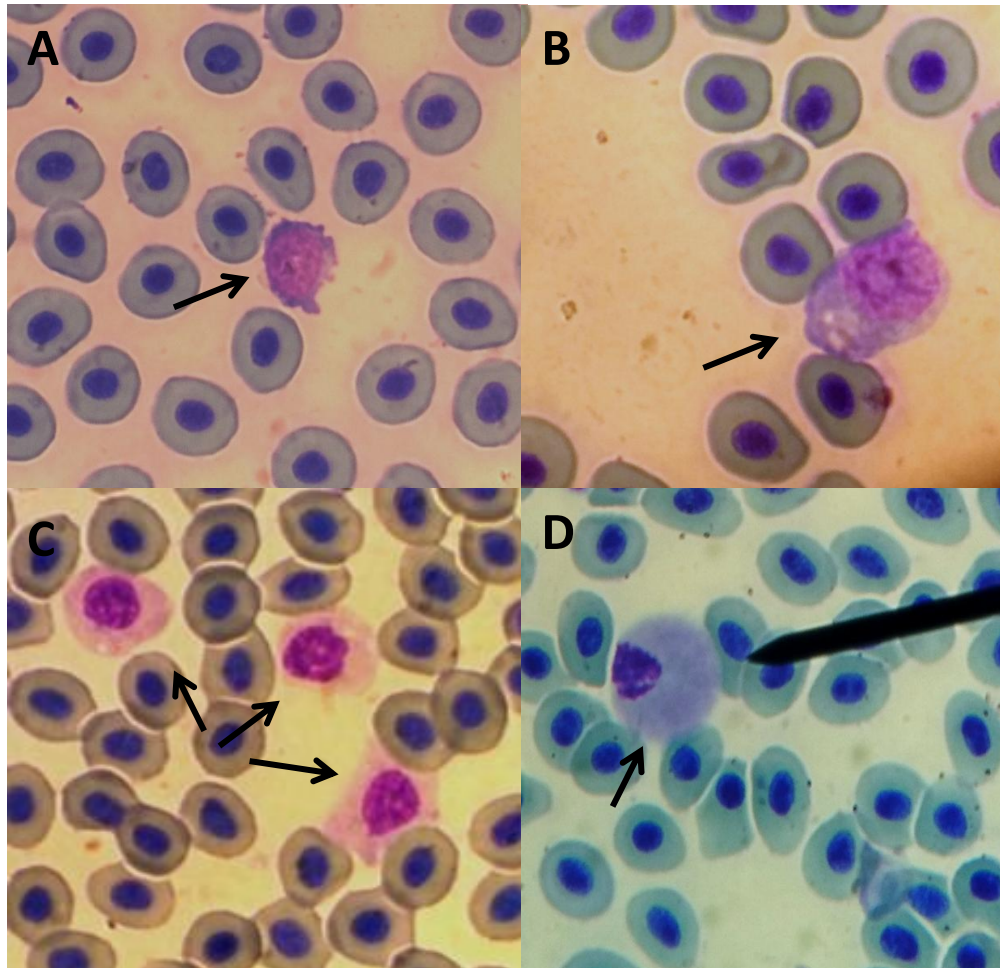
3.4.1. Contagem Diferencial de Leucócitos

Os estudos dos parâmetros hematológicos dos peixes têm sido recomendados para diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas e de estresse (TAVARES - DIAS e MORAES, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2007), sendo considerado um bom biomarcador para monitoramento ambiental, uma vez que constitui um método não destrutivo/invasivo e simples (SERIANI & RANZANI-PAIVA, 2012).

Os Leucócitos também conhecidos como células brancas, são células responsáveis pela defesa do organismo que utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento e combate a possíveis infecções ou lesões teciduais, ou seja, são células que podem ser usadas para avaliar o sistema imunológico (TAVARES-DIAS et al., 2007). Na circulação periférica dos peixes são encontrados normalmente seis leucócitos (*linfócitos*, *monócitos*, *neutrófilos*, *eosinófilos*, *basófilos* e *LG-PAS*) (figura 7), os quais integram diferentes linhagens celulares e

são diferenciados pela presença ou ausência de granulações, bem como pelas suas características morfológicas e afinidade aos corantes histológicos (SATAKE et al., 2009).

Figura 7. Leucócitos de *Hoplosternum littorale*. (A) Linfócito; (B) Monócito; (C) Neutrófilos; (D) LG-PAS. Não foram encontrados eosinófilo e basófilo nesta espécie.



Fonte: Acervo pessoal do autor

Os linfócitos são as células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e pela montagem da resposta imune. São células predominantemente arredondadas e apresentam citoplasma fortemente basofílico. São os menores leucócitos encontrados na circulação dos peixes. Entretanto, na contagem diferencial de leucócitos é comum a observação de linfócitos com tamanhos distintos (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Os monócitos são os maiores leucócitos e são considerados células em trânsito no sangue periférico. Atuam na reação inflamatória e resposta imunológica nas quais ocorre a fagocitose. Apresentam citoplasma basofílico, geralmente sem granulação com presença, ou não, de vacuolização (THRALL et al., 2007; MARTINS et al., 2009).

Os neutrófilos são as principais células responsáveis pela defesa do organismo contra infecções bacterianas, realizando a fagocitose destes agentes infecciosos. Possuem um formato circular, com citoplasma rosado, abundante e com fina granulação neutrofílica (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Os eosinófilos têm tamanhos diversos. Apresentam citoplasma abundante e rico em grânulos grosseiros dispostos por todo citoplasma que se coram de rosa - alaranjado (grânulos eosinofílicos) – característica determinante para a sua identificação (RANZANI – PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Estas células podem estar ausentes no sangue periférico dos peixes, sendo mais abundante no tecido hematopoiético, submucosa intestinal, líquido peritoneal, mesentério e brânquias (TAVARES-DIAS e MORAIS, 2004).

Os basófilos são células menores que os neutrófilos, com forma arredondada e contorno regular. O citoplasma apresenta granulações grosseiras basofílicas, que recobrem o núcleo na maioria das vezes. A função dos basófilos de peixes não está definida e parece estar ligada aos processos alérgicos, já que possuem histamina em seus grânulos (THRALL et al., 2007).

Os leucócitos granulares PAS-positivos (LG-PAS) são células grandes, arredondadas com citoplasma abundante e rico em granulações claras. Seu núcleo é pequeno e localiza-se na periferia da célula, podendo ser ligeiramente alongado, arredondado ou triangular. Estas células não tem sua função totalmente esclarecida, porém acredita-se que agem em processos inflamatórios (MARTINS et al., 2009).

Os parâmetros sanguíneos de peixes, atualmente, vêm sendo utilizados como uma ferramenta auxiliar no monitoramento do bem-estar e diagnóstico de estresse animal. (THOMÉ et al., 2016). Diversos estudos indicam que a má qualidade da água devido à poluição por resíduos agrícolas, industriais e domésticos, altera esses parâmetros (SERIANI et al., 2010; NTE et al., 2011; GABER et al., 2013; THOMÉ et al., 2016). A hematotoxicidade acontece quando alguns dos diferentes componentes do sangue alteram as características quantitativas e qualitativas das células para produzir sintomas tóxicos e ou sofrem anomalias estruturais e interfere com o funcionamento normal, caso o peixe não possa tolerar e aclimatizar as situações adversas a que está exposto (BEGUN, 2004). Seriani et al (2011) ao estudar toxicidade da água e relações hematológicas em Tilápia do Nilo (LINNAEUS, 1758), encontraram que os peixes coletados em lagoa poluída exibiram aumento de eritrócitos imaturos e diminuição de linfócitos, leucócitos totais, neutrófilos e trombócitos. Akinrotimi et al. (2013) observaram que uma breve exposição de *Tilápia guineensis* (GÜNTHER, 1862) a

efluentes industriais causou estresse que se manifestou por alterações nos parâmetros sanguíneos dessa espécie.

3.5. Poluentes em Ambientes Aquáticos

3.5.1 Pesticidas Organofosforados, Carbamatos e Benzoiluréias

Pesticidas ou agrotóxicos são definidos como:

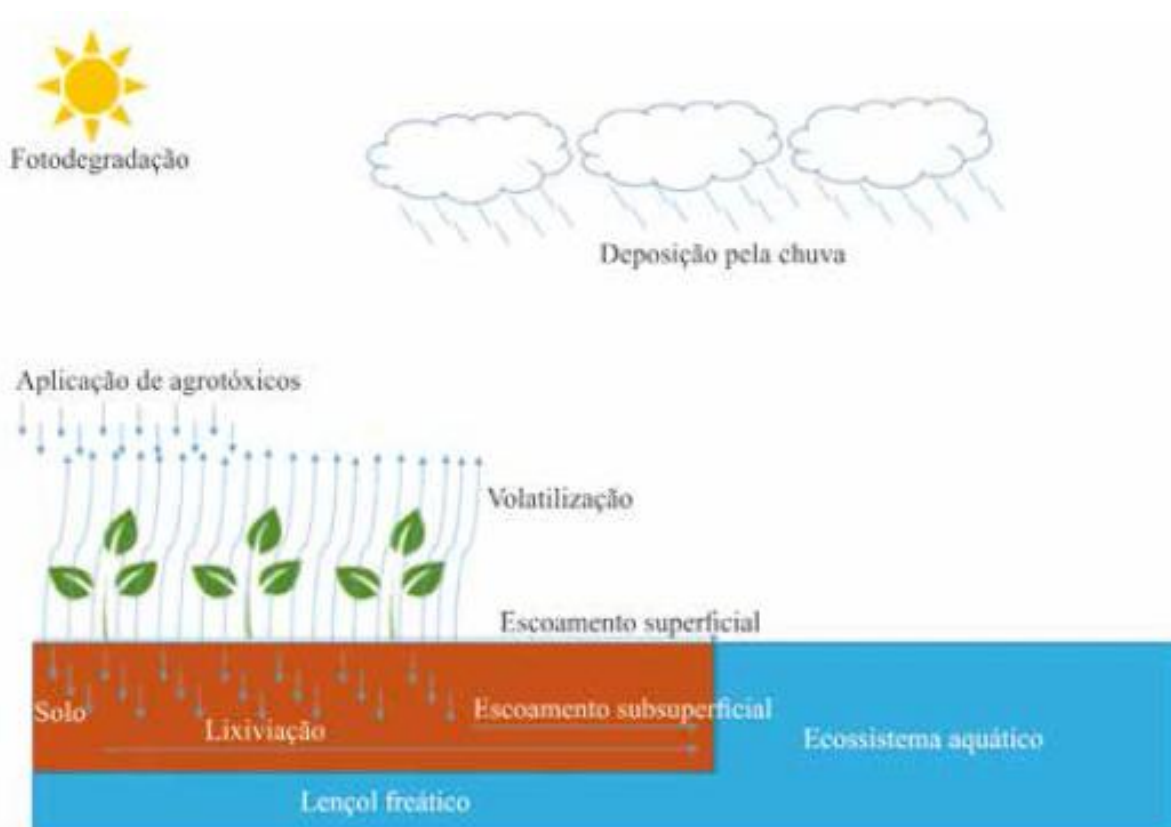
Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89).

De acordo com a espécie danosa que se pretende eliminar, esses compostos são classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscicidas, entre outros. Os herbicidas representam 48% do total de agrotóxicos/pesticidas, seguidos pelos inseticidas (25%) e pelos fungicidas (22%), (PELAEZ et al., 2010). Conforme a classe química, eles podem ser agrupados em piretróides, organoclorados, organofosforados, carbamatos, benzoiluréias, entre outros (WHO/UNEP/ILO/IPCS, 2006).

Os pesticidas chegam ao meio ambiente carregados por escoamento superficial e lixiviação das águas da chuva, irrigação e drenagem ou através de pulverizações, como ilustra a figura 8. Dentre esses processos, o escoamento superficial e lixiviação podem contaminar reservatórios, lagos e rios, e expor os organismos aquáticos a níveis de agrotóxicos que podem ser tóxicos a várias espécies. Uma vez presentes no ambiente aquático, esses compostos podem penetrar nos organismos por via oral – através da ingestão de alimento contaminado, respiratória – por meio das brânquias e dérmica – através da superfície do corpo, e na maioria das vezes, esses organismos tendem a sofrer bioacumulação (RODRIGUES et al., 2011, BELCHIOR et al., 2017). A exposição a pesticidas pode provocar

inúmeras alterações fisiológicas, por influência direta sobre determinadas estruturas celulares, como por exemplo, na membrana lisossomal, a qual pode ser degradada ou podem ainda reagir com ácidos nucleicos resultando em diversas injúrias genéticas, provocando assim reações adversas no organismo (COGO et al., 2009).

Figura 8. Ciclo dos pesticidas no ambiente.



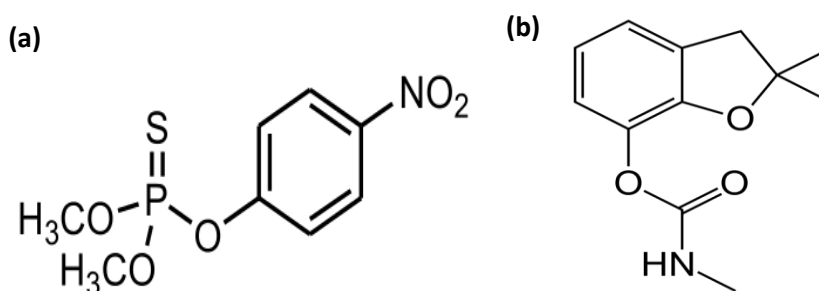
Fonte: BELCHIOR et al., 2017

Atualmente, é crescente a preocupação com o uso exacerbado de pesticidas, uma vez que nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos receberam de forma alarmante grandes quantidades desses compostos, liberados pelas comunidades urbanas, propriedades rurais e indústrias. Assim, a sociedade começou a se preocupar com os efeitos adversos dessas substâncias e o risco potencial que representam para a saúde humana e o meio ambiente (CARNEIRO et al., 2012). De acordo com SILVA et al (2013) carbamatos e organofosforados são os pesticidas mais utilizados em todo mundo e juntos respondem por mais de 50% do que é comercializado.

Os pesticidas organofosforados (OPs) compreendem um elevado número de substâncias classificadas quimicamente como ésteres, amidas ou derivados de ácidos

fosfóricos pentavalentes. Os carbamatos (CBs) são ésteres ou derivados N-substituídos do ácido carbâmico (monoamida do ácido carbâmico) (figura 9). Ambos apresentam baixa solubilidade em água e são, em geral, facilmente hidrolisáveis em ambientes alcalinos (DAUTERMAN, 1971; WHO, 1986a; VALE, 1998). Em geral, os OPs necessitam de biotransformação para se tornarem toxicologicamente ativos, ao contrário dos CBs que já são bioativos.

Figura 9. Pesticidas organofosforado (a) metil-paration (triésteres de ác. fosfórico) e (b) carbamato carbofuran (ésteres derivados de ác. carbâmico).



Fonte: HÖRNBERG et al., 2007; MATOS, 2012

Carbamatos e organofosforados afetam o sistema nervoso dos organismos, inibindo a atividade da acetilcolinesterase (AChE), tal como demonstrado por Wang et al. (2015). Em seu estudo, foi avaliada a inibição da AChE em carpa (*Cyprinus carpio*) exposta a diversas concentrações dos organofosforados malation e triazofós, assim como dos carbamatos fenobucarb e carbosulfan. Em misturas equitóxicas, os autores notaram que a atividade da AChE foi inibida pela combinação de triazofós e malation, bem como por triazofós e carbosulfan, ocorrendo sinergismo. Os efeitos de organofosforados sobre o comportamento e a atividade da AChE de larvas do peixe-zebra também foram estudados, por meio de exposição a clorpirifós e malation, e foram constatadas mudanças na velocidade de natação (hipoatividade e hiperatividade), descanso e tigmotatismo (RICHENDRFER, 2012).

Recentemente, benzoiluréia, uma classe de pesticida que no passado não era considerada como inibidora de acetilcolinesterase, uma vez que seu principal modo de ação é atuar inibindo a biossíntese de quitina nos insetos, através da interrupção na incorporação dos monômeros de N-acetilglicosamina, demonstrou potencial anticolinesterásico (MADUENHO e MARTINEZ, 2008). Essa classe de pesticida, em 2011, representava 3,6% do mercado mundial de pesticidas e, desde então, sua importância comercial vem crescendo ao longo dos anos (SUN et al., 2015).

Outras classes de pesticidas também apresentam potencial para causar danos não só bioquímicos como também genéticos em organismos aquáticos, como demonstra Silva e colaboradores (2017) que avaliaram o potencial genotóxico do herbicida trifluralin (um dos herbicidas mais utilizados no controle de ervas daninhas) no *Colossoma macropomum* (tambaqui). Os efeitos mutagênicos e genotóxicos das diferentes concentrações de trifluralin (0,25, 0,5, 0,75, 1,0 mg L⁻¹) em eritrócitos periféricos de *C. macropomum* foram investigados utilizando o teste de micronúcleos (MN), ensaio cometa e apoptose. Após um período de exposição de 96 h, os resultados mostraram uma taxa significativa de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de *C. macropomum* expostos a 0,5, 0,75, 1,0 mg L⁻¹ de trifluralin em comparação com o controle. Assim, a genotoxicidade do herbicida trifluralin em *C. macropomum* foi confirmada.

3.5.2. Metais Pesados em Ambiente Aquático

Os metais pesados são grupos de elementos, compreendidos, na tabela periódica, entre o elemento cobre (grupo 1B) e o elemento chumbo (grupo 4A), com massa atômica variando de 63,54 a 200,59 u.m.a. e com densidade acima de 4,0 g.cm⁻³ (DUFFUS, 2002). Essa definição também engloba, do ponto de vista ecotoxicológico, seus íons e compostos capazes de liberá-los. São quimicamente reativos e são naturalmente introduzidos nos ecossistemas aquáticos através dos processos geoquímicos e do intemperismo. Enquanto a contribuição atribuída à atividade humana é um reflexo do lançamento direto de grandes quantidades de efluentes industriais e urbanos sem tratamento adequado (COIMBRA et al., 2013). Uma vez lançados no ambiente, esses compostos tendem a se distribuir em diferentes compartimentos: água, sedimento e biota e por não serem biodegradáveis, tendem a se acumular, em tais matrizes, onde manifestam sua toxicidade (NUNES et al., 2014). Por este motivo, os metais pesados constituem alvo de preocupação por parte dos programas de monitoramento e legislação ambiental (MANSOURI et al., 2012).

No Brasil, a Resolução n°. 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a Portaria n°. 2914/2011 do Ministério da Saúde estabelecem limite máximo desses metais tóxicos em água superficial e água de consumo humano, respectivamente. Entretanto, ainda não se exige a determinação das espécies químicas, relevantes à biodisponibilidade produzida nas diferentes matrizes, nem informações sobre os efeitos subletais, avaliados pelos biomarcadores, destes metais nos organismos aquáticos. Por outro lado, a Resolução CONAMA n°. 421/2010, relacionada ao material a ser dragado em águas

jurisdicionais brasileiras, dispõe sobre as análises de metais em material oriundo do sedimento (sedimentos totais, ou suas frações - elutriato, água intersticial, interface água-sedimento) e recomenda a realização de ensaios ecotoxicológicos como complemento às análises físico-químicas.

Embora alguns metais pesados sejam essenciais para a manutenção da vida, todos os metais são tóxicos em concentrações elevadas, pois causam estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), tais como o íon superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e oxigênio livre (O^1). Os radicais livres produzidos pela presença de compostos tóxicos no organismo reagem com lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos e resultam em diversas injúrias bioquímicas ou genéticas (COGO et al., 2009).

Matos et al. (2017) ressalta que a presença e bioacumulação de metais estão diretamente relacionadas à ocorrência de dano genotóxico em organismos aquáticos. Assim, em seu estudo no rio Poti (Piauí, Brasil), esses autores avaliaram a influência de metais pesados (Fe, Zn, Cr, Cu e Al) por meio do teste do micronúcleo (MN) e ensaio cometa em *Oreochromis niloticus*. A análise química mostrou concentrações acima do limite (de acordo com as leis brasileiras) para Cu, Cr, Fe e Al e altas frequências de micronúcleos e danos no DNA foram observados em *Oreochromis niloticus*, caracterizando perturbação antropogênica neste meio aquático. Desta forma, os autores concluíram que as amostras de água do rio Poti apresentaram efeitos toxicogenéticos no bioindicador analisado e que este resultado deve-se à poluição por metais pesados.

Diversos estudos também têm informado sobre os efeitos inibitórios, e por vezes, ativadores de metais sobre atividades enzimáticas. A enzima acetilcolinesterase em geral é inibida na presença de alguns metais pesados (ASSIS et al., 2015; SILVA et al., 2013; DAI et al., 2014; ARAÚJO et al., 2016). Entretanto, ao contrário do que ocorre com a AChE, algumas enzimas, na presença de metais pesados, têm sua atividade aumentada, como por exemplo, as enzimas que combatem o estresse oxidativo, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione-s-transferase (GST), que utilizam esses compostos como seus substratos específicos. Este fato foi observado no trabalho de Atli e Canli (2007) através da exposição da CAT do fígado de *Oreochromis niloticus* a concentrações (5, 10 e 20 μ M) de cádmio e chumbo.

3.6. Tamoatá (*Hoplosternum littorale*)

O Tamoatá, *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828), é um peixe bentônico da família Callichthyidae (Siluriformes: actinopterygii) encontrado geralmente em fundos lamacentos de riachos, igarapés, lagoas e pequenos rios. Tem como característica morfológica principal o corpo coberto por placas ósseas dispostas em duas séries (uma superior e outra inferior), além de boca pequena projetada para frente e um par de barbilhões (SANTOS et al., 2006). Os espécimes adultos de *H. littorale* têm porte médio, corpo alongado, levemente comprimido, e a cabeça deprimida, sendo o focinho arredondado em vista dorsal (figura 10). São animais sedentários, com hábitos noturnos e apresentam hábito alimentar onívoro, com dieta constituída principalmente de micro-invertebrados, detritos, algas, escamas de peixes, sementes e fragmentos de pequenos insetos associados ao sedimento (SOARES et al., 2008).

Figura 10. Imagem de um exemplar de *Hoplosternum littorale*



Fonte: Acervo pessoal do autor

H. littorale está amplamente distribuído em toda a América do Sul e, no Brasil, é encontrado nas áreas de drenagem de praticamente todas as bacias hidrográficas (SALVADOR-JR e SILVA, 2011). Na Amazônia, é um peixe muito apreciado por populações ribeirinhas e urbanas para alimentação. Entretanto, em outros países da América Latina, são mais apreciados como peixes ornamentais, principalmente pela possibilidade de exportar para países como França e Estados Unidos (SÁ-OLIVEIRA et al., 2011).

Atualmente, esta espécie não se encontra ameaçada ou em perigo de extinção e vários estudos tem reportado o seu uso como bioindicador de ambientes aquáticos impactados, uma

vez que este peixe, devido à sua capacidade de usar o intestino como órgão acessório para a respiração aérea (facultativa), é capaz de sobreviver em áreas com níveis críticos de oxigênio dissolvido (SANTOS et al., 2006; MENEZES et al., 2007; SOARES et al., 2008; SALVADOR-JR e SILVA, 2011; PINHEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2016). Desta forma, por apresentar características importantes como ampla distribuição, ausência de migração e tolerância a diferentes ambientes, *H. littorale* é uma espécie que apresenta potencial como bioindicador em estudos de monitoramento de água doce.

3.7. Características Gerais do Riacho Cavouco

Atualmente, na cidade do Recife, estão sendo realizadas atividades que visam uma mudança de paradigmas em relação ao espaço das águas na cidade e a revitalização dos cursos d'água principais e de seus afluentes (CABRAL et al., 2015). O Grupo de Recursos Hídricos (GRH) da UFPE iniciou recentemente um estudo sobre os riachos urbanos de Recife (chamados de canais pela prefeitura) e identificou um total de 99 riachos que compõem a malha hidrográfica do Recife. Desses, 32 são afluentes do Rio Capibaribe, incluindo o riacho Cavouco (figura 11).

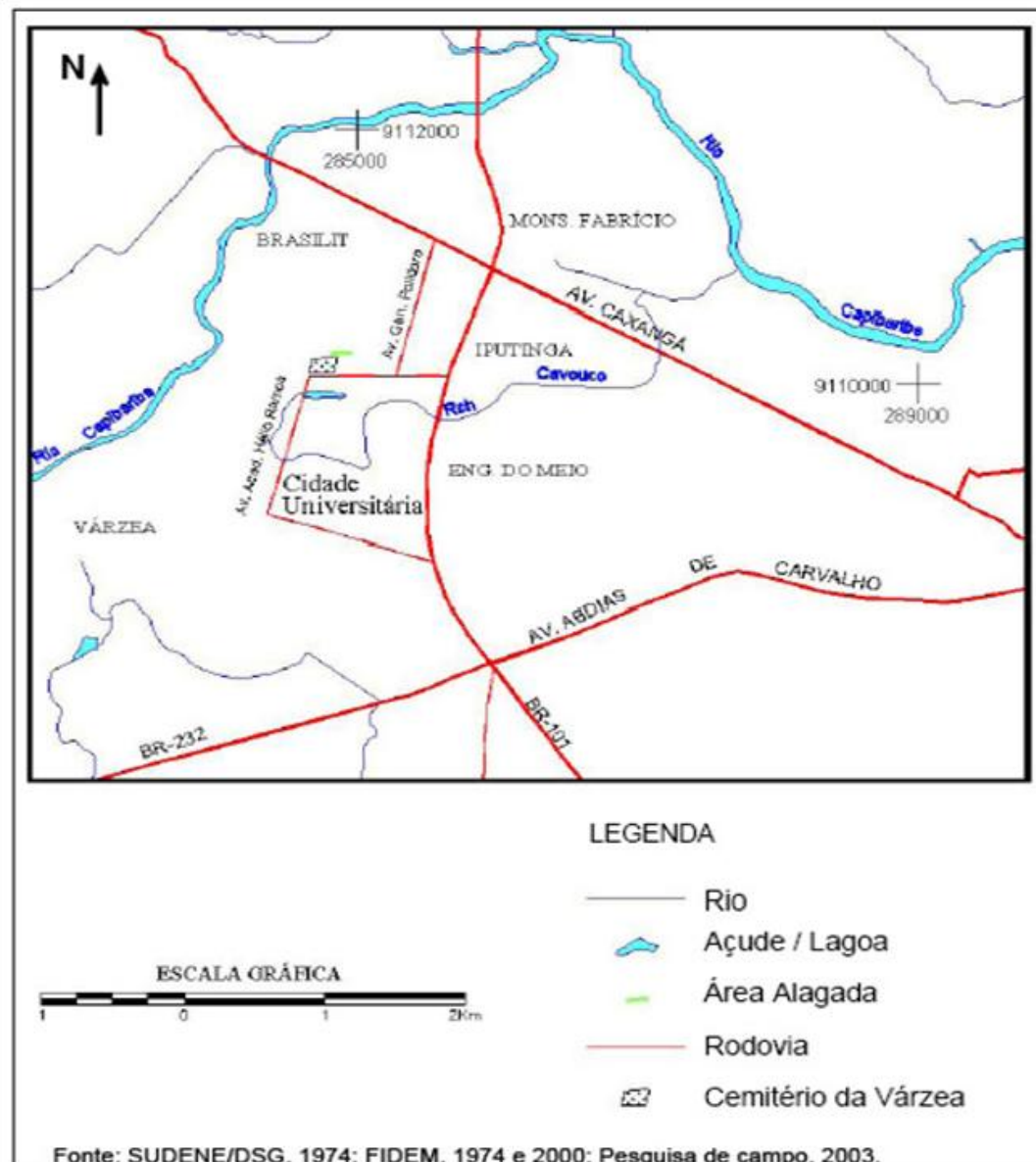
Figura 11. Malha de riachos urbanos – rio Capibaribe. Em destaque (vermelho) está o riacho Cavouco.



Fonte: Arquivo Riachos Urbanos, 2014.

O riacho Cavouco localizado nas coordenadas 8°2'52.05" latitude Sul e 34°57'10.33" longitude Oeste, é um riacho urbano que possui extensão de aproximadamente 6000 metros da nascente até a foz e apresenta largura variável de 2 a 15 m. (CALADO, et al., 2002). Em seu percurso, atravessa o *Campus* da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) onde recebe esgotos de natureza química e hospitalar, em seguida, passa por comunidades onde é circundado por casas populares em suas margens e algumas sobre seu leito, desprovidas em sua maioria de esgotamento sanitário. Por fim, após atravessar bairros urbanizados como Cidade Universitária e Iputinga, encontra-se com o riacho Caiara e deságua na margem direita de um dos principais rios do Estado de Pernambuco, o rio Capibaribe, que por sua vez deságua no Oceano Atlântico (figura 12).

Figura12. Trajetória do riacho Cavouco da nascente até a foz



Dada sua importância como recurso hídrico, várias iniciativas vêm sendo realizadas com o intuito de corroborar com o monitoramento e conservação desse riacho. O Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, através do Laboratório de Engenharia Ambiental e da Qualidade - GEAQ, realizou, no período de 1998 a 2001, o monitoramento físico-químico da água desse riacho, avaliando principalmente a concentração de metais, Demanda Química e Bioquímica de Oxigênio (DQO e DBO). No trecho em que o Cavouco atravessa o *Campus* Recife da UFPE, foi constatado que houve redução da carga poluidora, nesse período, relacionando tal resultado ao planejamento estratégico conduzido pela UFPE, no sentido de minimizar a contribuição do lançamento dos efluentes do *Campus* nesse riacho (CALADO, et al., 2002). Entretanto, recentes evidências obtidas pelo Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente da UFPE (NuBIOMA) indicaram, por meio de análises físico-químicas da água e de biomarcadores enzimáticos, que este riacho ainda encontra-se impactado, com consequências ainda pouco conhecidas para as espécies que o habitam (ARAÚJO e OLIVEIRA, 2013 ; ASSIS et al., 2014). Ainda no âmbito do NuBiOMA, também foi realizada a caracterização fenotípica e molecular da microbiota local e foi identificado no “Cavouco” a presença de bactérias patogênicas (PURIFICAÇÃO JÚNIOR et al., 2017) .

Outros trabalhos com ações voltadas para o diagnóstico sócio-ambiental do riacho Cavouco, incluindo subprojetos de biomonitoramento e macroinvertebrados e diagnósticos dos fungos aéreos associados à biota também vem sendo realizados por pesquisadores da UFPE (RODRIGUES et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2014; CORREIA e SANTOS, 2014).

Recentemente, a requalificação de um trecho do riacho Cavouco já foi realizada pela prefeitura da cidade do Recife, canalizando as margens, plantando grama nos taludes da calha expandida, arborizando as margens e construindo as passarelas para pedestres que vem sendo usadas frequentemente pela população para caminhadas (figura 13). Entretanto, um olhar mais atento é necessário não apenas pelas questões paisagísticas/contemplativas, mas também para a conservação das águas como recurso hídrico e berçário natural para diversas espécies. A recuperação das características ecológicas é tão importante quanto os aspectos sociais que envolvem a melhoria do conforto térmico, estética e lazer contemplativo. Sendo assim, ressalta-se que a implementação de ações integradas e permanentes são necessárias para promover a revitalização deste riacho e, com isso, possibilitar à conservação da biodiversidade, o uso sustentável dos recursos naturais, a melhoria das condições socioambientais e da qualidade da água para usos múltiplos.

Figura 13: Trecho do riacho Cavouco mostrando margens canalizadas, área gramada na calha expandida, passeio para pedestre e ciclovia.



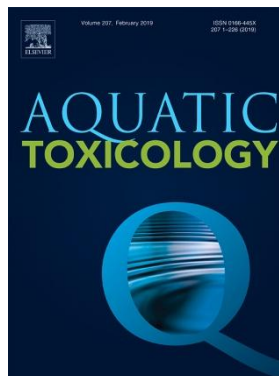
Fonte: Arquivo Riachos Urbanos, 2013 (riachosurbanos.blogspot.com.br)

Nesse sentido, os dados obtidos na presente tese poderão contribuir para o incremento do monitoramento de riachos urbanos impactados no Recife e com estudos posteriores na construção de um sistema fiscalizador sobre o controle da poluição. Ademais, os dados obtidos referentes ao trecho do riacho Cavouco, situado na UFPE, contribuirão para auxiliar no controle dos resíduos gerados pela mesma e com isso, no futuro, ingressar a UFPE no contexto nacional de sustentabilidade e do gerenciamento de resíduos químicos, ainda inexistente na grande maioria das universidades brasileiras. Adicionalmente, os dados obtidos nesta tese poderão contribuir com informações que auxiliem no monitoramento de outros ambientes aquáticos impactados.

4. CAPÍTULO I

Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring

Artigo publicado na revista
Aquatic toxicology



Qualis: A1

ISSN: 0166-445x

Fator de Impacto: 3,794

Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring

Marlyete Chagas de Araújo^{1,6}; Caio Rodrigo Dias de Assis^{1,7}; Kaline Catiely Campos Silva²; Kelma Sirleide de Souza¹; Rafael Souto de Azevedo¹; Maria Helena Menezes Estevam Alves³; Luciano Clemente da Silva^{1,4}; Valdir Luna da Silva⁴; Mônica Lúcia Adam⁵; Luiz Bezerra de Carvalho Junior³; Ranilson de Souza Bezerra¹; Maria Betânia Melo de Oliveira⁶.

¹Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Educação, Colegiado de Biologia, Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Paulo Afonso, BA, Brazil.

³Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil.

⁴Laboratório de Fisiologia Comparada e Comportamento Animal - LabFCCA, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil.

⁵Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão – CAV, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

⁶Laboratório de Biologia Molecular – BioMol, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil.

⁷Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos - OrganoMAR, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil.

*Corresponding author:

Maria Betânia Melo de Oliveira

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540 Recife, PE, Brazil;

E-mail address: maria.bmoliveira@ufpe.br

Abstract

Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) is a serine hydrolase, whose main function is to modulate neurotransmission at cholinergic synapses. It is, therefore, the primary target of some pesticides and heavy metals. Its inhibition in aquatic organisms has been used as an indicator of the presence of these pollutants in water bodies. The present study aimed to characterize physicochemical and kinetic parameters of brain AChE in the benthic fish *Hoplosternum littorale* and to analyze the *in vitro* effects of pesticides (dichlorvos, diazinon, chlorpyrifos, parathion-methyl, temephos, carbaryl, carbofuran, aldicarb, diflubenzuron, novaluron and pyriproxyfen) and metal ions (As^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+}) investigating the potential of this enzyme as environmental biomarker based on current regulations. Specific substrates and inhibitors have indicated AChE to be the predominant cholinesterase (ChE) in the brain of *H. littorale*. Peak activity was observed at pH 8.0 and 30°C. The enzymatic activity is otherwise moderately thermostable ($\approx 50\%$ activity at 45°C). The enzyme can reduce the activation energy of acetylthiocholine hydrolysis reaction to 8.34 kcal.mol⁻¹ while reaching a rate enhancement of 10⁶. Among the pesticides under study, dichlorvos presented an IC₅₀ value below the maximum concentrations allowed by legislation. This study presents the first report on the inhibition of brain AChE activity from Siluriformes by the pesticides novaluron and pyriproxyfen. Mercury ion also exerted a strong inhibitory effect on its enzymatic activity. The *H. littorale* enzyme thus has the potential to function as an *in vitro* biomarker for the presence of the pesticide dichlorvos as well as mercury in areas of mining and industrial discharge.

Keywords: *Hoplosternum littorale*; cholinesterase; organophosphorus; carbamate; benzoylurea; biomarker.

1. Introduction

After the ban on most organochlorine compounds due to their high persistence in the environment, the use of carbamates and organophosphates has intensified; they are currently the most widely used pesticides in the world. It is estimated that these two types of pesticides account for more than 50% of all marketed pesticides. They are known to have a neurotoxic action (inhibitory) on the activity of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), which is a key enzyme in the regulation of synaptic transmission (). The AChE promotes the hydrolysis of the neurotransmitter, acetylcholine, to ensure intermittent nerve impulses (which characterize neuronal communication) while preventing acute cholinergic syndrome that can result if this neurotransmitter accumulates in the nerve endings of the central and peripheral nervous system (Karczmar, 1998; Kellar, 2006). This enzyme is the primary molecular target of the neurotoxic action of the aforementioned pesticides and for this reason has been widely studied and proposed for use in biomonitoring programs, given its sensitivity and abundant availability in the brains of various organisms, including fish (Ghazala et al., 2014; Wang et al., 2015; Araújo et al., 2016). In addition, inorganic pollutants, such as heavy metals are also described in the literature as AChE inhibitors (Silva et al., 2013; Dai et al., 2014; Assis et al., 2015, Souza et al., 2018). Heavy metals are not biodegradable, and thus, tend to bioaccumulate in organisms, where they manifest their toxicity (Nunes et al., 2014).

Due to the deleterious effects caused by these pollutants on non-target species, measurement of brain acetylcholinesterase (AChE) activity in fish is a widely accepted diagnostic method, i.e., a biomarker, to estimate fish exposure to anti-AChE agents in the aquatic environment. However, the characterization and prior knowledge of its enzymatic properties are necessary, since AChE is a polymorphic enzyme that can present itself in a series of molecular forms, both inter- and intra-specifically. Although being structurally very conserved (the active site and its gorge), these particular characteristic (polymorphism) leads to variations in its susceptibility to contaminants between different species (Roseberry, 1975; Nigam et al., 2012; Assis et al., 2014). According to Pezzementi and Chatonnet (2010), several fish species do not express the other accepted cholinesterase (ChE), butyrylcholinesterase (BChE) in the brain and some of them do not express it in any tissue. Another cholinesterase, PChE, is a controversial enzyme not completely accepted in the literature (PChE does not have EC number). The enzymes closest to be a real PChE are *Drosophila* AChE (Gnagey et al., 1987) and some mollusks ChEs (Grigorieva et al., 1973; Talesa et al., 1990). Assis et al. (2014) observed atypical ChE activity in brain of *Colossoma macropomum*. This literature background justifies the characterization of these enzymes in each species and their susceptibility to contaminants.

Hoplosternum littorale is a species of fish that inhabits rivers and lakes with adverse conditions, ranging from anoxic conditions to water-limited areas with dense vegetation. It features facultative air-breathing, which allows it to survive in these disparate environments (Silva et al., 2016). It is a species of great commercial importance in Venezuela and the Guianas and in the north of Brazil, where it is used as food by a large part of the riverside populations (Salvador-Jr and Silva, 2011; Pinheiro et al., 2013). Genetic and hematological characteristics of this species are already described in the literature, but the biochemical properties are yet to be known. In this context, the objective of this study was to characterize kinetic and physicochemical parameters of *H. littorale* cerebral AChE, as well as to verify the *in vitro* effect of pesticides and metal ions on its activity, in order to extend the possibilities of applying this enzyme in aquatic biomonitoring.

2. Material and methods

2.1. Determination of enzymatic activity

Ten juvenile specimens of *Hoplosternum littorale* (weight 230.7 ± 4.5 g, length 22.5 ± 2.6 cm) were collected from an urban creek in the city of Recife, State of Pernambuco, Brazil. They were submitted to a period of 30 days depuration in 60L aquaria with constant aeration. After that, the specimens were anesthetized with 150 mg/L tricaine (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, Sigma-Aldrich) and brains of the fish were removed and homogenized in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) in a ratio of 20 mg tissue/mL using a tissue homogenizer (IKA RW-20 digital, Staufen, Alemanha). The homogenate was centrifuged for 10 minutes at $1000 \times g$ (4°C), and the supernatant was collected and transferred to vessels that were then labeled and stored at -20°C until further analysis was performed.

Enzyme assays were performed in quadruplicates according to the method described by Elmann et al (1961) and adapted by Araujo et al (2016). Briefly, the assay was performed in a microplate with 20 μL of the extract; 200 μL of 0.25 mM chromogenic reagent 5, 5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic) acid (DTNB) and 20 μL of 62 mM substrates of the enzymes AChE, propionylcholinesterase (PChE) and butyrylcholinesterase (BChE): acetylthiocholine (ASCh), propionylthiocholine (PSCh) and butyrylthiocholine (BSCh), respectively. The activity was measured through a microplate reader for 3 minutes at 405 nm. The unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme capable of hydrolyzing 1 μmol of the substrate per minute. The dosage of the protein

concentration was determined according to the method of Sedmak and Grossberg (1977) using bovine serum albumin as a standard.

The concentration of the substrates (62 mM) is an intermediate concentration next to the saturation plateau of Michaelis-Menten curve to standardize and make comparable the ChEs activities among several species. Moreover, this concentration ensures that the reaction is linear during the reading time.

2.2. Kinetics and Physico-chemical Parameters

The Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) were estimated by assaying the enzymatic activity at increasing concentrations of ASCh and PSCh (from 0.8 to 20.8 mM as final concentration). The activities were adjusted with a non-linear regression model using MicroCal[™] software, Origin[®] Version 8.0 (MicroCal, Northampton, MA, EUA).

The optimal pH and temperature of *H. littorale* AChE were measured by assaying the enzymatic activity in buffers with different pH values that ranged from 4.0 to 9.0 (citrate-phosphate – 4.0 to 7.2; tris-HCl - 7.2 to 9.0) and at temperatures ranging from 5 to 50°C (5°C consecutive intervals). Thermal stability was determined by subjecting the enzyme to the same temperatures for 30 min followed by the remaining activity being assayed after a rest of 15 min at 25°C (equilibration at ambient temperature).

2.3. Selective inhibition assay

Selective inhibitors, BW284c51 (AChE inhibitor), Iso-OMPA (PChE/BChE), neostigmine bromide, and eserine (total ChE inhibitor), were incubated with the brain extract for 60 min. Inhibitor concentrations ranged from 0.001 to 10 mM (serial dilution up to 10×). After the incubation, 200 µL of 0.25 mM DTNB was added along with 20 µL of 62 mM acetylthiocholine substrate, and the reaction was initiated. Absorbance was measured at 405 nm in the times 0 and 180 s, and the residual activity was determined, considering that the absence of the inhibitor will allow 100% activity. The data were adjusted using non-linear regression models with the best coefficient of determination: exponential decay, sigmoidal (Boltzmann), and polynomial ($p < 0,05$), to calculate the inhibition parameters.

2.4. Estimation of catalytic efficiency of AChE

The amount of enzyme of the extracts (Et) was estimated using a standard curve (activity versus protein concentration) made with AChE from *Electrophorus electricus* according to the method of Assis and collaborators (2014) with modifications. The equation

obtained from the curve was used to calculate the Et of the extracts by converting activity to $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and then to mol.L^{-1} using the molecular weight of AChE from *E. electricus* as model (266 kDa as determined by Assis et al., 2014, corroborating Augustinsson, 1971). The use of the commercial *E. electricus* enzyme as model is justified by the compatibility between the commercial enzyme and the AChE from *H. littorale* brain: 1) According to Chatonnet and Lockridge (1989), Taylor (1991) and Assis et al. (2018), AChE from vertebrate's brain is a tetrameric form linked to the cell membrane by a protein (proline-rich transmembrane anchor - PriMA) whereas *E. electricus* AChE has its tetrameric units separated from the collagen tail by a treatment with proteases (by manufacturers); 2) according to Rosenberry (1975), the structure of catalytic subunits of tetrameric AChE is very conserved intra- and interspecifically. Therefore, it was possible to estimate the renewal number (k_{cat}) and catalytic efficiency of the enzymatic extracts ($k_{\text{cat}}/k_{\text{m}}$) by using the parameter Et, together with the values of K_{m} and V_{max} .

2.5. Activation energy (AE) and catalytic acceleration

To estimate activation energy (AE) produced by brain AChE from *H. littorale* during the hydrolysis of the ASCh substrate, assays were performed at increasing temperatures until the optimum temperature. The data was then inserted in the Arrhenius plot. Thereafter, catalytic acceleration produced by the enzyme (rate enhancement) with respect to the non-enzymatic reaction was estimated using the equation I. Furthermore, in the case of k for the non-catalyzed reaction, the AE was replaced by the value obtained in the Arrhenius plot using the data of blanks (Assis et al., 2014):

$$k = \left(\frac{kT}{h} \right) \times e^{-\frac{AE}{R}} \quad (\text{I})$$

Where k is the velocity constant, k represents the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, h is the Planck constant, AE is the activation energy, and R is the gas constant.

2.6. Effect of pesticides

The extracts were incubated for 60 min at 25°C with five organophosphates (dichlorvos, diazinon, chlorpyrifos, methyl-parathion and temephos), three carbamates (carbaryl, carbofuran and aldicarb), two benzoylureas (diflubenzuron and novaluron), and one juvenile hormone analog (pyriproxyfen). The insecticides were dissolved in dimethyl

sulfoxide (DMSO) and then diluted in distilled water to obtain concentrations from 0.001 to 10 mM (0.00025 to 2.5 mM for novaluron) by serial dilution (10×) (yielding 2% DMSO). Incubation was performed according to the method of Assis et al (2012) and the residual activity (yielding 0.016% DMSO) was determined while considering the absence of pesticides to allow 100% activity. The data were adjusted using non-linear regression models with the best coefficient of determination to calculate the inhibition parameters.

2.7. Effect of ions

The effects of the ions As^{3+} (NaAsO_2), Cd^{2+} (CdCl_2), Cu^{2+} (CuCl_2), Fe^{3+} (FeCl_3), Hg^{2+} (HgCl_2), K^+ (KCl), Mg^{2+} (MgCl_2), Mn^{2+} (MnCl_2), Pb^{2+} (PbCl_2), Zn^{2+} (ZnCl_2) were measured as done for the trials with selective inhibitors and pesticides (concentrations ranging from 0.001 to 10 mM in 10× dilution series for each ion), except that the incubation time for AChE extraction from *H. littorale* (10 μL) with the ions (10 μL) was 40 min (Bocquené et al., 1990; Assis et al. (2015). The data obtained were adjusted using the best non-linear regression ($p < 0,05$) model for the calculation of inhibition parameters.

2.8. Estimation of inhibition parameters IC_{50} , IC_{20} e K_i

Concentrations capable of inhibiting enzyme activity by 50% and 20% (IC_{50} and IC_{20} , respectively) were estimated for each inhibitor (specific inhibitors, pesticides, and ions). The IC_{50} was necessary to calculate the inhibition constant by the equation II (Cheng e Prusoff, 1973):

$$k_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \left(\frac{[\text{S}]}{k_m}\right)} \quad (\text{II})$$

Here, [S] represents substrate concentration.

2.9. Statistical analyzes

All tests, except those for the optimum temperature and thermal stability determinations, were performed at room temperature (25°C). For pesticide assays, residual activities (%) were plotted versus I_n of the inhibitor concentration (mM). Data were expressed as mean $\pm$ SD of the four replicates. The three extracts were statistically analyzed using linear and non-linear regression models in the MicroCal™ Origin® software, version 8.0. For selective inhibitors, analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test (as indicated by the tests of normality and homogeneity of variance) was used to compare means; the differences were reported significant at 5% significance ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Kinetics and Physico-chemical Parameters

The kinetic parameters maximum velocity (V_{max}) and Michaelis-Menten constant (K_m) were analyzed using the ASCh and PSCh substrates. The V_{max} , relative to the hydrolysis of ASCh, is reported to be in a range similar to that of other species (Table 1). The K_m value has been compared to that of various species in Table 1. The ASCh substrate was more efficiently hydrolyzed by AChE from *H. littorale* than the PSCh substrate. No activity was observed in the brain tissue with the BSCh substrate (data not shown).

The physicochemical parameters of the enzyme's functioning are also presented in Table 1, along with the values for other species. The optimum pH found for the AChE from *H. littorale* was 8.0 (Figure 2A). Maximum enzyme activity was determined at 30°C (Figure 2B). With respect to thermostability, AChE from *H. littorale* maintained 50% of its activity after incubation at 45°C for 30 min, followed by 15 min of equilibration at room temperature (Figure 2C).

3.2. Selective inhibitors

The activity of AChE obtained from the brain of *H. littorale* was strongly inhibited in the presence of specific inhibitors of both AChE (BW284c51) and BChE (Iso-OMPA), although there was virtually no BChE tissue-like activity (Figure 3A and 3B). This observation was confirmed by analyzing the inhibition parameters that showed a trend toward stronger inhibition with BW284c51 (Table 2). Both total ChE inhibitor, serine and neostigmine, inactivates similarly an enzyme that was studied. Concentrations that inhibit enzyme activity by 20% (IC_{20}) and the median inhibitory concentrations (IC_{50}) relative to these inhibitors are given in Table 2.

3.3. Estimation of catalytic efficiency, activation energy (AE) and catalytic acceleration of AChE

The parameters of renewed number (k_{cat}) catalytic efficiency (k_{cat}/k_m), catalytic acceleration (rate enhancement), and activation energy (AE) are given in Tables 3 and 4. The k_{cat} value for the *H. littorale* enzyme is close to the order of magnitude of the values recorded for other species by Assis et al. (2014), whereas the value of k_{cat}/k_m calculated in the present study is about an order of magnitude below the values for other species presented in Table 3. The activation energy of the reaction between AChE from *H. littorale* and the ASCh substrate, as well as its catalytic acceleration (*rate enhancement*) calculated here, were in the same range as that reported for other species (Table 4).

3.4. Effect of pesticide

All pesticides under consideration here exerted an inhibitory effect on *H. littorale* AChE activity; this was especially true for the inhibitory potential of carbofuran and dichlorvos pesticides (Figure 4C and 4F and Table 5). The order of decreasing inhibitory capacity according to the IC_{50} was as follows: The pesticides, temephos, diflubenzuron, and pyriproxyfen, did not present an IC_{50} in the concentration range used in the present study (Figure 4G, 4J e 4K).

3.5. Effect of ions

Among the ions to which the AChE from *H. littorale* was exposed, mercury and copper were noted for their strong inhibitory potential. The ions that exerted the greatest inhibition of AChE from the species studied here were: $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > As^{3+} > Pb^{2+} > Zn^{2+}$ (Figure 5A-5F e Table 6). Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} e K^+ did not present IC_{50} in the concentration range tested (Figure 5G-5J).

4. Discussion

According to the value of kinetic parameters K_m and the maximum hydrolysis rate (V_{max}), ChE extracted from *H. littorale* brain showed a higher affinity for the ASCh substrate as compared to both PSCh and BSCh (this last one presented no activity) (Table 1). According to the exposure to specific inhibitors, the concentration of Iso-

OMPA (BChE-specific inhibitor) able to inhibit 50% of the enzyme activity was 2.46-fold higher than that of BW284c51 (AChE-specific inhibitor). Although taking into account the fact that BChE enzyme showed no activity, PChE-like activity was considerable. Thus, it can be suggested that brain ChE from *H. littorale* may present an active site with intermediate size ranging between those of AChE and BChE and that the activity can be ascribed to AChE, since it can hydrolyze PSCh in a lower rate than ASCh. Therefore, from now on, the ChE activity will be attributed to AChE. PChE is not totally accepted by most of the authors and has no EC number (some authors use 3.1.1.8 – the same of BChE). PChE-like activity has been reported to occur more frequently in invertebrates, such as *Drosophila* (Gnagey et al., 1987) and mollusk species, including *Lymnaea stagnalis* (Grigorieva, 1973) and *Murex brandaris* (Talesa et al., 1990). The enzyme from the brain of tambaqui *Colossoma macropomum*, also presented characteristics similar to PChE, but was classified as AChE (Assis et al., 2014).

The maximum enzymatic activity was observed at pH 8.0, a value observed for most species in several studies and which favors the optimal conformation of the enzyme (Bocquené et al., 1990; Rodríguez-Fuentes e Gold-Bouchot, 2004; Rodríguez-Fuentes et al., 2008; Assis et al., 2010; Assis et al., 2012; Silva et al., 2013; Araújo et al., 2016). The *H. littorale* enzyme was more active at 30°C, which is a temperature considered low for a fish from tropical regions as compared with other species (Table 1). However, *H. littorale* inhabits the benthic stratum of water bodies, where temperatures are lower than the upper layers. The enzyme demonstrated stability at low temperatures, which enabled successful introduction of this fish species in the USA, whereby it colonized rivers, lakes, and swamps in the Southeast of the country (Hostache and Mol, 1998; Orfinger, 2015). At high temperatures, the AChE from *H. littorale* retained 50% of its activity at temperatures up to 45°C.

For estimation of the catalytic efficiency parameters, a standard curve of the activity of commercial AChE from *Electrophorus electricus* versus its concentration (in µg/mL) was generated. This curve was then used to determine the amount of total enzyme (Et) in the brain extract of *H. littorale* (by converting its activity to protein concentration) due to the compatibility of the commercial AChE with brain tetramers after treatment with proteases (performed by the manufacturers). These proteases help to separate the three tetrameric units (asymmetric form with 12 catalytic subunits - A12) from the collagen tail (Chatonnet and Lockridge, 1989; Assis et al., 2014). According to Rosenberry (1975), when the anchors of glycopospholipids, collagen, and other non-catalytic subunits are removed, the monomers of ChEs exhibit better activities and very approximate molecular weights (justifying the use of *E. electricus* AChE molecular weight as model). Therefore, Et was converted to µmol/mL using the molecular weight of AChE from *E. electricus* (266 kDa estimated by Assis et al., 2014, which is similar to 260 kDa, described by Augustinsson, 1971). From this estimate, it

was possible to estimate the renewal number (kcat) and catalytic efficiency (kcat/km) of the *H. littorale* enzyme. The value of kcat, as well as km, is dependent on the affinity of the enzyme for the substrate. It represents the number of substrate molecules processed per unit time by the enzyme under conditions of saturation. The kcat/km represents the catalytic efficiency of the enzyme under physiological conditions. The values of kcat and kcat/km for AChE estimated in the present study are close, but slightly below (in terms of magnitude orders) the estimated values for the enzymes from *A. gigas*, *C. macropomum*, *E. electricus*, *O. niloticus*, and *R. canadum* described by Assis et al., (2014) Rosenberry (1975), Nolte et al., (1980), Fersht (1999), Miller and Wolfenden (2002) and some estimated values reported in studies on computational simulations (Fuxreiter and Warshel, 1998). Such a difference can be attributed to thermostability since thermostable enzymes present higher affinity and catalytic efficiency and the same domain in the structure of various enzymes is linked to thermostability and affinity (Fang et al., 2014; Fang et al., 2016). All the mentioned fish species showed greater thermostability range (when determined) than *H. littorale* (Assis et al., 2010; Assis et al., 2012). Furthermore, the viscosity of the reaction medium is of vital importance in determining the hydrolysis time, since AChE is an enzyme whose speed is controlled by the diffusion limit of the substrate in the medium (here, brain buffered extract – higher viscosity), which may vary between the methodologies employed (Miller e Wolfenden, 2002).

In the present study, the activation energy (AE) of ASCh hydrolysis reaction catalyzed by AChE from *H. littorale* ($8.338 \text{ kcal.mol}^{-1}$) showed a 52% decrease relative to the non-catalyzed reaction ($17.36 \text{ kcal.mol}^{-1}$ according to Assis et al., 2014), resulting in a catalytic acceleration (*rate enhancement*) that averaged at a speed 10^6 -fold greater than that of the spontaneous reaction. The AE values and catalytic acceleration found here were similar to those observed for AChE from *C. macropomum* and also for the slightly divergent form of this enzyme produced by *A. gigas* and *O. niloticus canadum* in a study by Assis et al. (2014). These differences can also be attributed to the effect of the difference in diffusion rate of the substrate on the speed of hydrolysis of AChEs from several species; this difference can arise from methodological differences in each mentioned study.

According to the FAO (2007), a 20% inhibition of AChE activity characterizes the likely presence of an anti-AChE agent, while 50% inhibition indicates the onset of associated signs and symptoms and 90% inhibition results, in most of cases, the death of the organism. Therefore, the parameters, IC_{20} and IC_{50} (concentrations of pesticides that inhibit 20 and 50% of AChE activity, respectively), are important because they represent the situations mentioned above, as well as demonstrate the toxicity of a particular compound on its interaction with AChE. In the present study, the IC_{50} values found for the interaction between the enzyme and the organophosphates (OPs) and carbamates (CBs) pesticides studied here represent the following order of decreasing inhibitory power (using the

IC₂₀ as the second criterion): dichlorvos > carbofuran > diazinon > carbaryl > paration-methyl > aldicarb > chlorpyrifos > novaluron > pyriproxyfen > temephos > diflubenzuron. This order of toxicity followed an expected pattern in comparison to results obtained from studies on other fish (Assis et al., 2010; Assis et al., 2012; Silva et al., 2013; Araújo et al., 2016), an exception is aldicarb, which is a carbamate pesticide considered to cause high acute toxicity. The inhibition constant (k_i), which describes the dissociation of the enzyme-inhibitor complex, followed the same trend as IC₅₀ because of the proportional relationship that exists between these parameters (Cheng e Prusoff, 1973).

Dichlorvos is the most volatile compound among the OPs. Despite being a dimethyl-OP (whose inhibitory effect and reactivation of the enzyme are faster than diethyl- and diisopropyl OPs), it belongs to the sub-group of phosphates (P=O) that do not need to undergo biotransformation (oxidative desulfurization) by the mono-oxygenases of the cytochrome P450 complex as they are already absorbed by the organisms in their most inhibitory form (WHO, 1986a; Vale, 1998; Eddlestone, 2002; Paudyal, 2008). Therefore, this compound was found to be the one with the highest affinity and inhibitory power against the activity of AChE from *H. littorale*, which was more sensitive than the same enzymes from *A. gigas*, *R. canadum*, and *O. niloticus* that were characterized by Assis and collaborators (2012). In the present study, the range of inhibition of AChE from *H. littorale*, when treated at IC₂₀ and IC₅₀ (0,148 – 0,390 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), is below the maximum concentration recommended by the OP Resolution n° 357/2005 of Brazilian National Council of Environment (CONAMA), Class 3 of water (water for domestic use after conventional treatment for livestock forage and irrigation) and expressed in equivalents of methyl- parathion (37 $\mu\text{g.L}^{-1} \approx 1,665 \mu\text{mol.L}^{-1}$) positioning *H. littorale* AChE as a potential biomarker of exposure to pesticide, dichlorvos class 3 of water.

The remaining OP pesticides in the present study (diazinon, methyl parathion, chlorpyrifos and temephos) did not present IC₅₀ values below the guidelines given in legislation. They belong to the phosphorothioate sub-group (P=S), and therefore, require oxidative desulfurization, which is promoted by the P450 complex. This step is required to help the members of this group reach their full inhibitory potential in the form of their metabolites: diazoxon, paraoxon-methyl, chlorpyrifos-oxon and temephos-oxon (WHO, 1986a; Vale, 1998). With the exception of temephos, all of them may present as an impurity (due to the manufacturing process or inadequate storage conditions) the formation of tetraethyl pyrophosphate (better known as TEPP), which is an obsolete and banned pesticide, is highly toxic to mammals (NRA, 2002; Assis et al., 2010). Diazinon is a diethyl-OP that showed a high inhibitory effect against the activity of AChE from

H. littorale. However, the same enzyme from other species, such as *C. macropomum*, *A. gigas*, *O. niloticus*, and *R. canadum* showed less susceptibility to this pesticide (Assis et al., 2010; Assis et al., 2012). These results suggest that the equilibrium between detoxification, which is promoted by oxonases (phosphotriesterases that hydrolyze OPs), carboxylesterases, BChE, and the biotransformation/bioactivation processes led by the *H. littorale* cytochrome P450 complex, is more displaced in *H. littorale* for the biotransformation of diazinon to diazoxon than in the other species mentioned. Since parathion-methyl dimethyl-OP is considered to be highly toxic (FAO, 2007), it is one of the most studied OPs and its inhibition is used as a standard for comparison with other OPs (Viegas Jr et al., 2004). The enzyme from *H. littorale* was more sensitive to methyl-parathion than the muscular AChE from *Cyprinus carpio* and also the AChEs from the visceral and gills of mollusk species, *Crassostrea rhizophorae* (Sato et al., 2007; Souza et al., 2018). After biotransformation to single paraoxon-methyl, Sato et al. (2007) described that the IC₅₀ of the *C. carpio* enzyme decreased approximately 1000 times, showing the effect of biotransformation on the inhibitory potential of OPs. This observation also suggested that after the same process is applied to the enzyme from *H. littorale*, under *in vivo* conditions, its susceptibility is even greater if the detoxifying complex does not prevent or reduce the access of the pesticide to the sites of inhibition. Chlorpyrifos is a diethyl-OP known to be harmful to the early development of the central nervous system (Rauh et al., 2006). However, in the present study, *H. littorale* AChE was found to be only moderately sensitive to this compound; it was more sensitive as compared to enzymes from *R. canadum* and *O. niloticus* only (Table 5). These results suggest that the balance between biotransformation and detoxification of this compound is shifted predominantly toward the detoxification processes. In addition, chlorpyrifos is one of the most lipophilic OPs, which makes it highly bioaccumulable in adipose tissues and other lipid-rich areas in the pathway until it interacts with the enzymes (Vale, 1998; Paudyal, 2008; Assis et al., 2011). In the present study, the AChE enzyme from *H. littorale* was inhibited only slightly by the pesticide, temephos. It is the most lipophilic dimethyl-OP that is known to have mild to moderate toxicity in non-target organisms. In the past, it has been widely used in public health campaigns to combat mosquito vectors, but its use was reduced mainly due to the development of resistance in the vectors (Antwi, 1987; WHO, 1986a; Melo-Santos et al., 2010; Diniz et al., 2014).

The CBs are anticholinesterase pesticides that do not require similar biotransformation to OPs to manifest their toxic potential. Generally, they require higher doses than the OPs to cause mortality since their interaction with AChE is less stable, and their link does not tend to

be irreversible as is the case for OPs (WHO, 1986b; Tham et al., 2009; Assis et al., 2011). They are particularly harmful to fish because of their greater solubility in water (as compared to OPs) and their slower metabolism in these organisms (Vassilieff e Ecobichon, 1982). The biotransformative processes through which CBs may pass are mostly based on oxidation and that produce sulphoxides and sulfone derivatives that have anticholinesterase activity as well. Among the carbamates used in the present study, aldicarb undergoes similar oxidation (Risher et al., 1987), but in our study, it showed a high inhibiting potential against the activity of AChE obtained from *H. littorale*. The other carbamates used in the present study (carbaryl and carbofuran) demonstrated greater inhibitory potential than aldicarb; however, they did not present IC₂₀ and IC₅₀ values below the limits of the current legislation: 1) CONAMA Resolution No. 357/2005 recommends a maximum concentration limit of 70.0 µg L⁻¹ ($\approx 0.35 \mu\text{mol.L}^{-1}$) for carbaryl in Class 3 of water (waters for domestic supply after conventional treatment, for livestock, and irrigation of forages); 2) the USEPA *National Primary Drinking Water Standards* (2017) guidelines recommend a maximum limit of 40 µg L⁻¹ ($\approx 0.18 \mu\text{M}$) for carbofuran .

Pesticides of the benzoylurea class, despite being primary inhibitors of chitin synthesis in arthropods, have been shown to be capable of inhibiting AChE in insects and fish (Maduenho e Martínez, 2008; Cottage e Gunning, 2004). The pesticide, novaluron, can interfere with the AChE activity by causing steric hindrance and by inhibiting the mobility of the active site cavity (Cottage e Gunning, 2004). In the present study, a weak inhibition of cholinesterase activity in *H. littorale* by the two pesticides, diflubenzuron and novaluron, was observed. In the case of diflubenzuron, the enzyme from *H. littorale* was more sensitive than the visceral AChE from *Crassostrea rhizophorae*, whereas the opposite observation was made for novaluron. This is the first report on the effect of benzoylurea-based pesticides on the activity of AChE in fish from the Siluriformes group. The effect of the peptide analog of the juvenile hormone, pyriproxyfen, on the cholinesterase activity in *H. littorale* was also evaluated. The classic mode of action of this pesticide is the deregulation of insect growth through the disruption of juvenile hormone signaling (Dhadialla et al., 1998; Hirano et al., 1998). There are no reports on the adverse effects of pyriproxyfen on AChE. However, in the present study, inhibition of 20% of the cerebral AChE activity in *H. littorale* was observed, when 1.04 µmol L⁻¹ of this compound was employed.

Several studies point to the influence of ions on the activity of AChE in several species, where ions have been reported to act in association with peripheral sites causing changes in the conformation and/or hydration state of the active site of the enzyme (Olson e Christensen, 1980; Tomlinson et al., 1981; Hughes e Bennett, 1985; Frasco et al., 2005; Frasco et al., 2007; Assis et al., 2015). Therefore, ions may interfere with the analysis of

pesticides, when AChE is being used as a biomarker or as a biosensor component. The effect of ions on AChE from each species and the concentration of these ions should be taken into account in the analysis of organophosphorus pesticides, carbamates, and other anticholinesterase agents (Assis et al., 2015). Of the ten ions whose effects on AChE from *H. littorale* were investigated, six had an inhibitory effect in decreasing order: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ especially mercury, whose IC_{50} value was 4.7 times smaller than that of the second most inhibitory ion (copper). Mercury almost completely inhibited the enzymatic activity at a concentration of 1 mM. The same effect was observed in the species, *Parachromis managuensis* (Araújo et al., 2016). Similarly, mercury was observed to be the major or at least one of the major inhibitory ions for this species *Arapaima gigas*, *Colossoma macropomum*, *Rachycentron canadum*, *Electrophorus electricus* e *Cichla ocellaris* (Assis et al., 2012; Silva et al., 2013). In previous studies, it has been shown that mercury can bind to -SH groups in the structure of AChE, but the enzyme evaluated in this study does not have such groups available for binding (disulfide bridges) in it, except for the enzyme from *Torpedo californica* (Valle e Ulmer, 1972; Mac-Phee-Quigley et al., 1986; Steinberg et al., 1990). Recent studies suggest that the Hg^{2+} ion may exert a mimetic effect that is similar to the effects exerted by other competitive inhibitors, even if it does not bind to the active site of the enzyme (Frasco et al., 2007; Assis et al., 2015).

Similar to the Hg^{2+} ion, according to Tomlinson et al (1981), Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , and Zn^{2+} also exert an inhibitory effect on AChE activity. The inhibitory effect exerted by these ions is varied: while Tomlinson et al. (1981) observed a 100% inhibition of the activity of AChE from *E. electricus* by Cu^{2+} and Zn^{2+} at a concentration of 1 mmol L^{-1} , Hughes and Bennett (1985) observed a 20% inhibition of the enzyme from the same species by Cu^{2+} at the same concentration. Bocquené et al. (1990) reported a 100% inhibition in two marine species (*Scomber scomber* and *Pleuronectes platessa*) exposed to 1 mmol L^{-1} of Cu^{2+} . Silva et al; (2013) found a similar sensitivity of AChE from *C. ocellaris* to Cu^{2+} and Zn^{2+} . Potentially, marked differences may be observed in the sensitivity of enzymes from *P. promelas*, *C. ocellaris*, and *P. managuensis* to Cd^{2+} and Pb^{2+} (Olson e Christensen, 1980; Silva et al., 2013; Araújo et al., 2016). In the present study, the AChE from *H. littorale* was observed to be more sensitive to Cu^{2+} , Cd^{2+} , and Pb^{2+} than that from the species mentioned above. The arsenic ion used in the present study was As^{3+} (from AsO_2^-), which exerts a greater inhibitory effect than As^{5+} , according to Olson and Christense (1980). These authors observed a 50% inhibition of the activity of AChE from *P. promelas*, when exposed to 0.03 mmol L^{-1} of As^{3+} , while Silva et al; (2013) found an IC_{50} of 0.1 mmol L^{-1} for *C. ocellaris*. In the present study, the IC_{50} recorded for As^{3+} was lower than that reported for *C. ocellaris*, whereas it was higher than that observed for *P. promelas*. Considering the data on AChE from *H. littorale*, as well as that from several other species that have already been characterized for detection of pesticides, it is necessary to take into account the concentrations of these ions

(As³⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺ e Zn²⁺) and, at the same time, to observe the potential of these enzymes to act as biomarkers of the mercury ion in areas associated to mining enterprises that may release this ion in water bodies.

5. Conclusion

Results based on substrate affinity and selective inhibition have shown that the predominant cholinesterase activity in the brain of *H. littorale* can be ascribed to AChE. The moderate thermostability of the enzyme suggests its use without losing activity easily. Among the pesticides studied here, the benzoylurea novaluron and the juvenile hormone analog pyriproxyfen moderately inhibited the enzymatic activity (first report in Siluriformes). The AChE from *H. littorale* was highly sensitive to dichlorvos at concentrations (IC₂₀ - IC₅₀) well below the maximum concentrations of this pesticide allowed by the current legislation. Thus, the AChE enzyme from *H. littorale* has a strong potential to function as a biomarker or sensor biocomponent for the presence of this OP in water impacted by agricultural activities and only undergoes ion interference at concentrations present in industrial effluents (before being diluted in nature). On the other hand, the enzyme also has the potential to function as a biomarker for the presence of mercury in such mining and industrial effluents.

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Diretoria de Gestão Ambiental (DGA) from Superintendencia de Infraestrutura da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) for the aid in capturing the specimens for the study. This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/RECARCINE), by the former Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) (today part of Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Petróleo do Brasil S/A (PETROBRAS).

References

ANTWI, L.A.K. (1987) Fish head acetylcholinesterase activity after aerial application of temephos in two rivers in Burkina Faso, West Africa. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 38:461–466.

ARAÚJO, M.C., ASSIS, C.R.D., SILVA, L.C., MACHADO, D.C., SILVA, K.C.C., LIMA, A.V.A., CARVALHO JR., L.B., BEZERRA, R.S., OLIVEIRA, M.B.M. (2016) Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. *Aquatic Toxicology*, 177: 188-189.

ASSIS, C.R.D.; LINHARES, A.G.; OLIVEIRA, V.M.; FRANÇA, R.C.P.; SANTOS, J.F.; MARCUSCHI, M.; MACIEL CARVALHO, E.V.M.; BEZERRA, R.S.; CARVALHO JR, L.B. (2014) Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish, *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 40, p. 1659-1668.

ASSIS, C.R.D.; CASTRO, P.F.; AMARAL, I.P.G.; MACIEL CARVALHO, E.V.M.; CARVALHO Jr, L.B., BEZERRA, R.S. (2010) Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 29, p. 2243–2248.

ASSIS, C.R.D.; BEZERRA, R.S.; CARVALHO Jr, L.B. (2011) Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: *Pesticides in modern world, Book 5 - Pests control and pesticides exposure and toxicity assessment*. Stoytcheva, M. (Ed). Intech, Rijeka, Croatia, 614 p.

ASSIS, C.R.D.; LINHARES, A.G.; OLIVEIRA, V.M.; FRANÇA, R.C.P.; MACIEL CARVALHO, E.V.M.; BEZERRA, R.S.; CARVALHO JR, L.B. (2012) Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Science of the Total Environment*, v. 441, p. 141–150.

ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANÇA, R.C.P., SANTOS, J.F., MARCUSCHI, M., MACIEL CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR, L.B. (2014) Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40, 1659-1668.

ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANÇA, R.C.P., SANTOS, J.F., MACIEL CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR, L.B. (2015) Effect of ions on the activity of brain acetylcholinesterase from tropical fish. *J. Coastal Life Medicine*, 3, 505-514.

AUGUSTINSSON, K.B. Comparative aspects of the purification and properties of cholinesterases. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 44, p. 81-89, 1971.

BOCQUENÉ, G., GALGANI, F., TRUQUET, P. (1990) Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 30: 75-89.

COTTAGE, E.L.A., GUNNING, R.V. (2004) Buprofezin and novaluron inhibit acetylcholinesterase activity in B-biotype *Bemisia tabaci*. in: Silman, I.; Soreq, H., Anglister, L., Michaelson, D., Fisher, A., 2004. *Cholinergic Mechanisms*. CRC Press, New York.

DAI, Y.-J. et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 33, n. 1, p. 11-17, 2014. ISSN 1552-8618. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2406>

DHADIALLA, T.S., CARLSON, G.R., LE, D.P. (1998) New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Reviews of Entomology*, 43: 545–569.

DINIZ, M.M.C.S.L., HENRIQUES, A.D.S., LEANDRO, R.S., AGUIAR, D.L., BESERRA, E.B. (2014) Resistance of *Aedes aegypti* to temephos and adaptive disadvantages. *Revista de Saúde Pública*. 48, 775–782.

EDDLESTON, M., SZINICZ, L., EYER, P., BUCKLEY, N. (2002) Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. *Q J Med*, 95:275-83.

FANG, Z., ZHANG, J., LIU, B., JIANG, L., DU, G., CHEN, J. (2014) Cloning, heterologous expression and characterization of two keratinases from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1. *Process Biochem* 49: 647–654.

FANG, Z., ZHANG, J., LIU, B., DU, G., CHEN, J. (2016) Enhancement of the catalytic efficiency and thermostability of *Stenotrophomonas* sp. Keratinase KerSMD by domain exchange with KerSMF. *Microbial Biotechnology*, 9, 35–46.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Pesticides in food report 2007. FAO plant production and protection paper 191. Rome, 2007.

FERSHT, A. (1999) Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, W. H. Freeman and Company, New York.

FRASCO, M.F., FOURNIER, D., CARVALHO, F., GUILHERMINO, L. (2005) Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10: 360-375.

FRASCO, M.F., COLLETIER, J.P., WEIK, M., CARVALHO, F., GUILHERMINO, L. (2007) Stojan J, et al. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *FEBS Journal*, 274: 1849-1861.

FUXREITER, M., WARSHEL, A. Origin of the catalytic power of acetylcholinesterase: computer simulation studies. *Journal of the American Chemical Society*, v. 120, p. 183-194, 1998.

GALLO, D., MERENDINO, A., KEIZER, J., VITTOZZI, L. (1995) Acute toxicity of two carbamates to the Guppy (*Poecilia reticulata*) and the Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *The Science of the Total Environment*, 171: 131-136.

GHAZALA.; MAHBOOB, S.; AHMAD, L.; SULTANA, S.; ALGHANIM, K.; AL-MISNED, F.; AHMAD, Z. Fish Cholinesterases as Biomarkers of Sublethal Effects of Organophosphorus and Carbamates in Tissues of *Labeo Rohita*. *J Biochem Molecular Toxicology* DOI 10.1002/jbt.2014.

GNAGEY, A.L., FORTE, M., ROSENBERRY, T.L. (1987) Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. *J Biol Chem* 262:13290–13298.

GRIGORIEVA, G.M. (1973) Propionylcholinesterase in the nervous ganglia of the freshwater pulmonate mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Comp Biochem Physiol A* 44:1341–1352.

HIRANO, M., HATAKOSHI, M., KAWADA, H., TAKIMOTO, Y. (1998) Pyriproxyfen and other juvenile hormone analogues. *Reviews in Toxicology* 2: 357–394.

HOSTACHE, G.; MOL, J.H. (1998) Reproductive biology of the neotropical armoured catfish *Hoplosternum littorale* (Siluriformes - Callichthyidae): a synthesis stressing the role of the floating bubble nest. *Aquatic Living Resource*, v. 11, 173-185.

HUGHES, R.J., BENNETT, J. (1985) Effect of metal ions on the activity of acetylcholinesterase. *Biochemical Society Transactions*, 13: 219-220.

KARCZMAR, A. (1998) Anticholinesterases: dramatic aspects of their use and misuse. *Neurochemistry International*, 32: 401-411.

KELLAR, K.J. (2006) Overcoming inhibitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:13263–13264.

MACPHEE-QUIGLEY, K., VEDVICK, T.S., TAYLOR, P., TAYLOR, S.S. (1986) Profile of the disulfide bonds in acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 13565-13570.

MADUENHO, L.P., MARTINEZ, C.B.R. (2008) Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 148, 265–272.

MELO-SANTOS, M.A., VARJAL-MELO, J.J., ARAÚJO, A.P., GOMES, T.C., PAIVA, M.H., REGIS, L.N., FURTADO, A.F., MAGALHÃES, T., MACORIS, M.L., ANDRIGHETTI, M.T., AYRES, C.F. (2010) Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica*, 113, 180-189

MILLER, B.G., WOLFENDEN, R. (2002) Catalytic proficiency: the unusual case of OMP decarboxylase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 847–885.

MOHAMED, M.A., ABDEL-GAWAD, A.S., GHAZY, A.E.M. (2007) Purification and characterization of an acetylcholinesterase from the infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 146, 314–324.

NIGAM, A.K., SRIVASTAVA, N., RAI, A.K., KUMARI, U., MITTAL, A.K., MITTAL, S. The first evidence of cholinesterase in skin mucus of carps and its applicability as biomarker of organophosphate exposure. *Environmental Toxicology*. Doi 10.1002/tox.2012.

NOLTE, H.J., ROSENBERRY, T.L., NEUMANN, E. (1980) Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands. *Biochem.* 19, 3705–3711.

NRA. NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY. 2002. The NRA review of diazinon. NRA Draft Chemistry v. 2. National Registration Authority, Canberra. Australia.

NUNES, B., BARBOSA, A.R., ANTUNES, S.C., GONÇALVES, F. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. *Environ Sci Pollut Res* 21:6258–6262. 2014.

OLSON, D.L.; CHRISTENSEN, G.M. (1980) Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro). *Environmental Research*, 21: 327-335.

ORFINGER, A.B. (2015) Selected population characteristics of the non-native catfish *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) in central Florida, USA. *Intl. J. Aquat. Biol.* 3(4):258-262.

PAUDYAL, B.P. (2008) Organophosphorus poisoning. *J Nepal Med Assoc.* 47: 251-258.

PEZZEMENTI L, CHATONNET A (2010) Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. *Chem-Biol Interact* 187:27–33.

PINHEIRO, D.A., DIAS, M.T., DIAS, M.K.R., SANTOS, E.F., MARINHO, R.G.B. Primeiro registro da ocorrência de protozoários em Tamoatá *Hoplosternum littorale* no Brasil. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 39(2): 169 – 177, 2013 69

RAUH, V.A., GARFINKEL, R., PERERA, F.P., ANDREWS, H.F., HOEPNER, L., BARR, D.B., WHITEHEAD, R., TANG, D., WHYATT, R.W. (2006) Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics*. 118: 1845-1859.

RISHER, F.L., MINK, F.L., STARA, J.F. (1987) The toxicologic effects of the carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. *Environmental Health Perspectives*, 72: 267–281.

ROSENBERRY, T.L. (1975) Acetylcholinesterase. *Advances in enzymology and related areas.* Mol Biol 43:103–218.

SALVADOR-JR; SILVA.F.A. Actinopterygii, Siluriformes, Callichthyidae, *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828): Distribution extension in the upper São Francisco River region, southeast Brazil. Check List | Volume 7 | Issue 5 | ISSN 1809-127X (online edition), 2011.

SATO, R.; MITANI, K.; MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, S.; YAMADA, R-H; KERA, Y. (2007) Effects of insecticides in vitro on acetylcholinesterase purified from body muscle of koi carp (*Cyprinus carpio*). Japanese Journal of Environmental Toxicology, 10: 31-38.

SILVA, K.C.C.; ASSIS, C.R.D.; OLIVEIRA, V.M.; CARVALHO JR, L.B.; BEZERRA, R.S. (2013) Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. Aquatic Toxicology, 126, 191-197.

SILVA, F.A et al. Genomic Organization Under Different Environmental Conditions: *Hoplosternum Littorale* as a Model. Zebrafish Volume 13, n° 3, Doi: 10.1089/zeb.2015.1237. 2016.

SOUZA, P.R. et al. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. Aquatic Toxicology 109–121.<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.008>. 2018.

STEINBERG, N., ROTH, E., SILMAN, I. (1990) Torpedo acetylcholinesterase is inactivated by thiol reagents. Biochemistry International, 21: 1043-1050.

TALESA, V., CONTENTI, S., MANGIABENE, C., PASCOLINI, R., ROSI, G., PRINCIPATO, G.B. (1990) Propionylcholinesterase from *Murex brandaris*: comparison with other invertebrate cholinesterases. Comp Biochem Physiol C 96:39–43.

THAM, L.G., PERUMAL, N., SYED, M.A., SHAMAAN, N.A., SHUKOR, M.Y. (2009) Assessment of *Clarias batrachus* as a source of acetylcholinesterase (AChE) for the detection of insecticides. Journal of Environmental Biology, 30, 135–138.

TOMLINSON, G., MUTUS, B., MCLENNAN, I. (1981) Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. Canadian Journal of Biochemistry, 59: 728-735.

TÕUGU, V. (2001) Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents, 1:155-170.

VALE, J.A. (1998) Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicol. Let.* 102-103: 649-652.

VALLE, B.L., ULMER, D.D. (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annual Review of Biochemistry*, 41: 91-128.

VASSILIEFF, I.; ECOBICHON, D.J. (1982) Stability of Matacil[®] in aqueous media as measured by changes in anticholinesterase potency. *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology*. 29: 366-370.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos à fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Química Nova*, v. 27, p. 655-660, 2004.

WHO (1986a). Organophosphorus insecticides: a general introduction. *Environmental Health Criteria* 63. Geneva, CH.

WHO (1986b). Carbamate insecticides: a general introduction. *Environmental Health Criteria* 64. Geneva, CH.

Tables

Table 1 – Kinetic and physicochemical parameters of AChE of several species of fish.

Species	K _m (mM)	V _{max} (U/mg protein)	pH	T(°C)	Reference
<i>Hoplosternum littorale</i>	1.47 ± 1.08	0.695 ± 0.01	8.0	30	Present work
<i>Hoplosternum littorale</i>	1.91 ± 2.99	0.177 ± 0.007	-	-	Present work
<i>Parachromis managuensis</i>	0.587 ± 0.95	0.529 ± 0.98	8.0	35	Araújo et al., 2016
<i>Cichla ocellaris</i>	0.769 ± 0.27	0.189 ± 0.04	8.0	45	Silva et al., 2013
<i>Oreochromis niloticus</i>	0.39 ± 0.20	0.218 ± 0.007	8.0	35	Assis et al., 2012
<i>Oreochromis niloticus</i>	0.10 ± 0.03	0.229 ± 0.014	-	-	Rodríguez-Fuentes e Gold-Bouchot, 2004
<i>Pleuronectes vetulus</i>	1.69 ± 0.26	0.482 ± 0.034	-	-	Rodríguez-Fuentes et al., 2008
<i>Pleuronichtis verticalis</i>	0.30 ± 0.07 ^a 0.23 ± 0.06 ^b	0.524 ± 0.032 ^a 0.120 ± 0.08 ^b	-	-	Rodríguez-Fuentes et al., 2008
<i>Solea solea</i>	-	-	7.5	-	Bocquené et al., 1990
<i>Pleuronectes platessa</i>	-	-	8.5	33	Bocquené et al., 1990
<i>Scomber scomber</i>	-	-	8.0	-	Bocquené et al., 1990
<i>Colossoma macropomum</i>	0.43 ± 0.02	0.129 ± 0.05	7.5-8.0	45	Assis et al., 2010
<i>Arapaima gigas</i>	0.42 ± 0.09	0.116 ± 0.002	8.0	45	Assis et al., 2012
<i>Electrophorus electricus</i> ^e	0.45 ± 0.11 ^c 0.08 ± 0.1 ^d	67.82 ± 1.98 ^c 52.29 ± 6.6 ^d	-	-	Assis et al., 2012
<i>Rachycentron canadum</i>	0.43 ± 0.14	0.243 ± 0.02	8.0	35	Assis et al., 2012

a - Female specimens; b - Male specimens; - not determined; c - Hyperbola model; d - Two-site binding model; e - Obtained from Sigma. (-) not determined; * - PChE-like activity

Table 2 – Inhibition parameters relative to selective inhibitors of ChEs

Inhibitor	IC₂₀ ($\mu\text{mol/L}$)	IC₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	K_i ($\mu\text{mol/L}$)
BW284c51	0.26	1.96	1.84×10^{-2}
Iso-OMPA	0.42	4.83	3.50×10^{-2}
Eserine	0.12	0.20	1.45×10^{-3}
Neostigmine	0.16	0.34	2.47×10^{-3}

Table 3 – Renewal number (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat} / K_m) of several species.

Species	k_{cat} (s⁻¹)	k_{cat}/K_m (M⁻¹s⁻¹)	Reference
<i>Hoplosternum littorale</i>	8.10×10^3	5.50×10^6	Present work
<i>Oreochromis niloticus</i>	1.55×10^4	3.97×10^7	Assis et al., 2014
<i>Colossoma macropomum</i>	1.29×10^4	2.30×10^7	Assis et al., 2014
<i>Arapaima gigas</i>	1.04×10^4	2.47×10^7	Assis et al., 2014
<i>Rachycentron canadum</i>	1.84×10^4	4.20×10^7	Assis et al., 2014
<i>Electrophorus electricus</i>	-	10^9	Nolte et al., 1980
<i>Electrophorus electricus</i>	1.4×10^4	10^9	Fersht, 1980
<i>Electrophorus electricus</i>	1.2×10^4	-	Augustinsson, 1981
Computational simulation	1.6×10^4	-	Fuxreiter and Warshel, 1998
-	-	1×10^7	Miller and Wolfenden, 2002

Table 4 – Activation energy (AE) in the reactions between AChE of several species and the substrate acetylthiocholine (ASCh) and their respective rate enhancements.

Species	AE AChE-ASCh (kcal.mol ⁻¹)	Rate enhancement (10 ^x)	Reference
<i>H. littorale</i>	8.338	10 ⁶	Present work
<i>C. macropomum</i>	8.0646	10 ⁶	Assis et al., 2014
<i>A. gigas</i>	7.0858	10 ⁷	Assis et al., 2014
<i>R. canadum</i>	7.4937	10 ⁷	Assis et al., 2014
<i>O. niloticus</i>	11.5772	10 ⁴	Assis et al., 2014
<i>H. bacteriophora</i>	9.0	-	Mohamed et al., 2007
<i>E. electricus</i>	-	>10 ⁸	Tõugu, 2001
Computational simulation	10.0	10 ⁷ -10 ¹¹	Fuxreiter and Warshel, 1998
Non-enzymatic reaction	17.3637	10 ⁰	Assis et al., 2014

(-) not determined.

Table 5 – Inhibition parameters for some pesticides of the classes of organophosphates, carbamates and benzoylureas under the same experimental conditions of exposure.

Pesticide Species	IC ₂₀ (µmol/L)	IC ₅₀ (µmol/L)	ki (µmol/L)	Reference
Dichlorvos				
<i>Hoplosternum littorale</i>	0.148	0.39	3.70 x 10 ⁻³	Present work
<i>Colossoma macropomum</i>	0.0036	0.04	1.37 x 10 ⁻⁴	Assis et al. (2012)
<i>Arapaima gigas</i>	0.14	2.32	7.92 x 10 ⁻³	Assis et al. (2012)
<i>Rachycentron canadum</i>	3.57	6.9	1.36 x 10 ⁻²	Assis et al. (2012)
<i>Oreochromis niloticus</i>	0.81	5.4	3.26 x 10 ⁻²	Assis et al. (2012)
<i>Cichla ocellaris</i>	4.03	5.52	6.76 x 10 ⁻²	Silva et al. (2012)

<i>Electrophorus electricus</i> ▲	0.009	0.16	1.16×10^{-3}	Assis et al. (2012)
Diazinon				
<i>Hoplosternum littorale</i>	0.26	1.94	1.41×10^{-2}	Present work
<i>Colossoma macropomum</i>	6.80	-	-	Assis et al. (2012)
<i>Arapaima gigas</i>	0.092	1.5×10^3	0.51×10^1	Assis et al. (2012)
<i>Rachycentron canadum</i>	189.4	-	-	Assis et al. (2012)
<i>Oreochromis niloticus</i>	25.69	-	-	Assis et al. (2012)
<i>Cichla ocellaris</i>	182.57	2.9×10^3	3.63×10^1	Silva et al. (2012)
<i>Electrophorus electricus</i> ▲	0.002	0.3	2.18×10^{-3}	Assis et al. (2012)
Chlorpyrifos				
<i>Hoplosternum littorale</i>	1.56	14.8	1.07×10^1	Present work
<i>Colossoma macropomum</i>	0.45	7.6	2.61×10^{-2}	Assis et al. (2012)
<i>Arapaima gigas</i>	0.34	7.87	2.69×10^{-2}	Assis et al. (2012)
<i>Rachycentron canadum</i>	10.52	30.24	5.94×10^{-2}	Assis et al. (2012)
<i>Oreochromis niloticus</i>	17.17	26.78	1.61×10^1	Assis et al. (2012)
<i>Cichla ocellaris</i>	2.17	10.13	1.2×10^{-1}	Silva et al. (2012)
<i>Electrophorus electricus</i> ▲	0.002	0.03	2.18×10^{-4}	Assis et al. (2012)
Temephos				
<i>Hoplosternum littorale</i>	32.9	-	-	Present work
<i>Colossoma macropomum</i>	-	-	-	Assis et al. (2012)
<i>Arapaima gigas</i>	0.81	-	-	Assis et al. (2012)
<i>Rachycentron canadum</i>	67.57	-	-	Assis et al. (2012)
<i>Oreochromis niloticus</i>	-	-	-	Assis et al. (2012)
<i>Cichla ocellaris</i>	-	-	-	Silva et al. (2012)
<i>Electrophorus electricus</i> ▲	2.31	7.6	5.51×10^{-2}	Assis et al. (2012)

Pesticide	IC ₂₀	IC ₅₀	ki	Reference
Species	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	
Methyl-parathion				
<i>Hoplosternum littorale</i>	1.08	2.56	1.86×10^{-2}	Present work
<i>Cyprinus carpio</i>	-	602.5	-	Sato et al. (2007)
<i>Cyprinus carpio</i> *	-	0.60	-	Sato et al. (2007)

<i>Crassostrea rhizophorae</i> (gills)	11.0	1600	3.34×10^1	Souza et al. (2018)
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (viscera)	0.60	55.0	3.80×10^{-1}	Souza et al. (2018)

Carbaryl

<i>Hoplosternum littorale</i>	0.49	2.02	1.89×10^{-2}	Present work
<i>Colossoma macropomum</i>	3.87	33.8	1.16×10^{-1}	Assis et al. (2012)
<i>Arapaima gigas</i>	1.44	12.25	4.18×10^{-2}	Assis et al. (2012)
<i>Rachycentron canadum</i>	3.13	8.31	1.63×10^{-2}	Assis et al. (2012)
<i>Oreochromis niloticus</i>	2.78	9.20	5.55×10^{-2}	Assis et al. (2012)
<i>Cichla ocellaris</i>	1.18	4.41	5.4×10^{-2}	Silva et al. (2012)
<i>Electrophorus electricus</i> [▲]	nd	nd	-	Assis et al. (2012)

Carbofuran

<i>Hoplosternum littorale</i>	0.44	0.87	8.23×10^{-3}	Presente work
<i>Colossoma macropomum</i>	0.036	0.92	3.15×10^{-3}	Assis et al. (2012)
<i>Arapaima gigas</i>	0.12	0.75	2.56×10^{-3}	Assis et al. (2012)
<i>Rachycentron canadum</i>	0.031	0.082	1.61×10^{-4}	Assis et al. (2012)
<i>Oreochromis niloticus</i>	0.04	0.19	1.15×10^{-3}	Assis et al. (2012)
<i>Electrophorus electricus</i> [▲]	0.0009	0.005	3.63×10^{-5}	Assis et al. (2012)
<i>Cichla ocellaris</i>	0.082	0.21	2.57×10^{-3}	Silva et al. (2012)
<i>Parachromis managuensis</i>	0.14	0.28	2.63×10^{-3}	Araújo et al. (2016)

Aldicarb

<i>Hoplosternum littorale</i>	1.35	8.28	7.77×10^{-2}	Present work
-------------------------------	------	------	-----------------------	--------------

* AChE of muscle tissue exposed to paraoxon-methyl (Sato et al., 2007)
(-) not determined.

Pesticide	IC ₂₀	IC ₅₀	K _i	Reference
Species	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	
Diflubenzuron				
<i>Hoplosternum littorale</i>	820.0	-	-	Present work
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (gills)	-	-	-	Souza et al. (2018)
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (viscera)	1350	-	-	Souza et al. (2018)
Novaluron				
<i>Hoplosternum littorale</i>	280	0.99×10^3	0.93×10^{-1}	Present work
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (gills)	8.0	-	-	Souza et al. (2018)
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (viscera)	91.0	-	-	Souza et al. (2018)

Pyriproxyfen

<i>Hoplosternum littorale</i>	1.04	-	-	Present work
-------------------------------	------	---	---	--------------

▲ Commercial Enzyme Sigma-Aldrich.

(-) not determined.

Table 6 – Inhibition parameters related to ions that exert significant inhibitory effect on some fish species.

Species	<i>C. ocellaris</i>		<i>P. managuensis</i>		<i>H. littorale</i>	
	IC ₅₀ (mM)	K _i (μM)	IC ₅₀ (mM)	K _i (μM)	IC ₅₀ (mM)	K _i (μM)
Íons						
Cd²⁺	6.14	36.4	3.65	3.43 x 10 ¹	0.081	7.6 x 10 ⁻¹
Cu²⁺	2.1	12.5	0.77	7.25	0.061	5.8 x 10 ⁻¹
Hg²⁺	0.22	1.34	0.01	1.22 x 10 ¹	0.013	1.2 x 10 ⁻¹
Zn²⁺	2.57	15.3	12.96	1.22 x 10 ²	4.575	4.3 x 10 ¹
Pb²⁺	-	-	-	-	2.956	2.7 x 10 ¹
As³⁺	0.1	0.59	-	-	0.088	8.31 x 10 ⁻¹

The data of *C. ocellaris* come from Silva et al. (2013) and *P. managuensis* data are from Araújo et al. (2016).

(-) not determined.

Figure Captions

Figure 1 – Michaelis-Menten kinetics of the ChE from brain of *H. littorale* using the substrates acetylthiocholine (ASCh - $\bigcirc$) and propionylthiocholine (PSCh - $\triangle$).

Figure 2 – Effect of pH (A), temperature (B) on the brain AChE activity of *H. littorale* and thermal stability of the enzyme (C).

Figure 3 – Effect of selective inhibitors on the brain AChE activity of *H. littorale*.

Figure 4 - Effect of pesticides on the brain AChE activity of *H. littorale*.

Figure 5 - Effect of ions on the brain AChE activity of *H. littorale*.

Figure 1

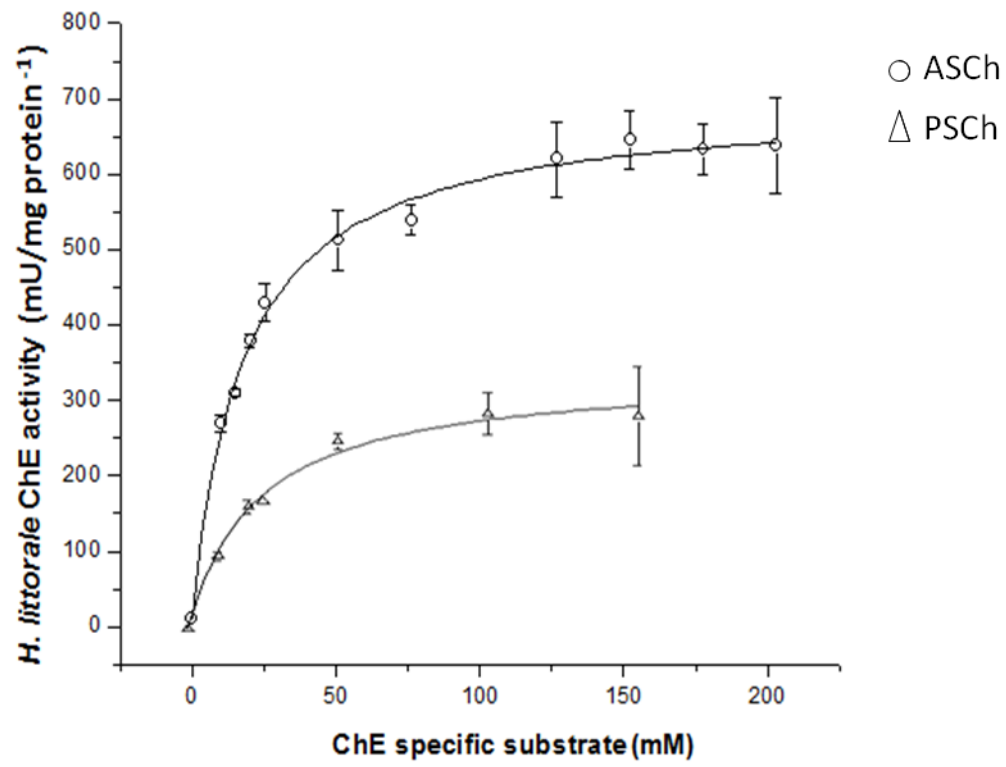


Figure 2

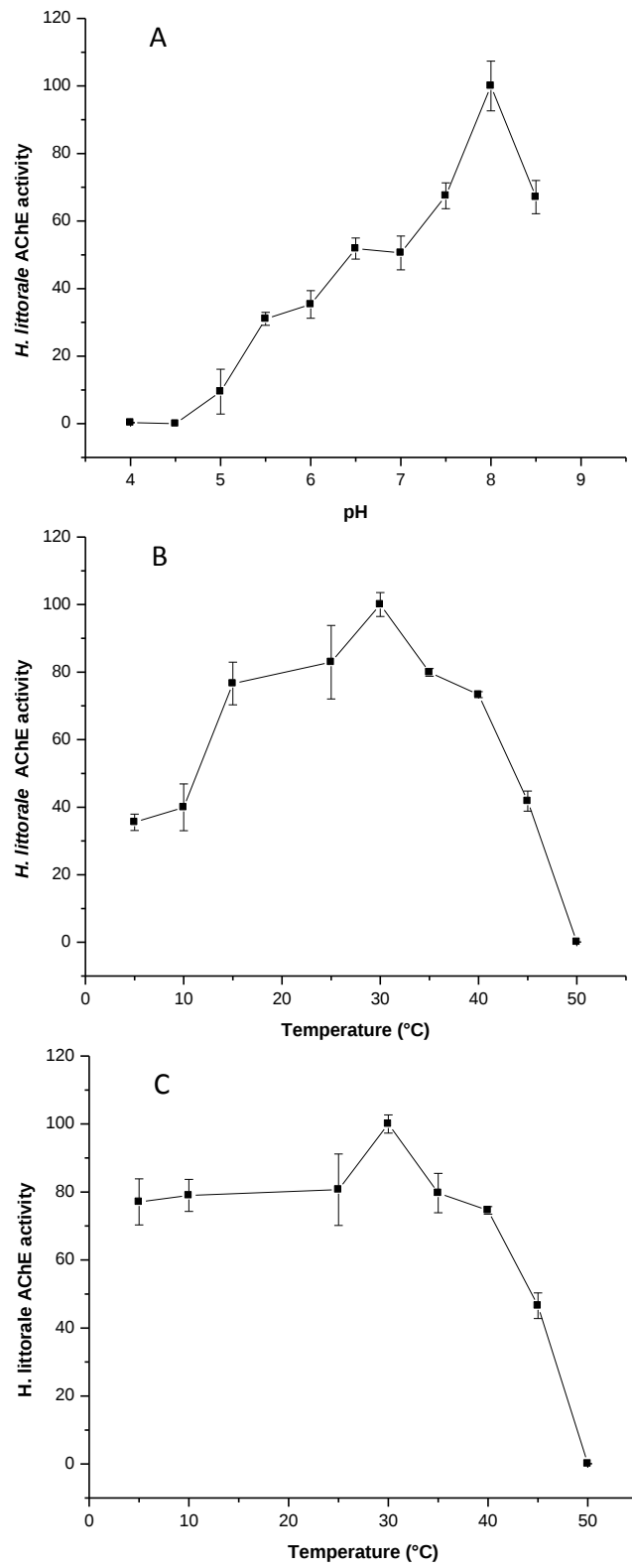


Figure 3

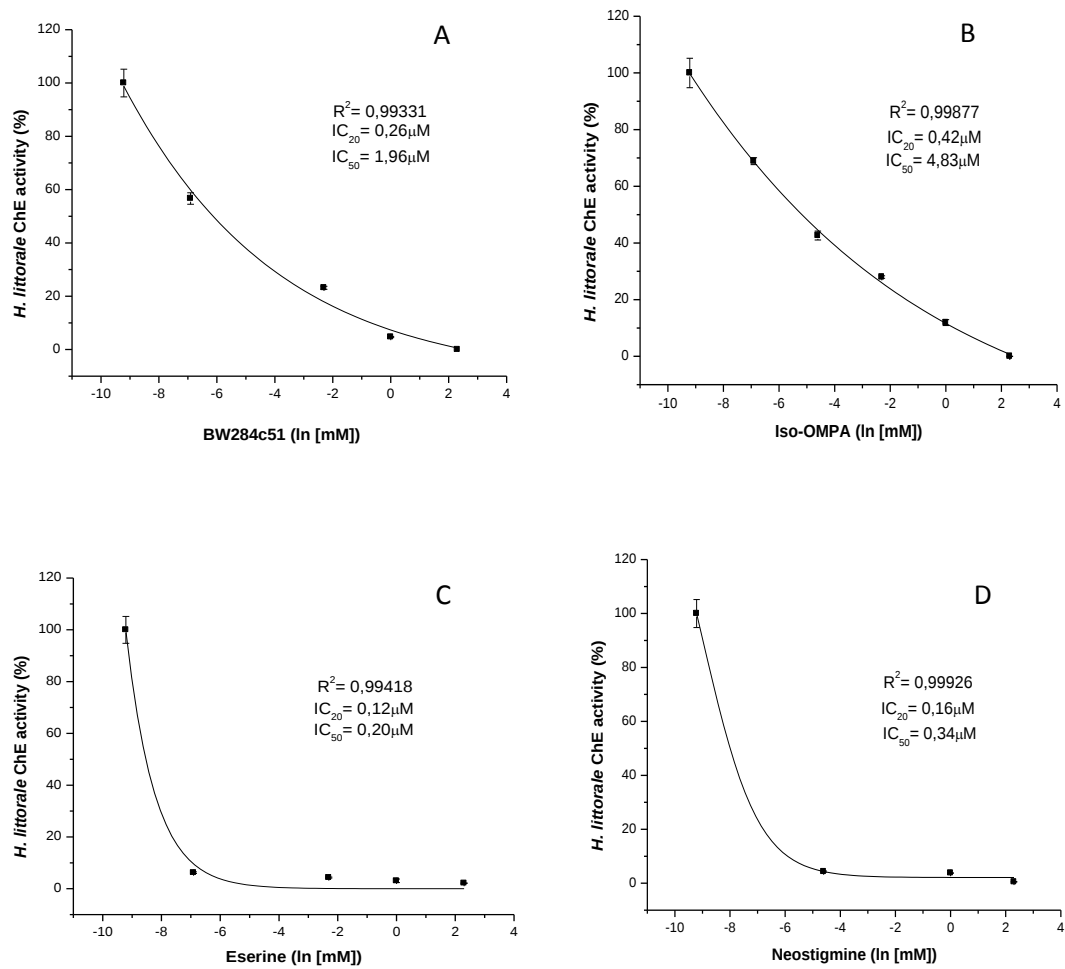
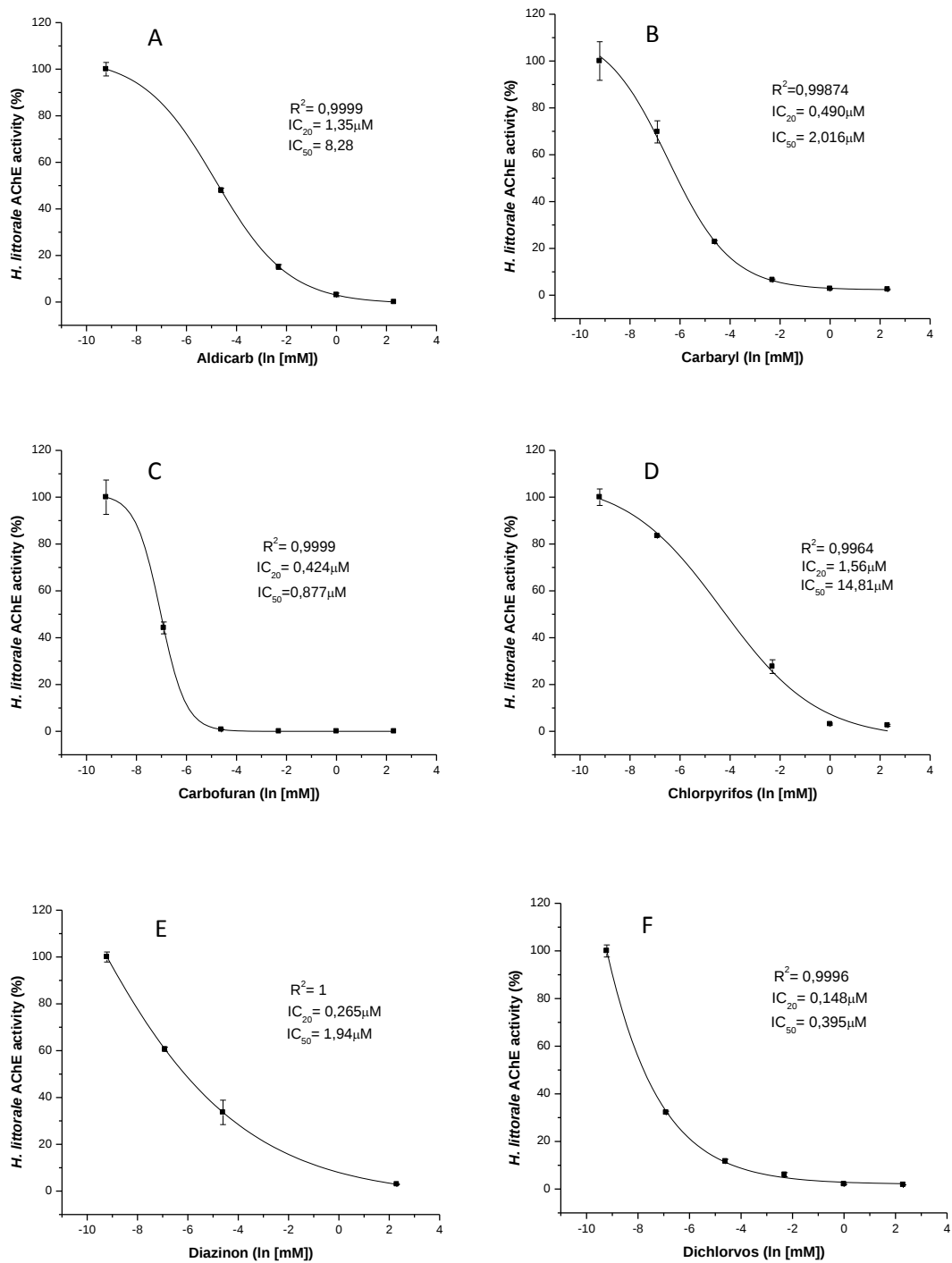


Figure 4



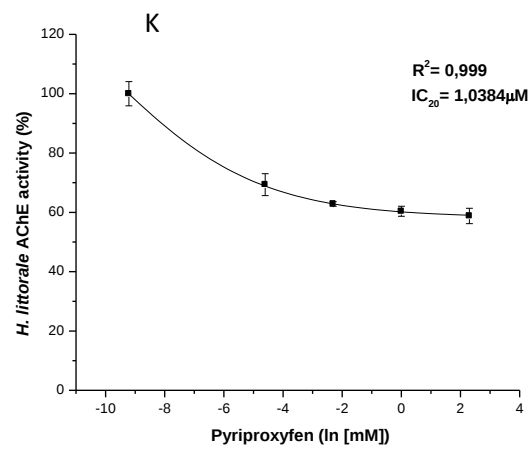
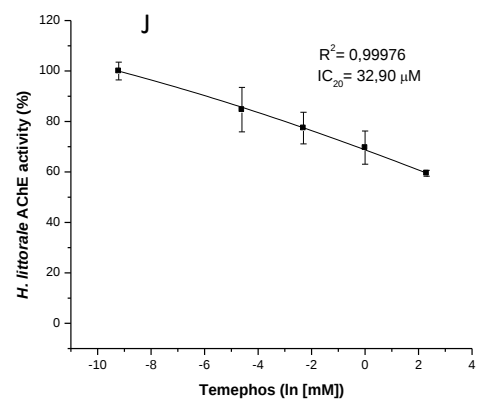
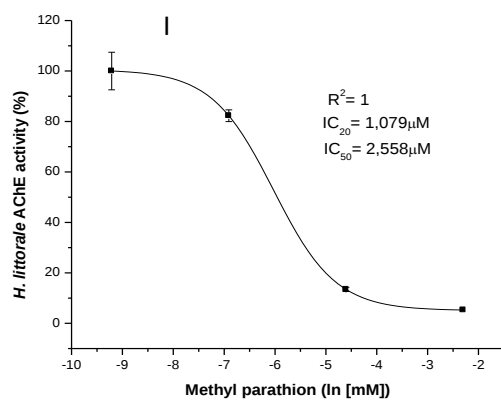
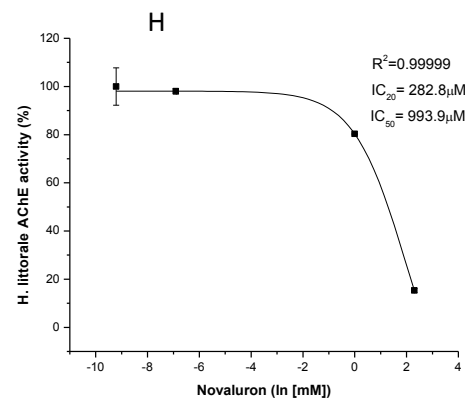
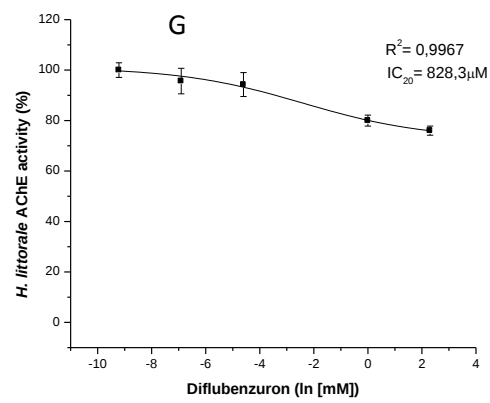
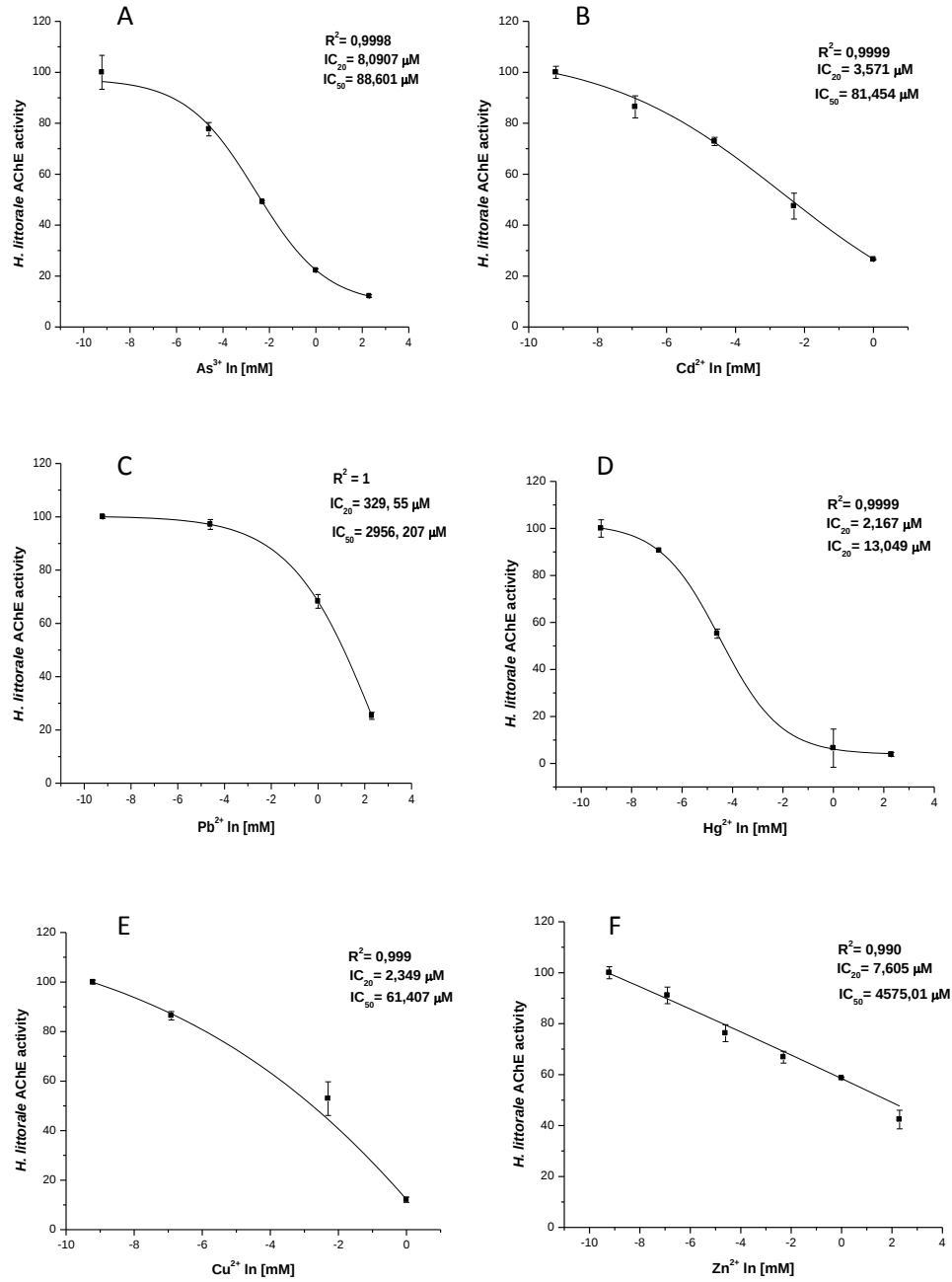
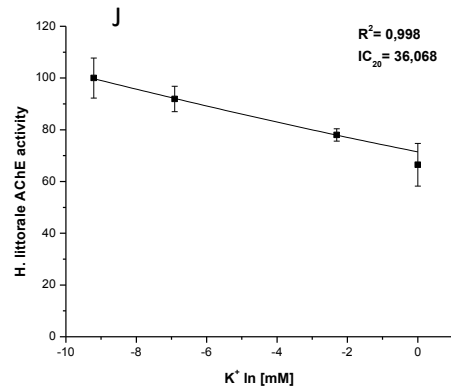
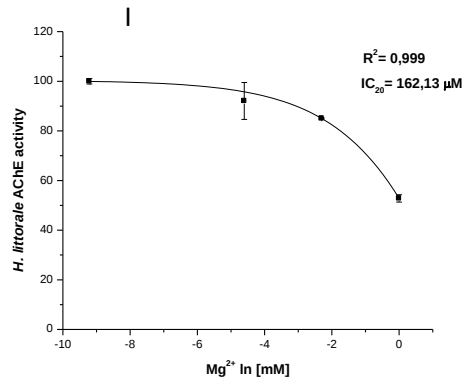
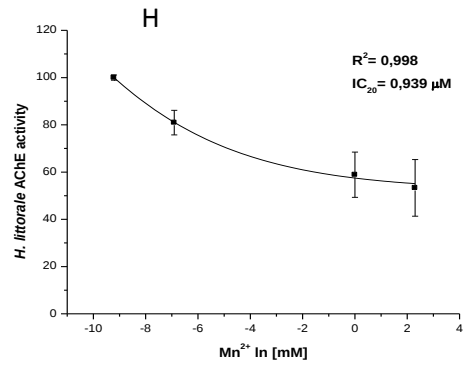
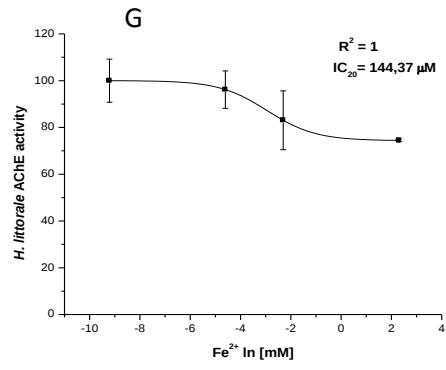


Figure 5



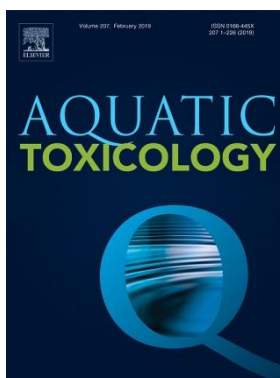


5. CAPÍTULO II

Efeitos genotóxicos em *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) exposto ao impacto antrópico em um riacho urbano no nordeste do Brasil

Artigo a ser submetido à revista

Aquatic toxicology



Qualis: A1

ISSN: 0166-445x

Fator de Impacto: 3,794

Efeitos genotóxicos em *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) exposto ao impacto antrópico em um riacho urbano no nordeste do Brasil

Marlyete Chagas de Araújo¹; Caio Rodrigo Dias de Assis¹; Kelma Sirleide de Souza¹; Kaline Catiely Campos Silva²; Anderson Rodrigues Balbino Lima¹; Ana Vitória de Araújo Lima¹; Luciano Clemente Silva¹; Valdir Luna da Silva³; Luiz Bezerra de Carvalho Junior⁴; Mônica Lúcia Adam⁵; Ranilson de Souza Bezerra¹; Maria Betânia Melo de Oliveira¹.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Educação, Colegiado de Biologia, Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Paulo Afonso, BA, Brasil

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brasil

⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil

⁵Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Centro Acadêmico de Vitória, PE, Brasil.

RESUMO

O riacho Cavouco é um afluente do rio Capibaribe – um dos principais rios do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil) – e ao longo do seu percurso recebe descargas de resíduos químicos, hospitalares e domésticos, os quais podem induzir alterações genéticas que prejudicam a adaptabilidade e ameaçam a sobrevivência das espécies que nele habitam. Este trabalho teve como objetivo realizar o biomonitoramento de um riacho urbano (riacho Cavouco) usando biomarcadores genotóxicos (ensaio cometa, teste de micronúcleos e anormalidades nucleares) de *Hoplosternum littorale*. Coletas semestrais foram realizadas durante os anos de 2015 e 2016 em três pontos (P1, P2, P3) deste riacho, em períodos de chuva e de estiagem. Os espécimes do grupo controle foram coletados nesse ambiente e depurados por 35 dias em aquários com água limpa e aeração constante. Os animais foram anestesiados e após sedação o sangue foi coletado para realização dos ensaios. Altos índices de danos e frequências de danos ao DNA foram constatados em relação aos espécimes controle ($ID_{2015} = 4,03x$; $FD\%_{2015} = 2,45x$; $ID_{2016} = 5,46x$; $FD\%_{2016} = 2,46x$) em todos os períodos analisados. No que se refere ao teste de micronúcleo (MN), o ponto P3 (à jusante dos demais e com predomínio de efluentes hospitalares) foi o único que não apresentou diferença significativa em relação ao controle, todavia foi o ponto que mais diferiu em termos de anormalidades nucleares (AN). A quantificação de AN resultou na seguinte ordem: $P3 > P1 > P2$. Os dados aqui apresentados confirmam que o ecossistema analisado encontra-se impactado em nível genotóxico e demonstram a eficiência dos métodos utilizados, os quais

podem contribuir para auxiliar no monitoramento e controle da poluição em outros riachos urbanos.

Palavras - Chave: Biomarcador; Monitoramento Ambiental; Testes de Genotoxicidade; Poluição.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação de ecossistemas aquáticos por influência da ação antrópica resulta em danos muitas vezes irreversíveis para os organismos que habitam esses ambientes, uma vez que uma vasta classe de poluentes tem potencial genotóxico e mutagênico que induzem modificações químicas na molécula de DNA (BOLOGNESI e HAYASHI, 2011). Estas alterações podem ser prejudiciais a processos vitais das células, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica (SILVA et al., 2016). Danos genômicos desse tipo podem ser visualizados por meio do ensaio cometa (EC), anormalidades nucleares (AN) e teste de micronúcleos (MN). Tais metodologias são capazes de detectar desde microlesões no DNA (lesões pré-mutagênicas passíveis de reparo), no caso do ensaio cometa (SCALON, et al., 2010; PALANIKUMAR e PANNEERSELVAM, 2011) até macrolesões no genoma (lesões provocadas por substâncias que induzem quebra cromossômica), evidenciadas pelo teste do micronúcleo, as quais estão associadas, respectivamente, aos efeitos de exposições em curto e longo prazo (AHMED et al., 2011).

Biomarcadores genotóxicos tem sido amplamente recomendados em estudos de biomonitoramento ambiental, dada sua capacidade de avaliar qualitativamente a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos que induzem alterações importantes no organismo (ADAM et al., 2010; ANSARI et al., 2011; PINHEIRO et al., 2013; THOMÉ et al., 2016; BRAHAM, 2017; SILVA et al., 2017). São testes muito utilizados no campo da genética toxicológica por serem simples, rápidos e de detecção sensível das alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas (GUTIERREZ et al., 2014; SOUZA et al., 2016; HUSSAIN, 2017; LIMA et al., 2019).

Os peixes têm sido frequentemente empregados como indicadores biológicos da qualidade dos ecossistemas aquáticos por serem capazes de metabolizar xenobióticos e bioacumular contaminantes presentes na água ou no sedimento que, mesmo em baixas concentrações são capazes de afetar suas funções fisiológicas (NIGAN et al., 2012; NUNES et al., 2014; WANG et al., 2015; JAVED et al., 2016; HUSSAIN, 2017; LIMA et al., 2019).

Além disso, os peixes são organismos adequados às análises de genotoxicidade uma vez que possuem hemácias nucleadas, facilitando a visualização de micronúcleos e anomalias nucleares (BRAHAM, 2017).

Poucas espécies de peixes conseguem sobreviver em ambientes altamente poluídos. Uma das espécies que possui esta capacidade é o *Hoplosternum littorale* – um peixe bentônico, que geralmente é encontrado em fundos lamacentos de riachos, igarapés, lagoas e pequenos rios. Este peixe, popularmente conhecido como tamoatá, tem como principal característica a capacidade de usar o intestino como órgão acessório para a respiração aérea, o que lhe permite sobreviver em diferentes ambientes, incluindo áreas com níveis críticos de oxigênio dissolvido (SALVADOR-JR e SILVA, 2011; PINHEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2016). O tamoatá é uma espécie não migratória de ampla distribuição (encontrado em toda a América Latina), que não se encontra ameaçada ou em perigo de extinção.

O local de estudo, o riacho Cavouco, é um riacho urbano que recebe efluentes doméstico, químico e hospitalar ao passar por comunidades desprovidas, em sua maioria, de saneamento básico. Ao final de seu trajeto, deságua na margem direita de um dos principais rios do estado de Pernambuco, o rio Capibaribe que, por sua vez, deságua no Oceano Atlântico.

O objetivo deste trabalho foi realizar o biomonitoramento de um riacho urbano usando biomarcadores genotóxicos de *Hoplosternum littorale*, a fim de contribuir com subsídios para a conservação desse riacho, bem como fornecer dados que auxiliem no monitoramento de outros ambientes aquáticos impactados.

2. METODOLOGIA

2.1. Descrição da área de Estudo e Amostragem

O riacho Cavouco é um riacho urbano que representa um importante curso d'água na malha hídrica da cidade do Recife (Pernambuco, Brasil). Com extensão de aproximadamente 6000 metros da nascente até a foz, em seu percurso, recebe uma contribuição significativa de esgotos de natureza química, hospitalar e doméstica.

Espécimes juvenis de *H. littorale* (10 espécimes: peso $230,7 \pm 4,5$ g, comprimento $22,5 \pm 2,6$ cm) foram coletados por meio de redes de pesca do tipo espera e tarrafa em três pontos deste riacho (Figura 1), durante os anos de 2015 e 2016 nos períodos de estação

chuvosa, (entre Março e Agosto) e seca (entre Setembro e Fevereiro). O ponto P1 recebe esgotos domésticos provenientes da população circunvizinha. O ponto P2 caracteriza-se por receber esgotos contendo resíduos químicos oriundos de laboratórios de instituições de ensino e pesquisa e o P3 que localiza-se próximo a uma unidade de saúde (Hospital), recebe predominantemente efluentes de natureza hospitalar.

Para fim de comparação, 10 espécimes de *H. littorale* foram coletados adicionalmente e mantidos por 35 dias em aquários de 100L abastecidos com água limpa e aeração contante (espécimes - controle). Os espécimes foram anestesiados com 150 mg/L de tricaina (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, Sigma-Aldrich) e após sedação foi coletado o sangue por punção caudal, com auxílio de seringas de insulina previamente heparinizadas para realização dos ensaios genotóxicos.

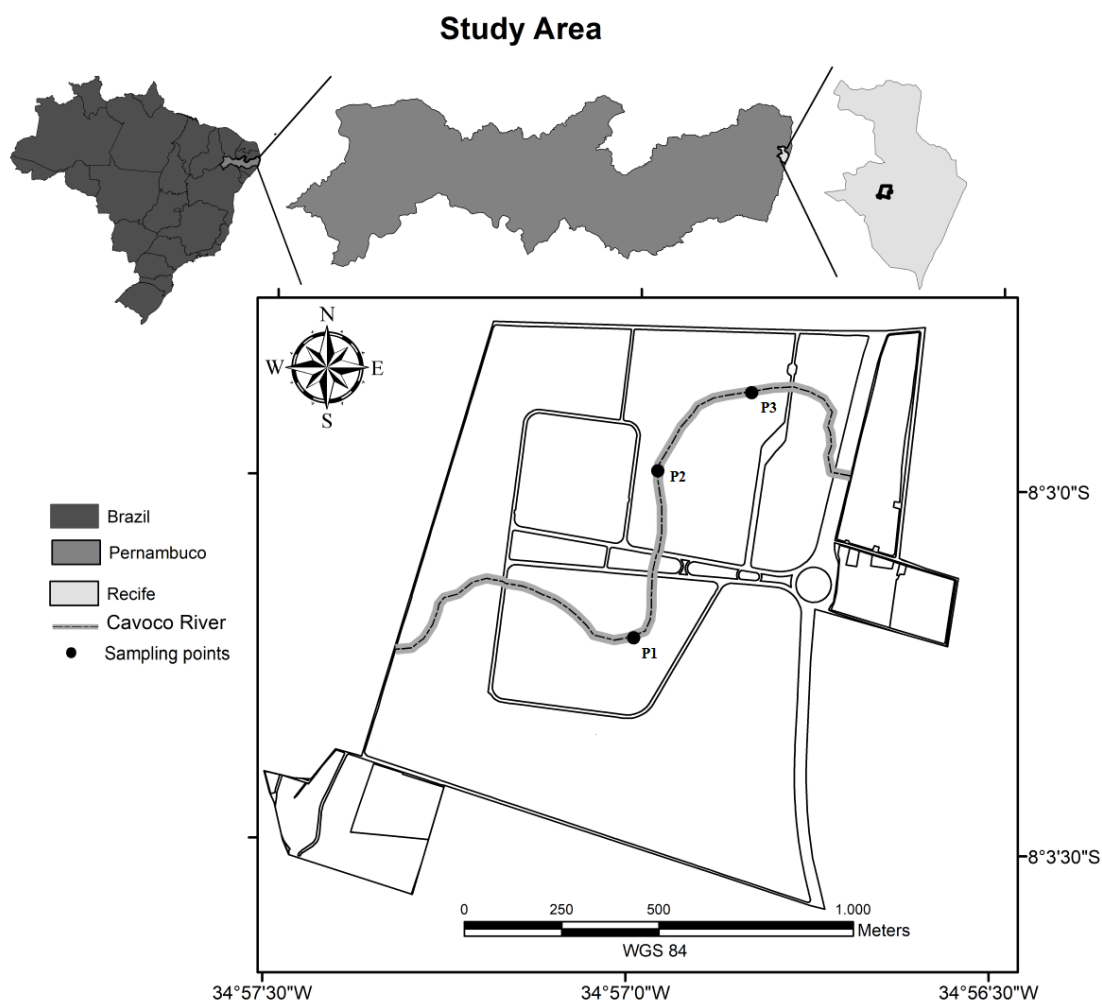


Figura 1 – Pontos de amostragem em um trecho do riacho Cavouco, Recife, Pernambuco, Brasil.

2.2. Teste de Micronúcleo (MN) e Anormalidades Nucleares (AN)

Para análise dos micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AN) foi empregada a técnica descrita por Schmid (1975), que consiste na realização de um esfregaço sanguíneo em uma lâmina. Para cada espécime, duas lâminas foram preparadas.

As lâminas previamente confeccionadas foram fixadas em metanol absoluto (cinco minutos) e posteriormente coradas com Giemsa (7,5%) por cinco minutos em temperatura ambiente. Um total de 1000 eritrócitos por esfregaço sanguíneo foram analisados, entre normais, micronucleados e com alterações nucleares. As anormalidades nucleares (lobbed, blebbed, notched e binúcleo), foram reconhecidas e diferenciadas de acordo com a classificação descrita por Carrasco et al (1990). Os eritrócitos foram analisados utilizando um microscópio óptico, equipado com lente de imersão em óleo (ampliação de 100x).

2.3. Ensaio Cometa (EC)

O ensaio cometa (eletroforese em gel de células individuais - *Single cell gel*) foi realizado de acordo com Singh et al. (1988). Para tanto, 1 mL de sangue periférico foi adicionado a 1 mL de Hemofol (heparina sódica) para evitar a coagulação sanguínea e, consequentemente, diluir a amostra. Posteriormente, 15 µL dessa suspensão celular foi adicionada a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Esta suspensão foi então espalhada em lâminas previamente revestidas com agarose padrão (1,5%). Uma vez preparadas, as lâminas imediatamente foram submersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, 1% Triton x-100, 10% DMSO, pH 10), previamente refrigerada (4 °C). Após a lise celular, as lâminas foram submetidas à corrida eletroforética (25 V e 300 mA) por 25 minutos. Por fim, as lâminas foram neutralizadas, fixadas em etanol e coradas com corante fluorescente Gel Red (diluição 1: 100). Foram analisadas 100 células de cada espécime em microscópio de epifluorescência e o sistema de classificação visual levou em conta a extensão das “caudas” formadas pelos fragmentos de DNA danificados. Os danos foram classificados em níveis que variaram de 0 (sem dano aparente) ao nível 4 (dano máximo).

Os dados foram tratados utilizando dois parâmetros distintos: a) o índice de dano (ID), calculado como a soma dos produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o número referente ao nível de dano (Equação 1) e b) a frequência do dano (FD%), calculada como a porcentagem de todos os níveis de cometas em relação ao número total de células avaliadas (Equação 2).

$$ID = (N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4) \quad (\text{eq. 1})$$

Onde: N_x = número de cometas com nível de dano x

$$FD\% = (N_1 + N_2 + N_3 + N_4) \mid \Sigma N_x + N_0 = 100 \quad (\text{eq. 2})$$

Onde: N_x = número de cometas com nível de dano x

2.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa Statistica 6.0. Os dados do ensaio cometa (ID e FD%) foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, o teste de Bartlett foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias das amostras. Quando não homogêneas ($p < 0,05$), as amostras foram ranqueadas, permitindo a análise de variância (ANOVA). A diferença entre os grupos foi evidenciada a posteriori pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

As frequências de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AN) foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) seguidas do teste de Tukey (significância de 5%), após as premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias como descritas anteriormente.

RESULTADOS

O índice de danificação genômica (ID) dos espécimes coletados em três pontos do riacho Cavouco foi relativamente alto em todos os períodos analisados quando comparados aos espécimes controle ($p < 0.01$). No entanto, a análise comparativa entre os pontos de amostragem não apresentou diferenças significativas, exceto no período seco em 2016 em que foi detectada diferença entre os pontos P1 e P2 ($p = 0.0018$), conforme tabela 1. Em termos de médias anuais, também foi observada diferença em relação aos controles ($ID_{2015} = 4,03x$; $ID_{2016} = 5,46x$).

Tabela 1 – índice de dano (ID) em espécimes de *H. littorale* coletados em três pontos do riacho Cavouco nos períodos chuvoso e seco dos anos de 2015 e 2016.

Período Chuvoso/ 2015				Período Seco/ 2015			
Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)	Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)
M = 38.3	M = 152.8	M = 150.9	M = 141.3	M = 38.3	M = 157.6	M = 152.2	M = 171.5
SD = 8.9	SD = 25.9	SD = 17.8	SD = 21.4	SD = 8.9	SD = 30.0	SD = 23.0	SD = 17.3
(1)	0.0001**	0.0001***	0.0002**	(1)	0.0001***	0.0001***	0.0001***
(2)	0.0001***	0.9999	0.7950	(2)	0.0001***	0.9436	0.4012
(3)	0.0001***	0.9999	0.7798	(3)	0.0001***	0.9436	0.1598
(4)	0.0002**	0.7950	0.7798	(4)	0.0001***	0.4012	0.1598
Período Chuvoso/ 2016				Período Seco/ 2016			
Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)	Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)
M = 38.3	M = 201.5	M = 179.2	M = 189.3	M = 38.3	M = 243.8	M = 268.8	M = 172.9
SD = 8.9	SD = 52.8	SD = 36.6	SD = 50.3	SD = 8.9	SD = 59.1	SD = 46.3	SD = 63.5
(1)	0.0001***	0.0001***	0.0001***	(1)	0.0001***	0.0004**	0.0001***
(2)	0.0001***	0.6225	0.9099	(2)	0.0001***	0.0018**	0.3982
(3)	0.0001***	0.6225	0.9461	(3)	0.0004**	0.0018**	0.0972
(4)	0.0001***	0.9099	0.9461	(4)	0.0001***	0.3982	0.0972

M - Média dos danos genômicos.

SD - Desvio padrão.

Diferença significativa - nível de significância * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,0001

A frequência de danos (FD) corrobora os resultados do ID, anteriormente citados. Altas frequências de dano foram detectadas no DNA dos espécimes provenientes dos três pontos investigados em relação aos espécimes controle (Tabela 2). Diferenças significativas entre os pontos de coleta também não foram observadas na maioria dos períodos investigados, exceto no período seco em 2015, onde o ponto referente ao hospital (P3) apresentou FD um pouco mais elevada diferindo estatisticamente dos demais pontos (P3 x P1: p = 0,024; P3 x P2: p = 0,031). Os valores de médias anuais de 2015 e 2016 diferiram significativamente dos controles (FD%₂₀₁₅ = 2,45x; FD%₂₀₁₆ = 2,46x).

Tabela 2 – Frequência de dano (FD) em espécimes de *H.littorale* coletados em três pontos do riacho Cavouco nos períodos chuvoso e seco dos anos de 2015 e 2016.

Período Chuvoso/ 2015				Período Seco/ 2015			
Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)	Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)
M = 37.6	M = 93.7	M = 91.5	M = 91.8	M = 37.6	M = 91.0	M = 91.1	M = 94.0
SD = 8.5	SD = 6.9	SD = 10.8	SD = 4.9	SD = 8.5	SD = 3.2	SD = 2.8	SD = 1.5
(1)	0.0001***	0.0001***	0.0001***	(1)	0.0001***	0.0001***	0.0001***
(2)	0.0001***	0.9306	0.9536	(2)	0.0001***	0.0997	0.0246*
(3)	0.0001***	0.9306	0.9998	(3)	0.0001***	0.9997	0.0311*
(4)	0.0001***	0.9536	0.9998	(4)	0.0001***	0.0246*	0.0311*
Período Chuvoso/ 2016				Período Seco/ 2016			
Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)	Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)
M = 37.6	M = 89.8	M = 88.6	M = 95.7	M = 37.6	M = 97.6	M = 88.3	M = 96.6
SD = 8.5	SD = 15.4	SD = 13.6	SD = 7.1	SD = 8.5	SD = 3.7	SD = 15.3	SD = 6.5
(1)	0.0001***	0.0001***	0.0001***	(1)	0.0001***	0.0001**	0.0001***
(2)	0.0001***	0.9957	0.6773	(2)	0.0001***	0.6809	0.9884
(3)	0.0001***	0.9957	0.5364	(3)	0.0001***	0.6809	0.8693
(4)	0.0001***	0.6773	0.5364	(4)	0.0001***	0.9848	0.8693

M - Média dos danos genômicos.

SD - Desvio padrão.

Diferença significativa - nível de significância * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,0001

No que se refere ao teste de micronúcleo (MN), no período seco em 2015 não foi constatada diferença estatística entre os pontos de amostragem, bem como, dos pontos em relação ao controle. Nos demais períodos, o ponto P3, referente ao hospital, foi o único que não apresentou diferença estatística em relação ao controle. Em contrapartida, o ponto P2 diferiu do controle significativamente no período chuvoso tanto em 2015 quanto em 2016. Curiosamente, a frequência de MN nos espécimes do ponto P1 se mostrou aumentada no período chuvoso em 2015, e no seco em 2016 diferiu de forma significativa do controle e dos demais pontos de amostragem (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência de micronúcleo (MN) em espécimes de *H.littorale* coletados em três pontos do riacho Cavouco nos períodos chuvoso e seco dos anos de 2015 e 2016.

Período Chuvoso/ 2015				Período Seco/ 2015			
Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)	Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)
M = 3.2	M = 12	M = 13	M = 6	M = 3.2	M = 4.5	M = 5.1	M = 6
SD = 1.2	SD = 5.7	SD = 7.4	SD = 3.0	SD = 1.2	SD = 2.9	SD = 2.0	SD = 4.5
(1)	0.0003**	0.0002 **	0.1570	(1)	0.7076	0.1549	0.3386
(2)	0.0003**	0.9805	0.0735	(2)	0.7076	0.7017	0.9230
(3)	0.0002**	0.9885	0.0304**	(3)	0.1549	0.7017	0.9678
(4)	0.1570	0.0735	0.0304**	(4)	0.3386	0.9230	0.9678
Período Chuvoso/ 2016				Período Seco/ 2016			
Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)	Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)
M = 3.2	M = 4.9	M = 9.1	M = 6.1	M = 3.2	M = 8.7	M = 4.4	M = 4.5
SD = 1.2	SD = 3.9	SD = 4.2	SD = 3.8	SD = 1.2	SD = 4.8	SD = 2.3	SD = 1.9
(1)	0.3377	0.0063**	0.3087	(1)	0.0002**	0.3013	0.2522
(2)	0.3377	0.2812	0.9999	(2)	0.0002**	0.0137**	0.0182**
(3)	0.0063**	0.2812	0.3087	(3)	0.3013	0.0137**	0.9995
(4)	0.3087	0.9999	0.3087	(4)	0.2522	0.0182**	0.9995

M - Média dos danos genômicos.

SD - Desvio padrão.

Diferença significativa - nível de significância * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,0001

Alterações morfológicas nucleares foram observadas nos eritrócitos de *H. littorale*. Nos períodos analisados, sobretudo no período seco, todos os grupos diferiram do controle. O ponto próximo ao Hospital (P3) foi o local com mais AN, deferindo estatisticamente do controle nos dois anos de monitoramento em todos os períodos analisados ($p < 0,01$), e no período seco em 2015 diferiu também de todos os demais pontos. Em seguida, o ponto P1 foi o ponto mais comprometido com frequências aumentadas de anormalidades nucleares em quase todos os períodos de amostragem, exceto no período chuvoso em 2016. Já o ponto P2, apresentou anormalidades nucleares apenas nos períodos seco (Tabela 4). A quantificação de AN resultou na seguinte ordem: $P3 > P1 > P2$.

Tabela 4 – Anormalidades nucleares (AN) em espécimes de *H.littorale* coletados em três pontos do riacho Cavouco nos períodos chuvoso e seco dos anos de 2015 e 2016.

Período Chuvoso/ 2015				Período Seco/ 2015			
Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)	Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)
M = 5.3 SD = 3.3	M = 13.5 SD = 8.03	M = 6.3 SD = 3.4	M = 15 SD = 13.1	M = 5.3 SD = 3.3	M = 12.2 SD = 7.5	M = 21.5 SD = 13.4	M = 24.6 SD = 10.9
(1)	0.0208*	0.9298	0.0226*	(1)	0.0392*	0.0002**	0.0001***
(2)	0.0208*	0.0850	0.9999	(2)	0.0392*	0.1546	0.0052**
(3)	0.9298	0.0850	0.0912	(3)	0.0002**	0.1546	0.4869
(4)	0.0226*	0.9999	0.0912	(4)	0.0001***	0.0052**	0.4869
Período Chuvoso/ 2016				Período Seco/ 2016			
Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)	Controle (1)	P1 (2)	P2 (3)	P3 (4)
M = 5.3 SD = 3.3	M = 10.8 SD = 4.7	M = 12.1 SD = 6.1	M = 22.1 SD = 8.5	M = 5.3 SD = 3.3	M = 18 SD = 6.4	M = 12.8 SD = 7.6	M = 21.7 SD = 10.4
(1)	0.1891	0.7143	0.0001***	(1)	0.0002***	0.0215*	0.0001***
(2)	0.1891	0.9621	0.0010**	(2)	0.0002***	0.2086	0.9142
(3)	0.7143	0.9621	0.0036**	(3)	0.0215*	0.2086	0.0556*
(4)	0.0001***	0.0010**	0.0036**	(4)	0.0001***	0.9142	0.0556*

M - Média dos danos genômicos.

SD - Desvio padrão.

Diferença significativa - nível de significância * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,0001

3. DISCUSSÃO

Neste estudo, os resultados de índice de dano (ID) e frequência de dano (FD) revelaram alta danificação genômica nos espécimes de *H. littorale* coletados no riacho Cavouco em relação aos espécimes controle. Tal nível elevado de danificação foi observado em todos os períodos analisados. De acordo com esses resultados, sugere-se a presença de agentes genotóxicos nesse riacho e pode-se afirmar que este ecossistema encontra-se impactado.

Estudos relatam que a carga de poluentes presentes no “Cavouco” é composta principalmente de substâncias químicas, resíduos hospitalares e efluentes domésticos (ARAÚJO e OLIVEIRA, 2013; PURIFICAÇÃO JÚNIOR et al., 2016). Essa carga de poluentes, lançadas sem tratamento e de forma inadequada nesse ambiente, pela própria

natureza das atividades (hospitalares, laboratoriais e domissanitárias), contém substâncias com ação genotóxicas, conhecidas por terem ação mutagênica e carcinogênica. Tais substâncias interagem quimicamente com o material genético induzindo alterações na estrutura da molécula de DNA (formando adutos ou até mesmo quebras da molécula) (SCALON, et al., 2010; BOLOGNESI e HAYASHI, 2011; OBIAKOR et al., 2012).

As alterações no DNA observadas no presente estudo através do ID e FD, revelados por meio do Ensaio Cometa, podem ocasionar às espécies que habitam neste riacho sérias consequências, uma vez que, danos celulares provocados por agentes genotóxicos podem afetar uma série de funções fisiológicas no organismo, já que em nível individual lesam células e órgãos. Embora o Ensaio Cometa seja uma técnica que detecta microlesões, tais lesões se não reparadas, em longo prazo podem prejudicar a adaptabilidade e ameaçar a sobrevivência das espécies (ADAM et al., 2010; PINHEIRO et al., 2013; KOUSAR e JAVED, 2015; SOUZA et al., 2016).

Em termos de médias anuais, também foi observada diferença em relação aos controles e de acordo com os resultados o ano de 2016 foi o mais afetado por poluentes ($ID_{2015} = 4,03x$; $ID_{2016} = 5,46x$). Este resultado pode ser atribuído em razão de sua pluviosidade ter sido menor do que no ano de 2015 (precipitação média anual = 141,58 mm e 165,54 mm, respectivamente, de acordo com a Agência Pernambucana de Águas e climas - APAC), o que contribuiu para uma maior exposição dos espécimes a agentes com potencial genotóxico.

No que se refere ao teste de micronúcleo (MN), o ponto P3 foi o único que não apresentou diferença significativa em relação ao controle, em contrapartida foi o ponto que mais diferiu em termos de anormalidades nucleares (AN).

Estudos recentes abordam os mecanismos moleculares e fatores que podem levar à formação de MN e outras anomalias nucleares, tendo em vista o seu uso como biomarcadores de eventos genotóxicos e de instabilidade cromossômica (BOLOGNESI e HAYASHI 2011; FENECH e BONASSI 2011; FENECH et al. 2011; CARROLA et al., 2014). Alguns autores relatam que certos produtos químicos podem induzir anormalidades nucleares, mas não micronúcleos, ou seja, o aparecimento de MN ou AN está relacionado ao tipo de poluente que causa diferentes respostas. Isto deve-se ao fato de que alguns poluentes, além de genotóxicos, inibem o ciclo celular, e portanto, o aparecimento de micronúcleo. Por exemplo, exposições experimentais ao herbicida pendimethalin, ciclofosfamida e aos metais cádmio e cobre resultaram em aumento de AN, mas não de MN (AYLLON e GARCIA-VÁZQUEZ, 2000; GÖKALP MURANLI e GÜNER, 2011).

A origem dessas alterações nucleares ainda não está completamente elucidada (BOTELHO et al., 2015). Entretanto, Thomé et al (2016) relatam que as AN são precursoras dos micronúcleos (são respostas primárias antes da formação de MN) e podem ser explicadas devido a uma ação de reparo da célula ao se detectar uma região cromossômica afetada iniciando um processo de reparação e/ou eliminação. De acordo com Seriani e colaboradores (2011), outro indício da formação dessas alterações pode ser a evidência de estresse oxidativo induzido por um poluente disperso no ambiente. Isso porque no estresse oxidativo as membranas podem ter a sua permeabilidade e seletividade alterada pela peroxidação lipídica, tornando o núcleo mais sensível a deformações e alterações.

O ponto P3 é caracterizado por receber alta concentração de efluente hospitalar, que contém uma variedade de contaminantes com potencial para exercer sua toxicidade gerando estresse oxidativo. São contaminantes que propiciam o aumento das espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxil. O aumento desses radicais livres afeta o sistema de defesa antioxidante necessário para prevenir, interceptar e reparar danos celulares (CHANDRAN et al. 2005; GU, 2006; ATLI e CANLI, 2007; MONSERRAT et al. 2008). Além disso, este ponto localiza-se a jusante dos demais pontos investigados recebendo e acumulando, portanto, os esgotos provenientes dos pontos anteriores. De acordo com os resultados obtidos fica evidente que o ponto P3 está sendo diretamente prejudicado por poluentes que afetam o ciclo celular, reduzindo as taxas mitóticas, o que explica a predominância de AN em relação à frequência de MN.

Com exceção do ponto P3, o P1 foi o ponto mais comprometido com frequências aumentadas de anormalidades nucleares em quase todos os períodos de amostragem, principalmente no período seco. Já o ponto P2, apresentou anormalidades nucleares apenas no período seco nos dois anos de monitoramento. Estes pontos caracterizam-se por receber efluentes domésticos e químicos, respectivamente.

O menor dano no período chuvoso pode ser atribuído à ausência de atividades como agricultura, indústria, mineração e venda de combustíveis no entorno do local de coleta que poderiam carrear, por escoamento e lixiviação da água das chuvas, substâncias como pesticidas, metais e PAHs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). Sendo assim, os poluentes predominantes são provenientes de efluentes domésticos, laboratoriais e hospitalares (LABs - alquibenzenos lineares, toxinas de microorganismos patogênicos e de microalgas, reagentes químicos, fármacos) cuja entrada neste riacho independe da pluviosidade e, portanto são passíveis de acúmulo/concentração no período seco, quando o nível do riacho sofre redução significativa. Considerando isso e o fato de que o dano por AN é

precursor do dano por MN, pode-se inferir que, no período chuvoso, tais poluentes não carregados pela chuva para o riacho tendem a ser diluídos, permitindo que o ciclo celular se complete (aumento da taxa mitótica) até a formação dos MN. Isto foi evidenciado neste estudo, no qual foi constatada maior frequência de MN no período chuvoso, na maioria dos pontos.

Devido à ausência de conhecimento sobre o mecanismo de formação das anormalidades nucleares, este parâmetro tem sido utilizado apenas como informação complementar ao teste de MN. Porém de acordo com os resultados obtidos nesse estudo pode-se afirmar que a quantificação das AN é tão importante quanto à quantificação de MN, pois nem sempre os achados de MN e AN são semelhantes. Todavia, a alta frequência de ambos são indicativos claros de exposição a substâncias genotóxicas (clastogênicas e/ou aneugênicas) e consequentemente de perturbação no ambiente.

Vale ressaltar que os resultados dos testes de genotoxicidade apresentam uma grande variabilidade entre as espécies. A análise das frequências de micronúcleos, por exemplo, foi relatada por vários autores e varia de 0 a 13 MN por 1000 células (LEMOS et al., 2007; HUSSAIN et al., 2016; SERIANI et al., 2011). Isto deve-se a vários fatores tais como, alterações em parâmetros ambientais como baixo oxigênio dissolvido, tipo de poluentes, exposição (aguda ou crônica) e susceptibilidade das espécies. O tamoatá, organismo de estudo desse trabalho, é um peixe que apresenta características peculiares como a capacidade de usar o intestino para respiração aérea (respiração alternativa), sendo considerado, portanto, um peixe resistente e tolerante a diferentes ambientes. Além disso, ele tem como característica morfológica o corpo coberto por placas ósseas que dificulta o contato e a passagem de substâncias tóxicas para o seu interior. Estas características tornam o tamoatá um bom bioindicador ambiental e os seus resultados de danificação genômica aqui apresentados alertam para a possibilidade de que outras espécies mais sensíveis e mais susceptíveis que habitam o ambiente investigado estejam com a sobrevivência ameaçada.

4. CONCLUSÃO

Os testes de genotoxicidade aplicados no presente estudo foram capazes de detectar os danos genômicos em espécimes de *H. littorale*. De acordo com os resultados, o riacho Cavouco encontra-se impactado, com a maior incidência de danos por microlesões ao DNA durante o período seco em razão da natureza das atividades realizadas no trecho da coleta e seu entorno, as quais produzem efluentes não carregados pelo solo e cujo volume independe

das chuvas. Tais lesões foram observadas em todos os períodos analisados e estão, ao menos no período seco, em consonância com os observados nas alterações nucleares que, apesar de sua origem não estar completamente elucidada, mostraram-se bons biomarcadores da presença de substâncias genotóxicas e que inibem o ciclo celular. Todavia, os resultados de macrolesões por micronúcleo não seguiram o mesmo padrão de incidência devido à presença de substâncias com efeitos apenas genotóxicos.

Os resultados desse estudo alertam para a necessidade de conservação do ecossistema analisado e poderão contribuir para auxiliar no controle e gestão da poluição neste e em outros riachos urbanos impactados.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Fisiologia Comparada e Comportamento Animal (LabFCCA), Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (LAGEA) e a Diretoria de Gestão Ambiental (DGA) da Superintendencia de Infraestrutura da Universidade Federal de Pernambuco/ UFPE pelo apoio e colaboração na execução desse trabalho. Bem como agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

ADAM, M. L.; TORRES, R. A.; SPONCHIADO, G.; MOTTA, T.S.; OLIVEIRA, C. M. R.; CARVALHO-FILHO, M. A.; CORREIA, M. T. S. Environmental degradation at a public park in southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). **Water, Air and Soil Pollution**, 211:61-68.2010.

AHMED, M. K. et al. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**, v. 84, p. 143-149, 2011.

ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 150-156, 2011.

ARAÚJO , M.C. ; OLIVEIRA, M.B.M. Monitoring of water quality of a stream at the Federal University of Pernambuco, Brazil. **Rev. Ambient. Água.** vol.8 no.3 Taubaté Sept./Dec. 2013. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1192>

ARAÚJO, M. C.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, L. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, K. C. C.; LIMA, A. V. A.; CARVALHO JR., L. B.; BEZERRA, R. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdã, v. 177, p. 182-189, 2016.

AYLLON F, GARCIA-VAZQUEZ E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen** 467:177–186.2000

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 145:282-287, 2007.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011.

BOTELHO, R.G.; MONTEIRO, S.H.; Christofolletti, C.A.; . Moura-Andrade, G.C.R.; Tornisiel, V.L. Environmentally Relevant Concentrations of Atrazine and Ametrine Induce Micronuclei Formation and Nuclear Abnormalities in Erythrocytes of Fish. **Arch Environ Contam Toxicol**. DOI 10.1007/s00244-015-0171-6 2015.

BRAHAM, R.P. Micronuclei and Other Erythrocyte Nuclear Abnormalities in Fishes from the Great Lakes Basin, USA. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. DOI 10.1002/em. 2017.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123 -2136, 1990.

CARROLA, J.; SANTOS, N.; ROCHA, M.J.; FERNANDES, A.F.; PARADAL, M.A.; MONTEIRO, R.A.F.; ROCHA, F. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries - Portugal. **Environ Sci Pollut Res**. 21:6057–6068 DOI 10.1007/s11356-014-2537-0. 2014

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A.A.; MOHANDAS, S. S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology Part C** 140:422-426.2005.

FENECH M, BONASSI S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis** 26:43–49. 2011.

FENECH M, KIRSCH-VOLDERS M, NATARAJAN AT, SURRALLES J, CROTT JW, PARRY J, NORPPA H, EASTMOND DA, TUCKER JD, THOMAS P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis** 26:125–1.2011.

GÖKALP MURANLI FD, GÜNER U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda cyhalothrin. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen** 726:104–108.2011.

GU, J.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. 2006.

GUTIERREZ, J.M.; VILLAR, S.; PLAVAN, A.A. Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Rio de la Plata (Uruguay). **Marine Pollution Bulletin**. Article in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.027>. 2014.

HUSSAIN, B., SULTANA, T., SULTANA, S., MAHBOOB, S., AL-GHANIM, K. A., & NADEEM, S. Variation in genotoxic susceptibility and biomarker responses in *Cirrhinus mrigala* and *Catla catla* from different ecological niches of the Chenab River. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-11, 2016.

HUSSAIN, B. et al. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. **Saudi Journal of Biological Sciences** (2017), <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.048>

JAVEDE, M. et al. Bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in fish (*Channa punctatus*) exposed to a thermal power plant effluent. **Ecotoxicology and Environmental safety** (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.007>

KOUSAR, S.; JAVED, M. Diagnosis of Metals Induced DNA Damage in Fish Using Comet Assay (2015). **Pak Vet J**, 35(2): 168-172.

LEMOS, C.T.; RODEL, P.M.; TERRA, N.R.; OLIVEIRA, N.C.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 66, p. 391–401, 2007.

LIMA, A.R.B.; TORRES, R.A.; JACOBINA, U.P.; PINHEIRO, M.A.A.; ADAM, M.L. Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v138, p.63–69, (2019) <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.037>.

MONSERRAT, J.M.; LIMA, J.V.; FERREIRA, J.L.R.; ACOSTA, D.; GARCIA, M. L.; RAMOS, P.B.; MORAES, T.B.; SANTOS, L.C.; AMADO, L.L. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:287-292. 2008.

NUNES, B., BARBOSA, A.R., ANTUNES, S.C., GONÇALVEZ, F. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. **Environ Sci Pollut Res** 21:6258–6262. 2014.

NIGAM, A.K., SRIVASTAVA, N., RAI, A.K., KUMARI, U., MITTAL, A.K., MITTAL, S. The first evidence of cholinesterase in skin mucus of carps and its applicability as biomarker of organophosphate exposure. **Environmental Toxicology**. Doi 10.1002/tox.2012.

OBLAKOR, M.; OKONKWO, J. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as In situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. **Journal of Animal Science Advances**, v. 2, n. 1, p. 123–133, 2012.

PALANIKUMAR, L.; PANNEERSELVAM, N. Micronuclei assay: A potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies. **Genetika**, v. 47, p. 1169-1174, 2011.

PINHEIRO, D.A. ; DIAS, M.T. ; DIAS, M.K.R. ; SANTOS, E.F. ; MARINHO, R.G.B. Primeiro registro da ocorrência de protozoários em Tamoatá *Hoplosternum littorale* no Brasil. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, 39(2): 169 – 177, 2013

PURIFICAÇÃO JÚNIOR et al. Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. **African Journal of Microbiology Research**. Vol. 11(28), pp. 1142-1149, 28 July, 2017. DOI: 10.5897/AJMR2017.8577.

SALVADOR-JR; SILVA.F.A. Actinopterygii, Siluriformes, Callichthyidae, *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828): Distribution extension in the upper São Francisco River region, southeast Brazil. **Check List** | Volume 7 | Issue 5 | ISSN 1809-127X (online edition), 2011.

SCALON, M.C.S.; RECHENMACHER, C.; KAYSER, M. L.C.; RODRIGUES, M.T.C.; MALUF, S.W.D.; RODRIGUES, M.A.S.; SILVA, L.B.F. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Braz. J. Biol.**, 2010, vol. 70, no. 4 (suppl.), p. 1217-1222

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SERIANI, R.; RANZANI--PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, Ã.T. AND NAPOLEÃO, S.R. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v. 33, n. 1, p. 107-112, 2011.

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

SILVA, F.A et al. Genomic Organization Under Different Environmental Conditions: *Hoplosternum Littorale* as a Model. **Zebrafish** Volume 13, n° 3, Doi: 10.1089/zeb.2015.1237. 2016.

SILVA, J.M et al. Determination of genotoxic effect of trifluralin on *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae, Cuvier, 1816) using a multibiomarker approach. **Ecotoxicol. Environ. Contam.** v. 12, n. 1, , 85-93 doi: 10.5132/eec.2017

SOUZA, M.S. et al. Avaliação da qualidade da água do Rio dos Sinos (Brasil) por meio do teste de micronúcleos em *Cyprinus carpio* e de análises físico-químicas e microbiológicas. **Acta Toxicol. Argent.** 24 (3): 193-199, 2016

THOMÉ, R.G.; SILVA, P.M.; SANTOS, H.B. Avaliação de Genotoxicidade da Água de um Rio Urbano Utilizando Estudo de Células Sanguíneas de *Danio rerio*. **Revista Conexão Ciência** Vol. 11; nº 2; 2016.

WANG. Y., CHEN, C., ZHAO, X., WANG. Q., QIAN. Y. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 122 (2015) 81–85. 2015.

6. CAPÍTULO III

Estresse oxidativo, marcadores enzimáticos e resposta hematológica em *Hoplosternum littorale*; Hancock, 1828 (Siluriformes; Callichthyidae) provenientes de um riacho urbano no nordeste do Brasil.

Artigo a ser submetido à revista

**Ecotoxicology and
Environmental Safety**



Qualis: A1

ISSN: 0147-6513

Fator de Impacto: 3.743

Estresse oxidativo, marcadores enzimáticos e resposta hematológica em *Hoplosternum littorale*; Hancock, 1828 (Siluriformes; Callichthyidae) provenientes de um riacho urbano no nordeste do Brasil.

Marlyete Chagas de Araújo¹; Caio Rodrigo Dias de Assis¹; Rafael David Souto de Zevedo¹; Ricielle Lopes Augusto³; Kaline Catiely Campos Silva²; Kelma Sirleide de Souza¹; Luciano Clemente Silva¹; Valdir Luna da Silva³; Luiz Bezerra de Carvalho Junior⁴; Monica Lúcia Adam⁵, Ranilson de Souza Bezerra¹; Maria Betânia Melo de Oliveira¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Departamento de Educação, Colegiado de Biologia, Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Paulo Afonso, BA, Brazil

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

⁵Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Centro Acadêmico de Vitória, PE, Brasil.

Corresponding author:

Caio Rodrigo Dias de Assis

Laboratório de Enzimologia - LABENZ, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: caiodias2@hotmail.com

RESUMO

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico que ocorre naturalmente no metabolismo celular. Entretanto, quando em excesso estes radicais podem ocasionar a oxidação de moléculas bioativas (estresse oxidativo) causando consequentemente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático. Além disso, o estresse oxidativo afeta também os parâmetros sanguíneos de peixe, interferindo na atividade hematopoiética e com isso causando alteração nos constituintes sanguíneos, principalmente nas células de defesa. Este trabalho teve como objetivo realizar o biomonitoramento do riacho Cavouco avaliando parâmetros de estresse oxidativo, marcadores enzimáticos e respostas hematológicas de *Hoplosternum littorale*. Para isso, dez espécimes (peso $230,7 \pm 4,5$ g, comprimento $22,5 \pm 2,6$ cm) foram coletados semestralmente em três pontos do riacho (P1, P2, P3) durante os anos de 2015 e 2016 nos períodos de chuva e de estiagem. Os espécimes do grupo controle foram coletados nesse ambiente e depurados por 35 dias em aquários com aeração constante. Os animais foram anestesiados e após sedação foi coletado o sangue para realização dos ensaios hematológicos (contagem diferencial de leucócitos). Em seguida, foram retirados os tecidos (cérebro, músculo e fígado) para análise das enzimas acetilcolinesterase (AChE), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ensaios de peroxidação lipídica (TBARS). Para investigação do estresse oxidativo foi analisada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio ($\text{NO}\cdot$) através de espectrofluorimetria. Dois litros de água foram coletados em cada ponto de amostragem para determinação analítica de sete íons metálicos (cádmio, chumbo, cobre, cromo, ferro, manganês, e zinco) e a medição de cinco variáveis ambientais (pH, temperatura, condutividade, sólidos totais dissolvido e oxigênio dissolvido). Os resultados da análise da atividade da AChE evidenciaram a presença de agentes anticolinesterásicos nas águas do riacho Cavouco, uma vez que ocorreu decréscimo significativo na atividade dessa enzima, nas amostras de cérebro e músculo de Tamoatá provenientes do riacho, em relação as amostras controle ($1312,0$ mU.mg de proteína⁻¹), em todos os períodos analisados. As análises das enzimas detoxificadoras CAT e SOD demonstraram maior estresse oxidativo nos espécimes dos pontos P1, P2 e P3 em relação ao controle ($29,6$ e $31,1$ mU.mg de proteína⁻¹, respectivamente) em todos os períodos analisados e foram corroboradas pelos resultados de TBARS, geração de ROS e $\text{NO}\cdot$. Em relação às análises hematológicas os tipos leucocitários eosinófilo e basófilo, não foram encontrados nos espécimes de *H. littorale*, por outro lado todos os espécimes analisados apresentaram alta relação neutrófilos/linfócitos, em todos os períodos analisados, indicando que os peixes estão infectados. Tais respostas podem ser atribuídas à presença de agentes anticolinesterásicos, poluentes específicos de efluentes laboratoriais e hospitalares e à presença de agentes infecciosos na água do riacho Cavouco. De modo geral, os resultados das análises físico-química da água estão dentro dos limites estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (resolução nº 357/2005), porém é verificável a contaminação por origem antrópica, devido ao baixo teor de oxigênio dissolvido e presença de alguns metais pesados (ferro, manganês, zinco, chumbo e cobre), os quais mesmo em concentrações subletais podem afetar os ecossistemas aquáticos. Estes resultados apontam para a necessidade de um manejo e descarte adequado dos resíduos que atualmente são lançados sem tratamento neste ecossistema.

Palavras-chave: Radicais livres, Poluentes ambientais, Metais pesados, Enzimas, Parâmetros sanguíneos.

1. INTRODUÇÃO

O sangue é um tecido de propriedades especiais. Sua matriz extracelular (plasma) é composta por 90% de água e 7% de proteínas (principalmente globulinas e albumina), além disso, é composto por metabólitos como hormônios, enzimas e eletrólitos variados (RANZANI-PAIVA, 2007). Nos peixes, a porção figurada do sangue é composta por eritrócitos, leucócitos e trombócitos cuja origem, desenvolvimento e função, principalmente dos leucócitos, ainda não estão totalmente elucidadas, isto porque a hematopoiese nos peixes é facilmente influenciada por diversos fatores biológicos (sexo, estágio reprodutivo, estado nutricional, peso) e ambientais (temperatura, ciclo sazonal, poluentes), uma vez que são desprovidos de medula óssea e de linfonodos (SHERIDAN & MOMMSEN 1991; RANZANI-PAIVA et al. 2005; TAVARES DIAS et al. 2007; BARROS et al. 2009; STOSKOPF, 2010; SERIANE et al. 2011).

Atualmente, os parâmetros sanguíneos de peixes, vêm sendo utilizados como uma ferramenta auxiliar no monitoramento do bem-estar animal (THOMÉ et al., 2016). Diversos estudos indicam que a má qualidade da água, devido à poluição por resíduos agrícolas, industriais e domésticos em áreas urbanas, altera esses parâmetros devido a ocorrência de estresse oxidativo (AKINROTIMI et al., 2007; SERIANI et al., 2009; SERIANI et al., 2010; NTE, et al., 2011; SERIANI et al., 2011; GABER et al., 2013). O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de radicais livres (RLs) e espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS) (EL-BASSYOUNI, et al., 2012). Este estresse quando estabelecido interfere na atividade hematopoiética causando alteração nos constituintes sanguíneos, principalmente nas células de defesa.

Os organismos aeróbicos apresentam diferentes mecanismos de defesa antioxidante (sistema redox) que facilitam a remoção das ROS do organismo. Entre estes, destacam-se os mecanismos de defesa enzimática. Entre as enzimas que integram esse sistema a superóxido dismutase (SOD), que protege as células aeróbicas da ação do radical superóxido (O_2^-), catalisando a conversão deste em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a catalase (CAT) que reduz as moléculas de H_2O_2 a água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2), são as mais estudadas (AVILEZ et al., 2008). Vale ressaltar que o mecanismo de produção das ROS é um processo fisiológico que ocorre naturalmente no organismo e que somente quando o balanço entre sua

produção e degradação encontra-se desequilibrada, devido geralmente a um excesso, é que as ROS tornam-se prejudiciais, pois podem ocasionar a oxidação de moléculas biológicas importantes do organismo, causando, conseqüentemente, perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (COGO et al., 2009; CHAMI & CHECLER, 2012). Deste modo, a detoxificação das espécies reativas de oxigênio é um mecanismo fisiológico necessário para prevenir, interceptar e reparar danos celulares (CHANDRAN et al. 2005; GU, 2006; ATLI e CANLI, 2007; MONSERRAT et al. 2008).

Diversos contaminantes ou seus metabólitos tem potencial para induzir essas enzimas antioxidantes pela formação de RLs como, por exemplo, pesticidas e metais pesados. Entretanto, estas substâncias também podem inibir algumas enzimas como é o caso da acetilcolinesterase (AChE). A inibição desta enzima tende a gerar quadros de intoxicação aguda ou crônica, e dependendo do grau de exposição à substância tóxica, o indivíduo pode vir a morrer, pela superestimulação de seu sistema nervoso já que com a inibição da AChE ocorre um acúmulo de acetilcolina nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas (VALBONESI et al., 2011; NUNES et al., 2014).

Neste contexto, análises hematológicas, enzimáticas e do estresse oxidativo em peixes expostos a contaminantes são importantes no monitoramento dos ecossistemas aquáticos, pois podem contribuir para compreensão dos efeitos tóxicos dos contaminantes lançados nos corpos hídricos (KIRSCHBAUM et al., 2009; SERIANE et al., 2010, 2011, 2012; MONTENEGRO & GONZALEZ, 2012; AZEVEDO et al., 2012). O objetivo deste trabalho foi realizar o biomonitoramento do riacho Cavouco avaliando parâmetros de estresse oxidativo, marcadores enzimáticos e respostas hematológicas de *Hoplosternum littorale*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Descrição da área de Estudo e Obtenção dos espécimes

O riacho Cavouco é um riacho urbano localizado na cidade do Recife que deságua em um dos principais rios do estado de Pernambuco, o rio Capibaribe (Nordeste, Brasil). Com extensão de aproximadamente 6000 metros, em seu trajeto recebe uma contribuição significativa de esgotos contendo resíduos químico, hospitalar e doméstico.

Espécimes juvenis de *H. littorale* (10 espécimes: peso $230,7 \pm 4,5$ g, comprimento $22,5 \pm 2,6$ cm) foram coletados por meio de redes de pesca do tipo espera e tarrafa em três

pontos deste riacho (Figura 1), durante os anos de 2015 e 2016 nos períodos de estação chuvosa, (entre Março e Agosto) e seca (entre Setembro e Fevereiro). O ponto P1 recebe esgotos domésticos provenientes da população circunvizinha. O ponto P2 caracteriza-se por receber esgotos contendo resíduos químicos oriundos de laboratórios de instituições de ensino e pesquisa e o P3 que localiza-se próximo a uma unidade de saúde (Hospital), recebe predominantemente efluentes de natureza hospitalar.

Para fim de comparação, 10 espécimes de *H. littorale* foram coletados adicionalmente e mantidos por 35 dias em aquários de 100L abastecidos com água limpa e aeração contante (espécimes - controle). Os espécimes foram anestesiados com 150 mg/L de triclaína (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, Sigma-Aldrich) e após sedação foi coletado o sangue por punção caudal, com auxílio de seringas de insulina previamente heparinizadas para realização dos ensaios hematológicos (Contagem diferencial de leucócitos). Em seguida, foram retirados os tecidos (cérebro, músculo e fígado) para análise enzimática e do estresse oxidativo.

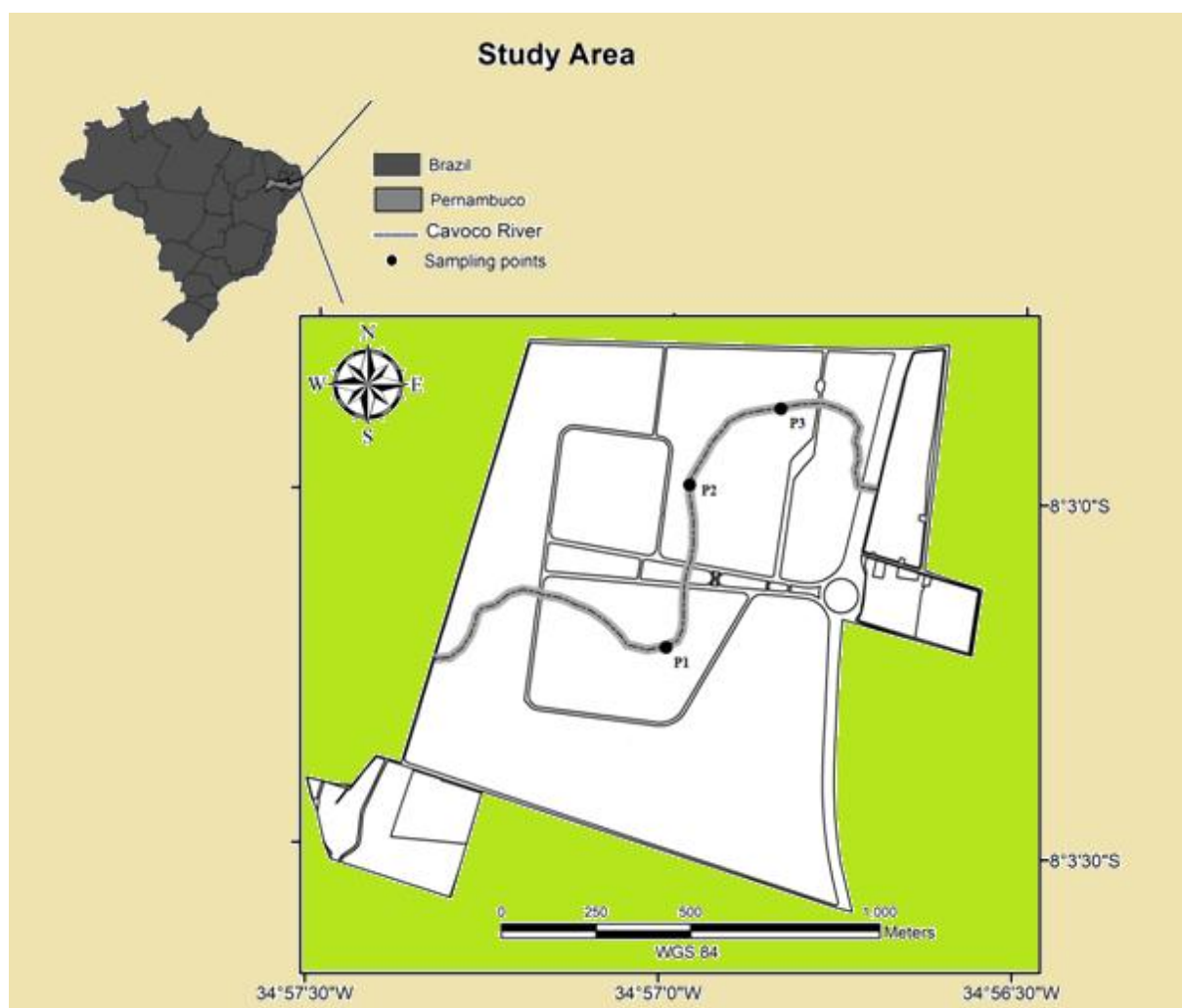


Figura 1 – Pontos de amostragem em um trecho do riacho Cavouco, Recife, Pernambuco, Brasil.

2.2. Extração e determinação da AChE

Os tecidos de *H.littorale* (cérebro e músculo) foram removidos e homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, numa proporção de 20 mg de tecido/mL usando um homogenizador de tecidos (IKA RW 20-digitais, Staufen, Alemanha). O homogenato foi centrifugado durante 10 minutos a 1000 xg (4°C) e o sobrenadante (extrato bruto) foi coletado e transferido para recipientes, os quais foram rotulados e acondicionados a - 20°C até a realização das análises. A dosagem da concentração de proteína foi determinada de acordo com Sedmak e Grossberg (1977), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Os ensaios enzimáticos foram realizados em quadruplicata, de acordo com Araújo e colaboradores (2016). Em microplaca, foi adicionado 20 µL de extrato, 200 µL de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)) a 0,25 mM e 20 µL do substrato acetiltiocolina (62 mM). O branco foi preparado com Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 em substituição ao extrato. A atividade foi mensurada através de um leitor de microplacas durante 3 minutos a 405 nm. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de substrato por minuto.

2.3. Determinação da catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada através do consumo do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exógeno que gera oxigênio e água, por meio de espectrometria (AEBI, 1984). Para obtenção da enzima os tecidos de fígado (40mg/ml) foram homogenizados em tampão PBS (tampão fosfato salina), pH 7,4 contendo ortovanadato de sódio (1mM) e 200 mg/ml de PMSF (inibidores de metalo e serino proteases, respectivamente). Em seguida, o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 4°C e 8000 xg. Em microplacas, foi adicionado em quadruplicata 4µL de H₂O₂, 1 µL de amostra e 195 µL de tampão glicina 50mM contendo EDTA (0,1mM), pH 10.2. O branco foi preparado com tampão glicina em substituição ao extrato. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 240 nm e a atividade enzimática foi expressa em nmol de H₂O₂ consumido/minuto/mg de proteína (mU).

2.4. Determinação da superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em tecidos de fígado segundo MISRA & FRIDOVICH, (1972). O homogenato foi obtido de acordo a metodologia descrita no tópico anterior (2.3). Em microplacas foram adicionados (quadruplicata) a 185 µL de tampão fosfato (50mM, pH 7) 10 µL da amostra. Para iniciar a reação foram adicionados 5 µL de epinefrina 30 mM (dissolvida em solução de ácido acético 0,05%) à mistura. A leitura foi realizada em espectrofotômetro através de 480 nm durante 4 minutos. A atividade foi expressa como a média de valores adquiridos quando ocorreu 50% de inibição da oxidação da epinefrina que equivale a 1 unidade. O branco foi preparado com tampão fosfato em substituição ao extrato.

2.5. Peroxidação lipídica (TBARS)

Após processo de centrifugação do homogenato de fígado conforme metodologia descrita nos tópicos acima (2.3 e 2.4), o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de peroxidação lipídica. Os níveis de TBARS foram determinados como descrito em OHKAWA et al. (1979), com algumas modificações, medindo por espectrofotometria compostos formados durante a peroxidação lipídica e que são reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tais como o malonaldeído. A cor da reação se desenvolveu pela adição sequencial de 0,2 mL de dodecil sulfato de sódio 8,1%; 1,5 mL de ácido acético 20% (pH = 3,5) e ácido tiobarbitúrico 0,8%. Essa mistura foi incubada por 30 minutos em banho-maria fervente e depois esfriada em água corrente. Foram adicionados 1,5 mL de n-butanol/piridina (15:1 v/v) e, em seguida, essa mistura foi centrifugada a 2500 x *g* por 10 minutos. A absorbância da camada orgânica foi medida em 532 nm como comprimento de onda padrão e o valor do TBARS foi determinado usando uma curva padrão de derivado de malonaldeído 1,1,3,3-tetrametoxipropano (MDA).

2.6. Produção de ROS por H₂DCFH-DA

A produção geral de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS) foi monitorada utilizando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFH-DA) por espectrofluorimetria (espectrofluorômetro FP-6300 Jasco Corporation - Japão). A

fluorescência foi observada sob comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente e 2,5 nm de abertura de fenda. Um microlitro de H₂DCFH-DA (25µM) foi incubado a 24 °C com 1 mL de amostra por 40 min com agitação magnética contínua. Uma curva de calibração foi obtida com diclorofluoresceína (DCF), o produto da oxidação de H₂DCF-DA por ROS. Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência (UF).

2.7. Produção de óxido nítrico

A produção de NO[•] foi estimada com 5 µM diacetato de FM-diaminofluoresceína (DAF-FM-DA) em 28° C a 495 nm de excitação e comprimentos de onda de emissão de 515 nm com agitação magnética contínua em espectrofluorômetro (FP-6300 Jasco Corporation - Japão) em condições similares ao item 2.6. A curva de calibração foi obtida com adições controladas por S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), um doador de NO[•].

2.8. Contagem diferencial de Leucócitos

Após sedação e coleta do sangue, um esfregaço sanguíneo foi realizado. Duas lâminas de cada animal foram fixadas em metanol absoluto (por cinco minutos) e, posteriormente, coradas com a coloração panótica rápida.

Um total de 100 células em cada lâmina foi analisado em microscópio óptico (objetiva de 100X), considerando-se a morfologia nuclear, a coloração citoplasmática e a presença ou ausência de granulações. A partir disso foi estabelecido o percentual de cada tipo celular (*Linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e LG-PAS*).

2.9. Análise físico química da água

A coleta da água foi realizada em uma profundidade média de aproximadamente 10 cm da superfície do espelho d' água. Dois litros de água foram coletados em cada ponto de amostragem e encaminhados para o Laboratório de Análises Minerais, Solos e Água (LAMSA) da UFPE para determinação analítica de sete íons metálicos (cádmio, chumbo, cobre, cromo, ferro, manganês, e zinco). A medição de seis variáveis ambientais (pH, temperatura, condutividade, sólidos totais dissolvido e oxigênio dissolvido) foram realizadas por meio de uma sonda multiparâmetro (YSI Incorporated 650 MDS - Multiparameter

Display System, USA). Vale ressaltar que o material enviado ao LAMSA ficou acondicionado em ambiente refrigerado a 4°C até a realização das análises.

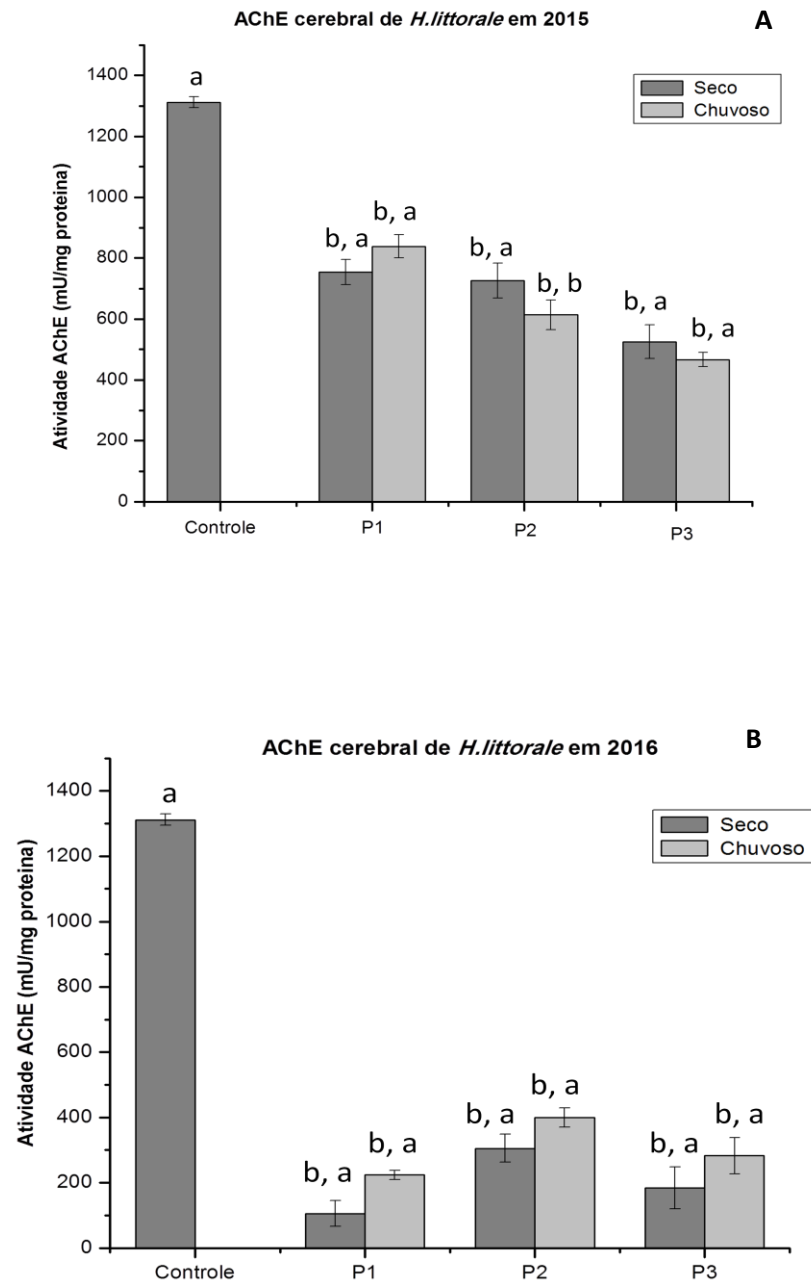
A determinação analítica dos íons metálicos ocorreu mediante espectrofotometria de absorção atômica (aparelho CG AA 7000), segundo a metodologia da 21^a edição do Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (2005).

2.10. *Análise estatística*

Para todos os ensaios foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, após as premissas de normalidade, utilizando o software Microcal™ Origin® version 8.0.

3. RESULTADOS

Os resultados das análises de atividades enzimáticas da AChE evidenciaram a presença de agentes anticolinesterásicos nas águas do riacho Cavouco, uma vez que ocorreu decréscimo estatisticamente significativo na atividade específica dessa enzima, nas amostras de cérebro e músculo de Tamoatá provenientes do riacho, em relação as amostras controle (1312,0 mU.mg de proteína⁻¹), em todos os períodos analisados (Figura 2). Contudo, a análise comparativa entre os pontos de amostra, em diferentes estações do mesmo ano, não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$), com exceção do ponto P1 (Teatro), que apresentou redução de atividade da AChE muscular no verão, tanto em 2015 (inibição de 48,5% em relação ao inverno) quanto em 2016 (inibição de 32,8%) (figura 2 B e D). O maior decréscimo na atividade da AChE cerebral e muscular de tamoatá ocorreu no ano de 2016, sendo os pontos P1 (Teatro) e P3 (HC) os mais impactados, com inibição de mais de 60%.



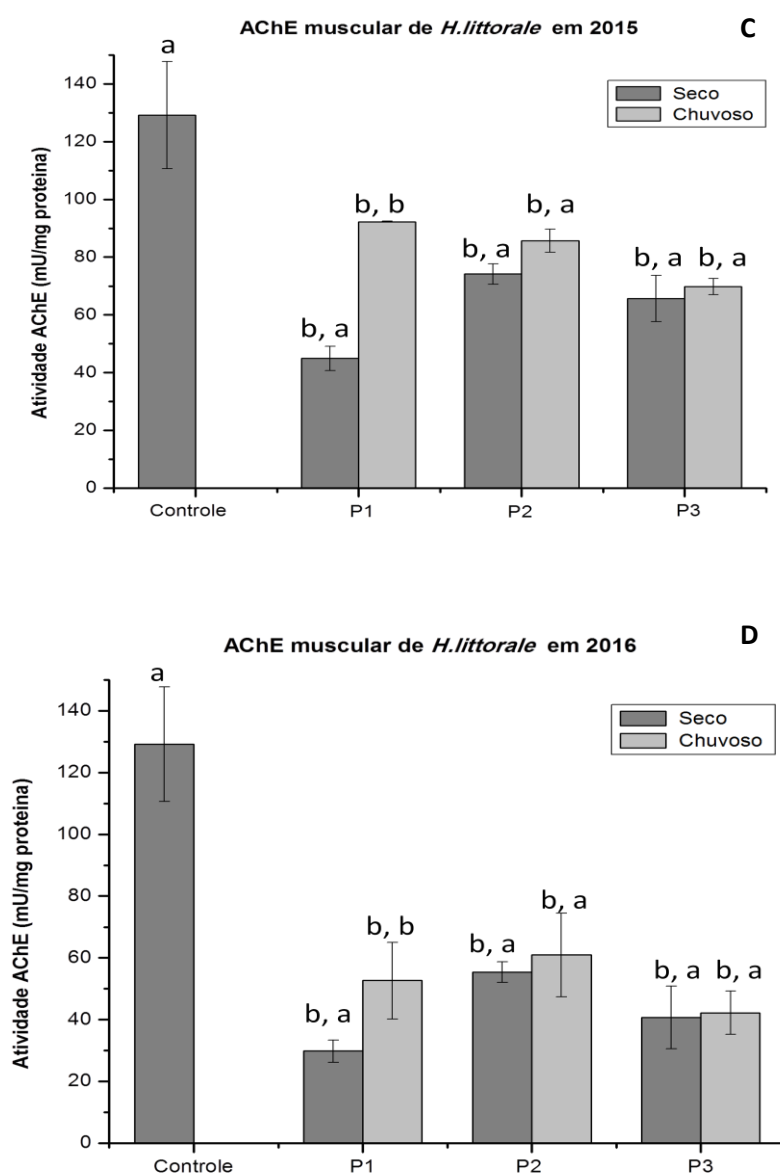
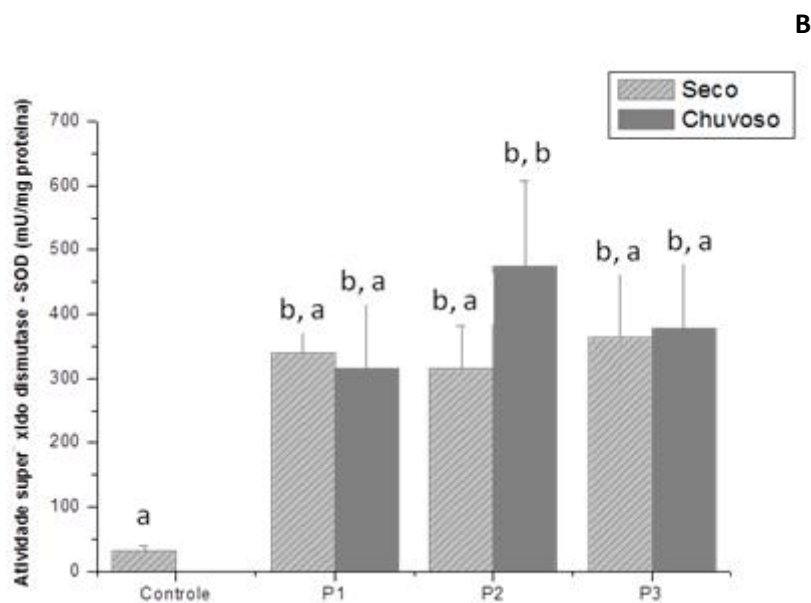
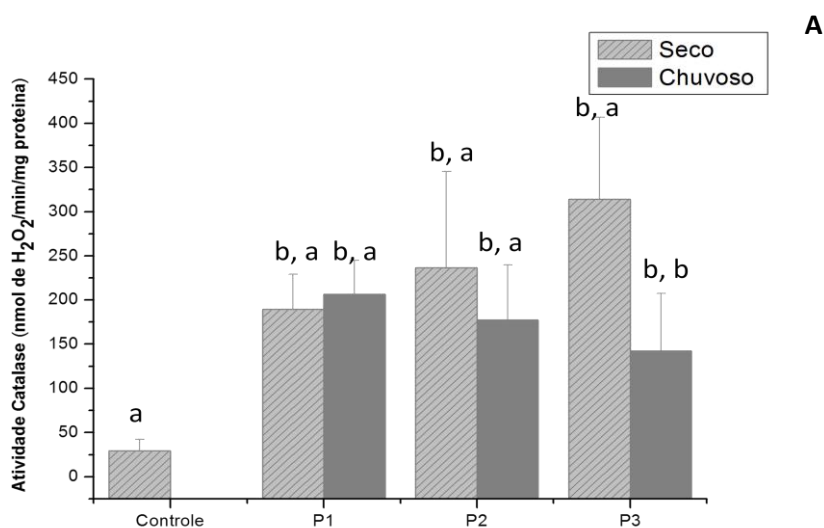


Figura 2 – Atividade da AChE em amostras de cérebro e músculo de *H. littorale* provenientes da população controle e de três pontos do riacho Cavouco em 2015 (A e B) e 2016 (C e D). Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa através de comparação de médias com ANOVA seguida de teste Tukey ($p = 0,05$).

A atividade da CAT hepática de *H. littorale*, nos indivíduos capturados nos três pontos do Cavouco, sofreu um acréscimo significativo em comparação com os indivíduos do grupo controle em ambos os períodos seco e chuvoso, nos anos de 2015 e 2016 (Figura 3A e 3C). O ponto P3 apresentou as médias mais altas nos dois anos, sempre na estação seca (10,6 e 11,38 vezes em relação ao controle, respectivamente). Apenas em 2015, e no ponto P3, houve

diferença significativa entre as médias dos períodos seco e chuvoso. A atividade da SOD hepática apresentou comportamento ligeiramente similar ao da CAT. Todos os pontos de coleta diferiram significativamente do controle (Figura 3B e 3D), apresentando as maiores médias geralmente na estação chuvosa, porém sem diferir significativamente entre si.



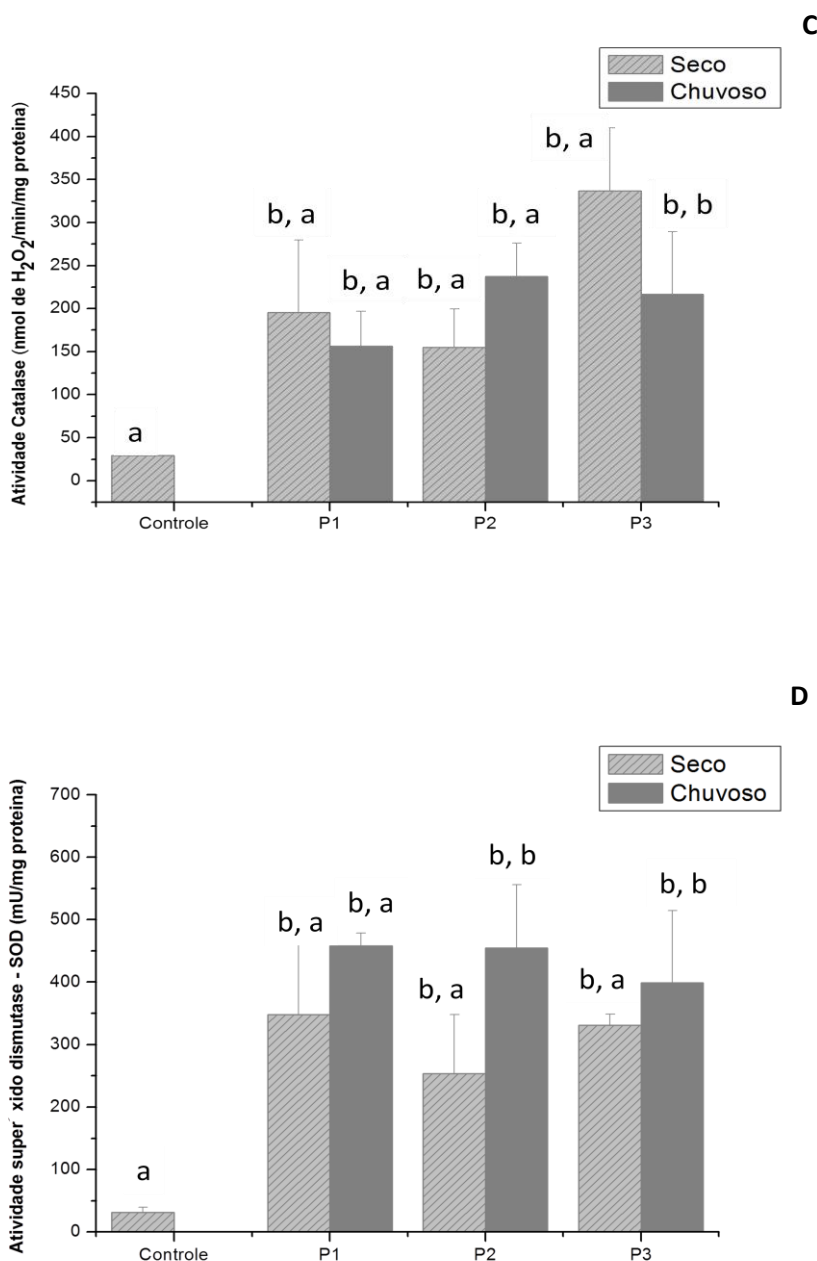


Figura 3 – Atividade da CAT e SOD em amostras de fígado de *H. littorale* provenientes da população controle e de três pontos do riacho do Cavouco em 2015 (A e B) e 2016 (C e D). Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa através de comparação de médias com ANOVA seguida de teste Tukey ($p = 0,05$).

A quantificação da peroxidação lipídica nos tecidos hepáticos está descrita na Figura 4, que demonstrou a tendência das médias dos pontos de coleta apresentarem valores de MDA significativamente acima dos valores dos controles nos anos de 2015 e 2016 (Figura 4A e 4B). Os pontos P1 (período chuvoso) e P3 (período seco) apresentaram médias significativamente maiores que as demais.

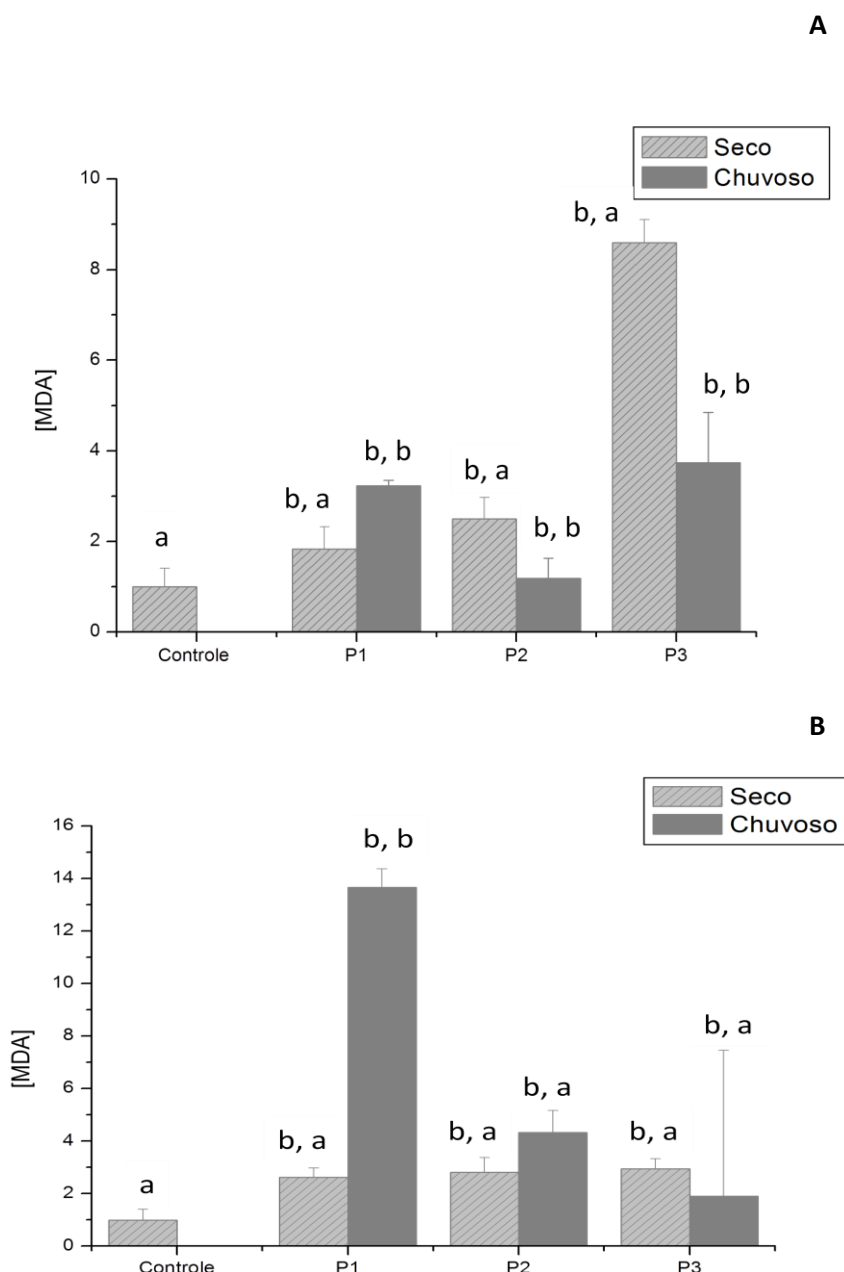
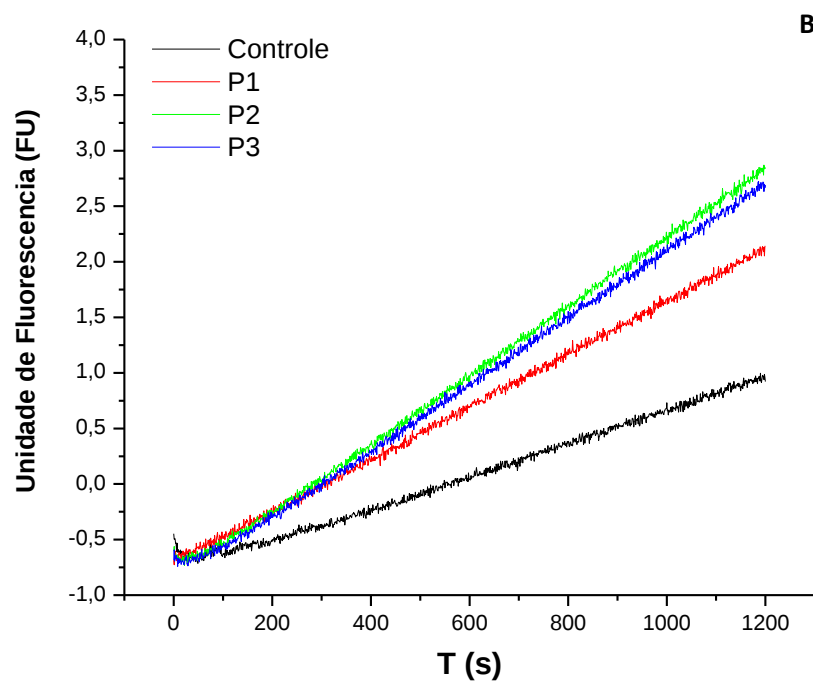
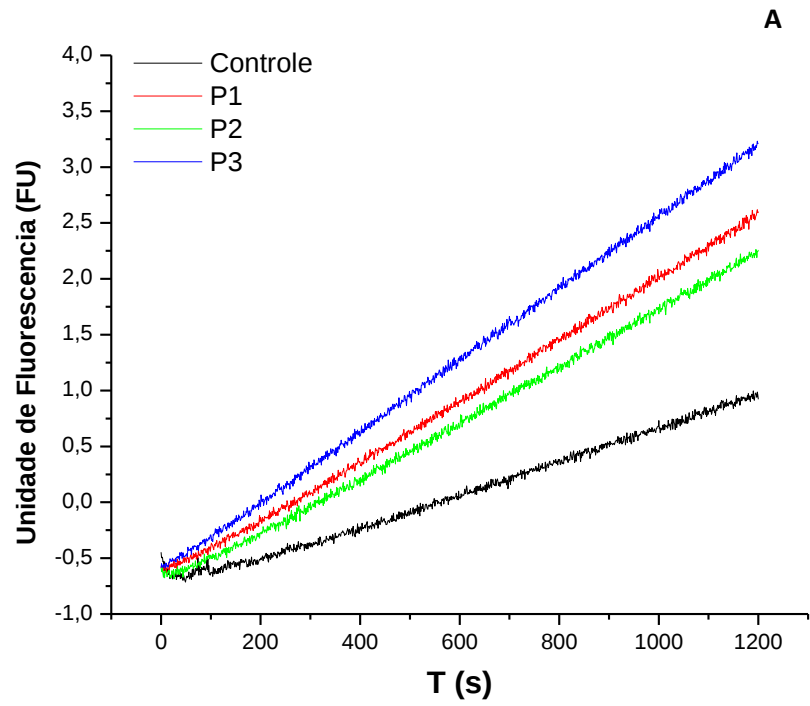


Figura 4 – Peroxidação lipídica descrita em níveis de MDA em amostras de fígado de *H. littorale* provenientes da população controle e de três pontos do riacho do Cavouco em 2015 (A) e 2016 (B). Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa através de comparação de médias com ANOVA seguida de teste Tukey ($p = 0,05$).

O óxido nítrico no tecido hepático de *H. littorale* seguiu a mesma tendência de diferença entre os pontos de coleta e o controle (Figura 5). Todos os pontos de coleta, em todos os períodos dos anos amostrados, apresentaram produção superior de $\text{NO}^{\cdot}$ em comparação ao grupo controle. Outra tendência observada foi a produção maior de $\text{NO}^{\cdot}$ nas amostras do ponto P3 no período seco e em amostras do ponto P2 na estação chuvosa.



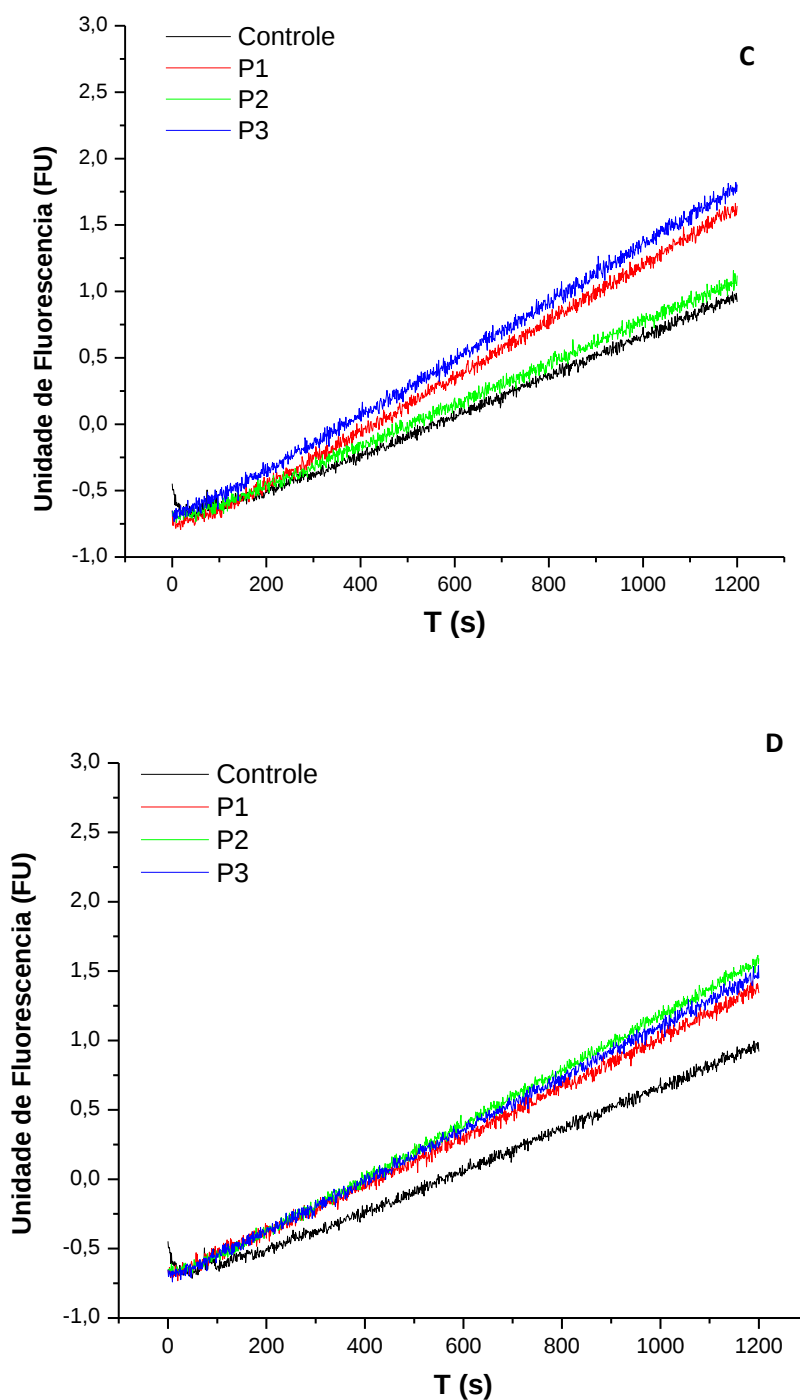
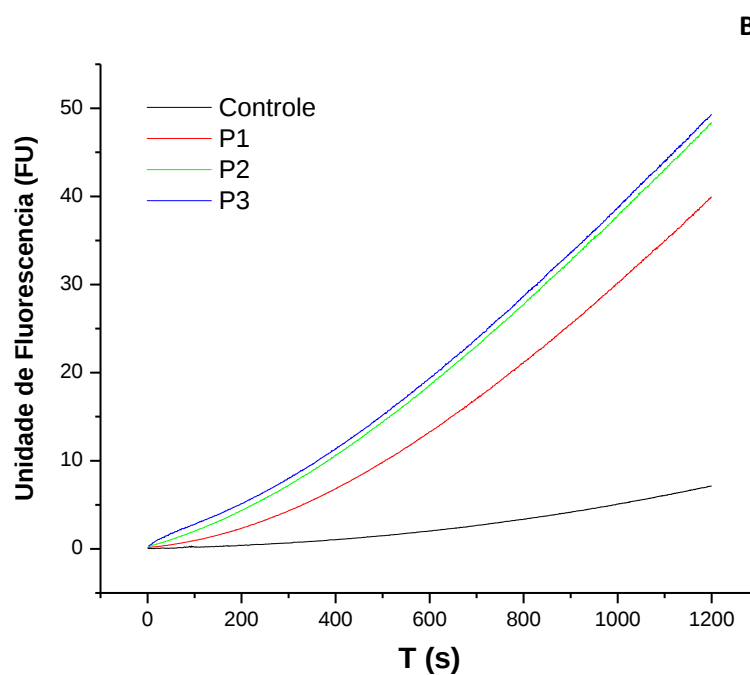
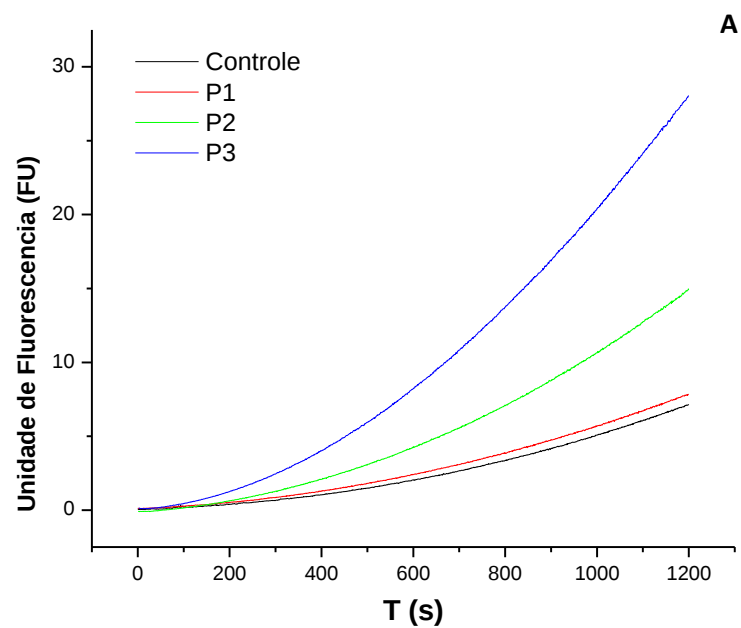


Figura 5 – Produção de óxido nítrico (NO') em amostras de fígado de *H. littorale* provenientes da população controle e de três pontos do riacho do Cavouco nos períodos seco e chuvoso de 2015 (A e B, respectivamente) e períodos seco e chuvoso de 2016 (C e D, respectivamente).

A figura 6 apresenta a formação de espécies reativas de oxigênio totais (ROS) demonstrando comportamento de aumento exponencial mais acentuado nas amostras dos pontos de coleta em relação ao controle. Com exceção da estação chuvosa de 2016 (Figura 6D), nas demais coletas as amostras do ponto 3 apresentaram a maior produção de ROS do que os demais pontos.



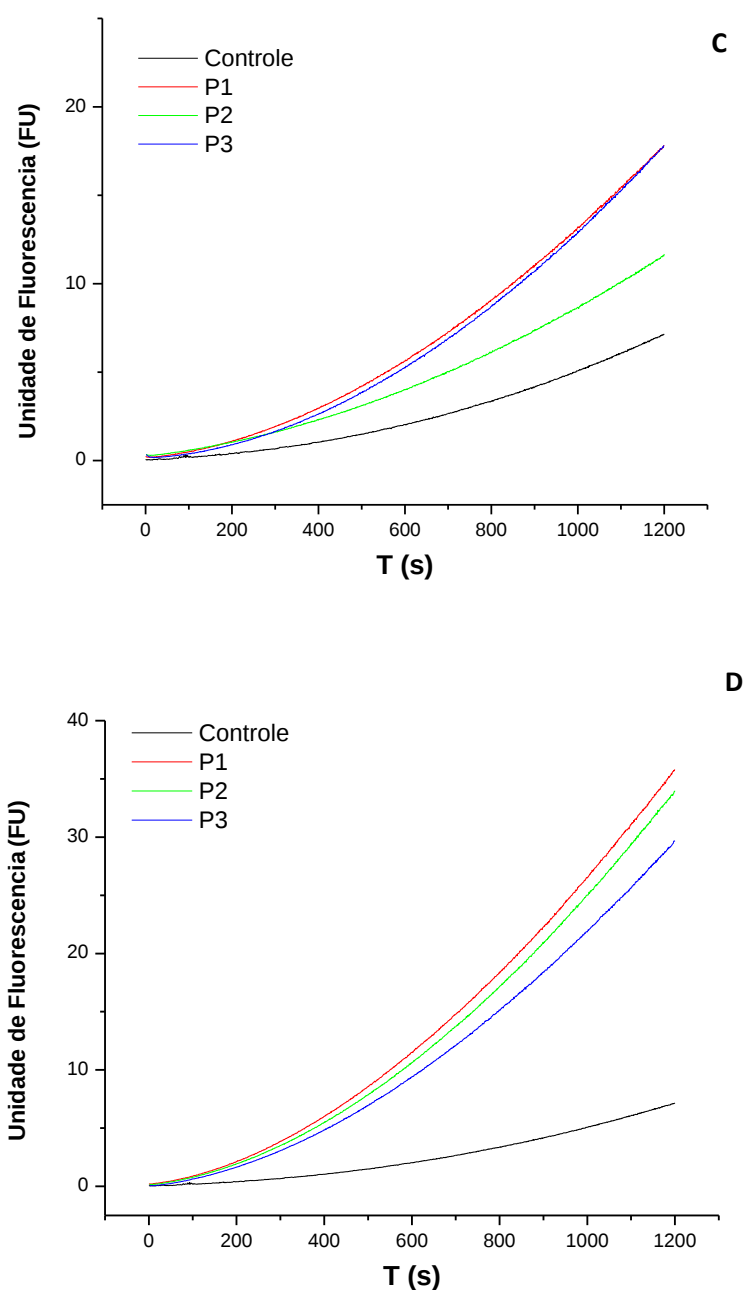


Figura 6 – Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em amostras de fígado de *H. littorale* provenientes da população controle e de três pontos do riacho do Cavouco nos períodos seco e chuvoso de 2015 (A e B, respectivamente) e períodos seco e chuvoso de 2016 (C e D, respectivamente).

A contagem diferencial de leucócitos demonstrou o aumento significativo de neutrófilos concomitantemente à redução também significativa de linfócitos em todas as coletas dos dois anos, em ambas as estações, seca e chuvosa em comparação ao controle. Tal acréscimo no número de neutrófilos e decréscimo de linfócitos, correspondeu praticamente a uma inversão em seus valores (Tabelas 1 e 2) e se refletiu de forma significativa na relação neutrófilos/linfócitos em comparação com o controle e sem diferença significativa entre os pontos (Figura 7A e 7B). Houve um acréscimo não significativo de monócitos dos pontos de coleta do Cavouco em relação ao controle enquanto o leucócito LG-PAS não sofreu alterações em seus níveis basais. Não foram encontrados Eusínófilos e Basófilos no sangue de *H.littorale*.

Tabela 1. Perfil leucocitário de *H.littorale* em 2015. Valores (%) média e erro padrão.

Períodos de amostragem	Tipos de células	Grupos experimentais			
		Controle	P1	P2	P3
Seco	Linfócito	71,4 ± 14,4	28,7 ± 17,4	22,4 ± 17,2	20,1 ± 16,4
	Neutrófilo	28,4 ± 14,7	69,2 ± 17,8	76,3 ± 17,7	76,8 ± 16,4
	Monócito	0,25 ± 0,7	1,66 ± 4,27	1,10 ± 1,4	2,33 ± 4,6
	LG-PAS	0,2 ± 0,69	0,27 ± 1,01	0,10 ± 0,63	0,50 ± 1,32
Chuvoso	Linfócito	-	23,25 ± 13,0	32,4 ± 10,4	25,6 ± 9,84
	Neutrófilo	-	73,0 ± 15,8	66,6 ± 9,7	72,1 ± 11,4
	Monócito	-	3,55 ± 7,35	0,90 ± 1,9	2,25 ± 4,71
	LG-PAS	-	0,2 ± 0,69	0,05 ± 0,3	0,5 ± 1,05

Tabela 2. Perfil leucocitário de *H.littorale* em 2016. Valores (%) média e erro padrão.

Períodos de amostragem	Tipos de células	Grupos experimentais			
		Controle	P1	P2	P3
Seco	Linfócito	71,4 ± 14,4	20,1 ± 15,0	37,9 ± 19,5	22,8 ± 17,8
	Neutrófilo	28,4 ± 14,7	77,2 ± 15,6	59,3 ± 20,4	72,5 ± 18,9
	Monócito	0,25 ± 0,7	2,35 ± 4,34	1,95 ± 3,78	3,2 ± 2,22
	LG-PAS	0,2 ± 0,69	0,3 ± 0,69	0,75 ± 1,58	1,45 ± 1,79
Chuvoso	Linfócito	-	26 ± 10,2	38,7 ± 21,8	35,0 ± 10,8
	Neutrófilo	-	71,6 ± 10,6	58,9 ± 21,8	62,4 ± 10,6
	Monócito	-	1,85 ± 2,5	1,75 ± 3,06	1,9 ± 1,14
	LG-PAS	-	0,5 ± 1,5	0,6 ± 1,81	0,6 ± 0,67

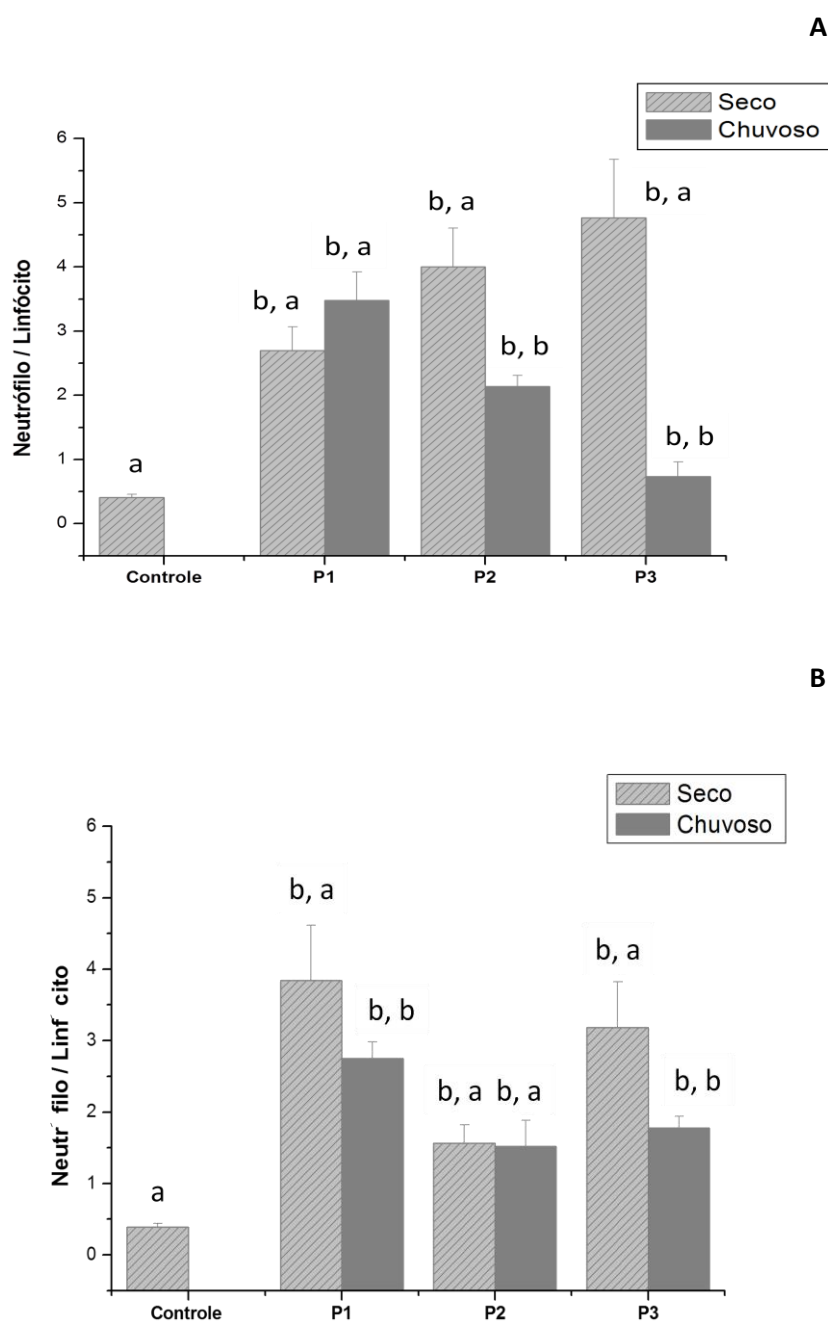


Figura 7. Relação entre neutrófilos e linfócitos de três pontos do riacho Cavouco nos anos de 2015 e 2016. Diferentes letras no topo das barras representam diferença significativa através da comparação de médias com ANOVA seguida do teste de Tukey ($p = 0,05$). A primeira letra refere-se ao controle, e a segunda letra refere-se ao período de coleta (verão e inverno).

Os resultados das análises *in situ* da qualidade físico-química da água demonstraram que a maioria dos parâmetros analisados situaram-se dentro dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA n. 357/2005. O oxigênio dissolvido foi o principal parâmetro fora dos padrões recomendados pela referida resolução (abaixo de 5 mg/L) nas amostras de água do grupo controle e dos pontos de coleta na estação seca. Porém, tendo em vista os resultados apresentados das atividades enzimáticas, parâmetros de estresse oxidativo e geração de radicais livres, o baixo oxigênio nas amostras do grupo controle parece não ter prejudicado os espécimes desse tratamento tendo em vista que o Tamoatá é um peixe que apresenta respiração facultativa. Todos os metais pesados analisados nos dois anos estavam em concentrações abaixo dos limites preconizados na mesma resolução, porém sabe-se que mesmo em concentrações subletais os metais podem afetar os ecossistemas aquáticos.

Tabela 3. Análise físico-química da água em três pontos do riacho Cavouco no período seco (verão) e chuvoso (inverno) de 2015.

Ano 2015		Verão			Inverno			Valor máximo permitido (VMP) pela resolução CONAMA n°357 de 17/03/2005
Parâmetros	Controle	P1	P2	P3	P1	P2	P3	
pH	7-8	6-7	6-7	6-7	7-8	7-8	7-8	6-9
Temperatura (°C)	27,4	27,2	28,7	31,6	30	29,7	34,6	< 40°C
Condutividade (µS/cm)	1,069	0,266	0,880	0,257	1,126	0,899	1,013	100 µS/cm
STD (mg/L)	0,664	0,166	0,533	0,188	0,683	0,536	0,556	500 mg/L
Salinidade(‰)	0,50	0,12	0,40	0,11	0,51	0,40	0,41	≤ 0,5 ‰ (água doce)
OD (mg/L)	1,52	2,04	4,43	8,60	14,69	23,2	6,82	> 5 mg/L
Ferro total (mg/L em Fe)	0,19	0,12	0,73	0,71	0,19	0,14	0,11	15,0 mg/L em Fe
Manganês (mg/L em Mn)	0,06	0,10	0,08	0,13	0,26	0,25	0,25	1,0 mg/L em Mn
Cádmio (mg/L em Cd)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,2 mg/L em Cd
Chumbo (mg/L em Cu)	ND	0,01	ND	0,03	0,01	0,01	ND	0,5 mg/L em Pb
Cobre (mg/L em Fe)	ND	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	1,0 mg/L em Cu
Cromo (mg/L em Cr)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,5 mg/L em Cr
Zinco (mg/L em Zn)	ND	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,2 mg/L em Zn

Tabela 4. Análise físico-química da água em três pontos do riacho Cavouco no período seco (verão) e chuvoso (inverno) de 2016.

Ano 2016		Verão			Inverno			Valor máximo permitido (VMP) pela resolução CONAMA n°357 de 17/03/2005
Parâmetros	Controle	P1	P2	P3	P1	P2	P3	
pH	7-8	6-7	6-7	6-7	7-8	7-8	7-8	
Temperatura (°C)	27,4	29,09	29,9	28,7	30	29,3	28,8	< 40°C
Condutividade (µS/cm)	1,069	0,621	0,661	0,688	1,072	0,851	0,775	100 µS/cm
STD (mg/L)	0,664	0,375	0,393	0,418	0,637	0,511	0,470	500 mg/L
Salinidade	0,50	0,28	0,29	0,31	0,48	0,38	0,35	≤ 0,5 ‰ (água doce)
OD (mg/L)	1,52	1,55	1,04	1,6	15,95	5,12	5,0	> 5mg/L
Ferro total (mg/L em Fe)	0,19	0,09	0,13	0,29	0,49	0,76	0,44	15,0 mg/L em Fe
Manganês (mg/L em Mn)	0,06	0,18	0,11	0,06	0,21	0,24	0,15	1,0 mg/L em Mn
Cádmio (mg/L em Cd)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,2 mg/L em Cd
Chumbo (mg/L em Cu)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,5 mg/L em Pb
Cobre (mg/L em Fe)	ND	0,03	0,1	ND	ND	0,03	0,01	1,0 mg/L em Cu
Cromo (mg/L em Cr)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,5 mg/L em Cr
Zinco (mg/L em Zn)	ND	ND	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,2 mg/L em Zn

Metodologia utilizada: Sonda Multiparâmetro para qualidade da água YSI Incorporated 650 MDS (Multiparameter Display System) USA.

Metais: Standard Methods for the examination of water and waste water. 20ª edição American Public Health Association, 1998.

ND (Não detectável) por Espectrofotometria de Absorção Atômica (aparelho CG AA7000 BC)

4. DISCUSSÃO

A AChE é uma enzima que atua na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas e sua inibição por poluentes químicos, principalmente pesticidas e metais pesados é amplamente relatada na literatura (ASSIS et al., 2010; BOTTÉ et al., 2012; SILVA et al., 2013; DAI et al., 2014; GHAZALA et al., 2014; WANG et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016; SOUZA et al., 2018). Segundo a Food Agriculture Organization (FAO, 2007), a partir de 20% de inibição da atividade colinesterásica considera-se em uma amostra a presença de um agente anticolinesterásico. Neste trabalho a AChE do Tamoatá foi fortemente inibida, apresentando diferença estatística do controle em todos os períodos analisados. Os espécimes coletados no ano de 2016 foram significativamente mais afetados e a inibição da AChE muscular ultrapassou 60%, confirmando a presença de agentes anticolinesterásicos nas águas do riacho Cavouco, o que pode vir a comprometer a sobrevivência das espécies. Este

resultado pode ser atribuído ao menor volume de chuva que houve neste ano em relação ao ano de 2015 (precipitação média anual = 141,58 mm e 165,54 mm, respectivamente, de acordo com a Agência Pernambucana de Águas e Climas - APAC), o que contribuiu para uma maior concentração de poluentes e consequentemente maior exposição dos espécimes a agentes anticolinesterásicos. Estes resultados evidenciaram alterações importantes na atividade da enzima AChE, confirmando esta enzima como pontencial biomarcador com características capaz de refletir o *status* de poluição no ambiente aquático.

Estudos relatam que a carga de poluentes presentes no “Cavouco” é composta principalmente de substâncias químicas, resíduos hospitalares e efluentes domésticos (ARAÚJO e OLIVEIRA, 2013; PURIFICAÇÃO JÚNIOR et al., 2016). Tais compostos são carregados para o solo e corpos d’água e se acumulam nos sedimentos onde vivem e se alimentam as espécies que constituem os elos iniciais da cadeia alimentar da qual o Tamoatá faz parte, uma vez que é um peixe onívoro e bentônico (Kubitza, 2000; Tomita e Beyruth, 2002). Além disso, a poluição orgânica proveniente principalmente do esgoto doméstico propicia a proliferação de microalgas, dentre elas, as cianobactérias (principalmente do gênero *Anabaena sp.*) produtoras de cianotoxinas anticolinesterásicas como a anatoxina-a(s) (ASSIS et al., 2011). Florações dessas cianobactérias já foram descritas nos rios da bacia do rio Capibaribe, do qual o riacho Cavouco faz parte (MOLICA et al., 2005). A anatoxina-a(s) é considerada um análogo natural dos compostos organofosforados porque sua estrutura é similar à forma oxônica desses pesticidas (a qual inibe diretamente a enzima). Seu efeito deletério sobre a AChE é aproximadamente 1.000 vezes maior do que o do inseticida paration (MAHMOOD e CARMICHAEL, 1986; VILLATTE et al., 2002; ASSIS et al., 2011).

Diversos estudos indicam que a má qualidade da água devido à poluição por resíduos agrícolas, industriais e domésticos em áreas urbanas propiciam a ocorrência de estresse oxidativo devido à geração excessiva de radicais livres (RLs) e espécies reativas de oxigênio (AKINROTIMI et al., 2007; SERIANI et al., 2009; GABRIEL et al., 2010; SERIANI et al., 2010; NTE et al., 2011; SERIANI et al., 2011; EL-BASSYOUNI, et al., 2012; GABER et al., 2013). Deste modo, os organismos aeróbicos apresentam diferentes mecanismos de defesa que facilitam a remoção das ROS do organismo. Dentre esse mecanismos, o sistema de defesa enzimática, constituído por um série de enzimas, dentre elas a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), têm como objetivo limitar os níveis intracelulares dessas espécies reativas e controlar a ocorrência de danos (SHAMI e MOREIRA, 2004). Os resultado da análise dessas enzimas no fígado de Tamoatá indicam que o riacho cavouco encontra-se impactado com poluentes que geram estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio e/ou

radicais livres tais como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxil. Estas moléculas atuam elevando a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) que utilizam esses compostos como seus substratos específicos (ATLI e CANLI, 2007). Em todos os períodos analisados nesse estudo, tanto a SOD quanto a CAT se apresentaram alteradas em relação ao controle com atividades aumentadas indicando que estas enzimas estavam catalisando ativamente as suas respectivas reações para diminuir a toxicidade desses RLs no organismo. Muitos contaminantes ou seus metabólitos tem potencial para induzir essas enzimas pela formação de RLs como, por exemplo, os metais pesados. Assim, a avaliação das enzimas antioxidantes permite estimar o estado das defesas dos organismos e por este motivo tem sido bastante utilizadas como biomarcadores de danificação oxidativa em programas de monitoramento (COGO et al., 2009).

Outra consequência do aumento de ROS e de outros radicais livres no organismo é a peroxidação lipídica. O processo de peroxidação lipídica leva ao desgaste dos lipídeos, especialmente na membrana celular, e também é um importante indicativo do dano oxidativo. A peroxidação lipídica pode ocorrer em tecidos, fluidos e lipoproteínas, podendo causar desde reduções localizadas na fluidez da membrana até a ruptura total da integridade da bicamada (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2005). Um dos produtos da peroxidação lipídica mais estudados são os aldeídos (malondialdeído [MDA]). Estes compostos têm alta capacidade para alterar a permeabilidade e integridade das membranas celulares levando ao dano oxidativo (AZEVEDO et al., 2018). Através da avaliação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), o malondialdeído (MDA) é amplamente estudado como marcador para peroxidação lipídica, principalmente devido ao baixo custo e rapidez desta metodologia. Neste estudo, os resultados do TBARS indicaram um aumento da peroxidação lipídica em fígado de Tamoatá uma vez que os dados dos pontos investigados foram significativamente altos em relação ao controle. Alguns estudos tem demonstrado o aumento da peroxidação lipídica em peixes expostos a diversos tipos de contaminantes. STEGEMAN et al. (1992), por exemplo, verificou o aumento da peroxidação lipídica em Carpas expostas ao agrotóxico Paraquat e em bagres expostos a sedimento contaminado com PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbon) . Assim, a peroxidação lipídica é um parâmetro com potencial para ser utilizada como biomarcador e indicativo de dano oxidativo em membranas celulares.

Estes resultados anteriormente citados são corroborados pela produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (óxido nítrico) obtidos nesse estudo. As espécies reativas de oxigênio participam de inúmeros processos fisiológicos, incluindo crescimento celular normal, morte celular programada e senescencia celular. Portanto, os radicais livres tem um

papel fisiológico importante na sinalização celular redox. Apesar de serem essenciais para as respostas biológicas, em algumas ocasiões, o aumento da produção dessas espécies pode resultar em respostas deletérias ao organismo (OGA, et al., 2008). As células endoteliais produzem uma espécie radical importante, o óxido nítrico ($\cdot$ NO). Em condições normais, o óxido nítrico atua como um segundo mensageiro importante para o relaxamento dos vasos sanguíneos, atuando também na regulação da função imune e como neurotransmissor. No entanto o óxido nítrico também pode ser potencialmente lesivo quando produzido em excesso. O ponto P3 foi o que teve a maior taxa de produção de ROS e NO. Este ponto é caracterizado por receber alta concentração de efluente hospitalar, que contém uma variedade de contaminantes que propiciam o aumento das espécies reativas de oxigênio e RLs. O aumento desses radicais livres afeta o sistema de defesa antioxidante necessário para prevenir, interceptar e reparar danos celulares (CHANDRAN et al. 2005; GU, 2006; ATLI e CANLI, 2007; MONSERRAT et al. 2008). Além disso, este ponto localiza-se a jusante dos demais pontos investigados recebendo e acumulando, portanto, os esgotos provenientes dos pontos anteriores. De acordo com os resultados obtidos fica evidente que o ponto P3 está sendo diretamente prejudicado por poluentes com potencial para exercer sua toxicidade gerando estresse oxidativo.

O estresse oxidativo afeta também os parâmetros sanguíneos de peixe, interferindo na atividade hematopoiética já que são desprovidos de medula óssea e de linfonodos (SHERIDAN & MOMMSEN 1991; RANZANI -PAIVA et al. 2005; TAVARES DIAS et al. 2007; BARROS et al. 2009; STOSKOPF, 2010; SERIANE et al. 2011). Desta forma, as principais células sanguíneas atingidas pela ocorrência do estresse oxidativo, são as células de defesa. Por este motivo, atualmente, os parâmetros sanguíneos de peixes, vêm sendo utilizados como uma ferramenta auxiliar no monitoramento do bem-estar animal. Alterações na contagem relativa de células sanguíneas de defesa podem indicar a ocorrência de processos infecciosos (THOMÉ et al., 2016). A relação neutrófilos/linfócitos, por exemplo, segundo Davis et al. (2008) é o parâmetro de maior relevância para avaliar o estado de sanidade dos animais. Igualmente ao que acontecem com os mamíferos, os peixes portadores de infecção apresentam neutrofilia (aumento no número de neutrófilos) com linfopenia relativa (diminuição do número de linfócitos). Ou seja, em peixes sadios é comum uma frequência maior de linfócitos, que são as células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e pela montagem da resposta imune (DELBON, 2010; SILVA, 2012b; VIADANNA, 2012; WEINERT, 2014). Neste trabalho, neutrófilos foram encontrados em grande concentração no sangue dos espécimes de *H. littorale* coletados nos pontos de amostragem do riacho Cavouco

e a relação neutrófilo/linfócito foi significativamente alta. Este resultado indica que os peixes coletados no Cavouco estão enfrentando um processo infeccioso. Este dado é corroborado pela presença de monócitos que são células que atuam na reação inflamatória e resposta imunológica nas quais ocorre a fagocitose, além da presença de LG-PAS, que, embora não tenha sua função totalmente elucidada, evidências apontam para uma provável migração desta célula para focos inflamatórios (MARTINS et al., 2009). Os neutrófilos são os primeiros leucócitos fagocíticos em resposta a infecções. Em peixes, aumento do número de neutrófilos tem sido relacionado a doenças (CAMPBELL, 2006; TAVARES-DIAS et al., 2008b; DAVIS et al., 2008). Por outro lado, os tipos leucocitários eosinófilo e basófilo, não foram encontrados no sangue de *H.littorale*. Essa ausência pode ser devida a baixa frequência dessas células no sangue periférico dos peixes (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003; TAVARES-DIAS, 2006). Os eosinófilos e basófilos se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastrointestinal e nas brânquias. A função dessas células nos peixes não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que estas intervêm nos processos de inflamação crônica e na defesa celular, sendo encontradas na corrente sanguínea quando há infestação por parasitos (TAVARES-DIAS E MORAES, 2004). As características morfológicas dos leucócitos de peixes variam relativamente pouco de espécie para espécie (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Porém, alguns peixes não possuem heterófilos, LG-PAS (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004), eosinófilos e/ou basófilos (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; CAMPBELL, 2006). Em *H. littorale* foram encontrados linfócitos, monócitos, neutrófilos e LG-PAS, com características morfológicas similares a diversas outras espécies da literatura (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; JERÔNIMO et al., 2009). Monócitos e LG-PAS foram os leucócitos com menor frequência no sangue periférico de *H.littorale*, a exemplo de outros peixes de água doce (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; CAMPBELL, 2006; TAVARES-DIAS et al., 2008a; JERÔNIMO et al., 2009). Porém, linfócitos e neutrófilos representaram mais de 90% dos leucócitos sanguíneos desse peixe, a semelhança do que está relatado para vários outros peixes de diferentes famílias (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; CAMPBELL, 2006; JERÔNIMO et al., 2009). Em *H. littorale*, o número de linfócitos e neutrófilos foi maior que o descrito para *Prochilodus lineatus* e *Leporinus macrocephalus* (TAVARES-DIAS et al., 2008a) e semelhante ao descrito em *Oxydoras niger*, enquanto o número de monócitos LG-PAS foi similar (SANTOS e TAVARES-DIAS, 2010). Contudo, essas variações interespecíficas se devem às diferentes condições ecofisiológicas (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; CAMPBELL, 2006;

TAVARES-DIAS et al., 2008a) e características imunológicas peculiares de cada espécie de peixe (TAVARES-DIAS e MORAES, 2007; TAVARES-DIAS et al., 2008a).

Ao analisar a qualidade da água do riacho cavouco, os resultados da análise físico-química da água indicam que o “Cavouco” está impactado devido ao baixo teor de oxigênio dissolvido e presença de alguns metais pesados (ferro, manganês, zinco, chumbo e cobre), que embora estejam dentro dos limites estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (resolução nº 357/2005) podem estar afetando os parâmetros sanguíneos dos peixes (Tabelas 1 e 2). Sabe-se que alguns metais como o cobre, acumulam-se principalmente no fígado dos peixes, em que os seus efeitos biológicos são significativos, mesmo em baixas concentrações, causando diversos distúrbios hepáticos. Hedayati & Ghaffari, (2013), por exemplo, encontraram que diferentes concentrações de cobre podem causar alterações hematológicas, bioquímicas e imunológicas em carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitri*). A principal influência tóxica do cobre está ligada à sua valência, para catalisar respostas oxidantes, conduzindo à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes compostos reativos podem também causar alterações nos tecidos e alterações de alguns parâmetros fisiológicos, levando ao estresse oxidativo (HEDAYATI & GHAFFARI, 2013). Hedayati (2012) estudando *Acanthopagrus latus* verificou que mercúrio causa severas alterações nos parâmetros sanguíneos e metabólicos, confirmando que a contagem de leucócitos pode ser considerada como um biomarcador de poluição por mercúrio na espécie estudada. Vinodhini & Narayanan (2009) estudando o impacto de metais pesados sobre parâmetros hematológicos em carpa comum (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) observaram que as concentrações de células vermelhas do sangue, glicemia e colesterol total foram significativamente elevadas. Segundo a agência ATSDR (2005), o chumbo pode alterar o sistema hematológico por inibição da atividade de diversas enzimas. Em relação ao baixo oxigênio dissolvido no riacho Cavouco, em estudos de hipóxia em *H. littorale* realizado por Moura et al. 2013 apenas linfócitos e neutrófilos foram encontrados em esfregaços de sangue, enquanto outros autores relataram linfócitos circulantes, monócitos, neutrófilos e eosinófilos (TAVARES-DIAS e BARCELOS, 2005). Esses achados contraditórios indicam que uma análise padrão baseada apenas em características morfológicas é insuficiente para identificar toda a população de leucócitos em *H. littorale*.

Os estudos dos parâmetros hematológicos dos peixes têm sido recomendados para diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas e de estresse (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2007), sendo considerado um bom biomarcador para monitoramento ambiental, uma vez que constitui um método não destrutivo e simples

(SERIANI e RANZANI-PAIVA, 2012). Adicionalmente, os parâmetros bioquímicos em peixes provaram serem índices sensíveis para a avaliação de metabolismo dos peixes sob estresse.

5. CONCLUSÃO

Tendo em vista que a análise da atividade da AChE apresentou decréscimo em relação ao controle em todos os períodos analisados, e que a atividade das enzimas CAT e SOD demonstraram maior estresse oxidativo nos espécimes dos pontos de coleta em relação ao controle (também em todos os períodos analisados) e que esses resultados foram corroborados pelos níveis de TBARS, geração de ROS e NO $\cdot$, é possível sugerir a presença de agentes poluentes nas amostras de água do Cavouco, nos períodos investigados.

A resposta hematológica obtida pela contagem diferencial de leucócitos indicou, através da relação neutrófilos/linfócitos e contagem de monócitos e leucócitos LG-PAS, a presença de agentes infecciosos nas mesmas amostras.

Os metais analisados estavam em concentrações abaixo das recomendadas na legislação em vigor e o único parâmetro físico-químico fora das especificações da legislação foi o oxigênio dissolvido, que não afetou os espécimes de *H. littorale* por apresentar respiração facultativa. Já os metais embora esteja dentro das especificações sabe-se que mesmo em concentrações sub-letais estes tem potencial para afetar os organismos aquáticos.

Sendo assim, os fatores físico-químicos tiveram pouca influência sobre as respostas bioquímicas e fisiológicas nos tecidos analisados e tais respostas podem ser atribuídas à presença de agentes anticolinesterásicos, de poluentes específicos de efluentes laboratoriais e hospitalares (do entorno dos pontos de coleta) e à presença de agentes infecciosos na água do riacho Cavouco.

Os parâmetros analisados no presente trabalho apresentaram seletividade importante quanto à natureza dos poluentes presentes nas águas do riacho Cavouco, nos períodos analisados, e apresentaram potencial para serem incluídos em programas de monitoramento não apenas no referido riacho, mas também em outros corpos d'água de características similares.

6. REFERÊNCIAS

AEBI, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105,121-126.

ARAÚJO, M. C.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, L. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, K. C. C.; LIMA, A. V. A.; CARVALHO JR., L. B.; BEZERRA, R. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdã, v. 177, p. 182-189, 2016.

ARAÚJO, M.C. ; OLIVEIRA, M.B.M. Monitoring of water quality of a stream at the Federal University of Pernambuco, Brazil. **Rev. Ambient. Água**. vol.8 no.3 Taubaté Sept./Dec. 2013. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1192>

ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO Jr, L. B. **Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides**. In: Pesticides in modern world, Book 5 - Pests control and pesticides exposure and toxicity assessment. Stoytcheva, M. (Ed). Intech, Rijeka, Croatia, 2011.

ASSIS, C.R.D.; CASTRO, P.F.; AMARAL, I.P.G.; MACIEL CARVALHO, E.V.M.; CARVALHO Jr, L.B., BEZERRA, R.S. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, p. 2243–2248, 2010.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 145:282-287, 2007.

AVILEZ, I. M.; HORI, T.S.F.; ALMEIDA, L.C.; HACKBARTH, A.; BASTOS NETO, J.C.; BASTOS, V.L.F.C.; MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã,

Brycon amazonicus (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and physiology Part C** 148:136-142. 2008.

AZEVEDO, J. DE S.; BRAGA, E. DE S.; RIBEIRO, C. A. O. Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indices of catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) of different sites on the southeast coast of Brazil. *Braz. j . Oceanography*. Vol.60, 2012.

BARROS, M.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T; PEZZATO, L.E.; FALCON. D. R.; GUIMARÃES, I. G. Hematological response and growth performance of Nile tilapia fed diets containing folic acid. *Aquaculture Research*, Vol.40, p. 895-903, 2009

BOTTÉ, E.S., JERRY, D.R., CODI KING, S. SMITH – KEUNE, C., NEGRI, A.P., Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. **Mar. Pollut. Bull.** 65 (4-9), 384-393. 2012.

CAMPBELL, L.; VERBURG, P.; DIXON, D.G.; HECKY, R.E. Mercury biomagnification in the food web of lake Tanganyika (Tanzania, East Africa). *Science of the Total Environment Journal.*; Vol. 402, p.184–91.2008.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A,A.; MOHANDAS, S. S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology Part C** 140:422-426.2005.

COGO AJD, SIQUEIRA AF, RAMOS AC, CRUZ ZMA & SILVA AG (2009) Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line** 7 (1): 37-42. [on line] <http://www.naturezaonline.com.br>

DAI, Y.-J. et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 11-17, 2014. ISSN 1552-8618. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2406>

DAVIS, A. K. et al. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v.22, p.760-772, 2008.

DELBON, M. C. **Análises cromatográficas e parâmetros hematológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, anestesiadas com eugenol em condições laboratoriais e de transporte.** 115f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Estadual Paulista, 2010.

EL-BASSYOUNI, H. T., ABDEL MAKSOUD, S. A., SALEM, F. A., BADR EL-DEEN, REEM, ABDEL AZIZ, H., THOMAS, M. M.. Evidence of oxidative stress in peroxisomal disorders. **Singapore Med J**, 53(9): 608-614, 2012.

FAO, Food Agriculture Organization, 2007. Pesticides in Food Report 2007 FAO Plant Production and Protection Paper 191. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

GABER, H. S.; EL-KASHEIF, M. A. IBRAHIM, S. A.; AUTHMAN, M.M.N. Effect of water pollution in El - Rahawy drainage canal in hematology and bodies of freshwater fish. **World Applied Sciences Journal**. Vol.21, p. 329-341, 2013.

GHAZALA.; MAHBOOB, S.; AHMAD, L.; SULTANA, S.; ALGHANIM, K.; AL-MISNED, F.; AHMAD, Z. Fish Cholinesterases as Biomarkers of Sublethal Effects of Organophosphorus and Carbamates in Tissues of *Labeo Rohita*. **J Biochem Molecular Toxicology** DOI 10.1002/jbt.2014.

GU, J.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. 2006.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. 2005. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 936 p.

HEDAYATI, A. & GHAFARI, Z. Evaluation of the Effects of Exposure to Copper Sulfate on some Eco-physiological Parameters in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Iranian Journal of Toxicology**. Vol. 7, 2013.

KIRSCHBAUM, A. A.; SERIANI, R.; PEREIRA, C. D.S.; ASSUNÇÃO, A.; ABESSA, D. M. de S.; ROTUNDO, M. M.; RANZANI-PAIVA M. J.T. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. Vol. 32, p. 151-154, 2009.

MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Toxicon**, Amsterdã, v. 24, n. 5, p. 425-434, 1986.

MARTINS, M. L. et al. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.2, p.631-637, 2009.

MISRA, P. e FRIDOVICH, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.

MOLICA, R. J. R.; OLIVEIRA, E. J. A.; CARVALHO, P. V. V.C.; COSTA, A. N. S. F.; CUNHA, M. C. C.; MELO, G. L.; AZEVEDO, S. M. F. O. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, Amsterdã, v. 4, n. 4, p. 743–753, jul. 2005.

MONTENEGRO D. & GONZÁLEZ M. T. Evaluation of somatic indices, histopathology, hematology and liver of the fish *Philippiiila brisomus* San Jorge Bay, northern Chile as associated with environmental stress. *Revista de Biología Marina y Oceanography*. Vol. 47, p. 99-107, 2012 .

MONSERRAT, J.M.; LIMA, J.V.; FERREIRA, J.L.R.; ACOSTA, D.; GARCIA, M. L.; RAMOS, P.B.; MORAES, T.B.; SANTOS, L.C.; AMADO, L.L. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:287-292. 2008.

NUNES, B., BARBOSA, A.R., ANTUNES, S.C., GONÇALVEZ, F. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound,

an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. **Environ Sci Pollut Res** 21:6258–6262. 2014.

NTE, M. E.; HART, A. E.; EDUN, O. M.; AKINROTIMI, A, O. Effects of industrial effluents on the hematology of the maxilla black tilapia *Sarotherdon melanotheron* (Rupell, 1852). **Continental J. Environmental Sciences**. Vol. 5, p. 29-37, 2011

OHKAWA, H., OHISHI, N. e ANDYAGI, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.

PURIFICAÇÃO JÚNIOR et al. Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. **African Journal of Microbiology Research**. Vol. 11(28), pp. 1142-1149, 28 July, 2017. DOI: 10.5897/AJMR2017.8577.

SEDMAN, J.J., GROSSBERG, S.E., 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 79 (1-2), 544–552

SANTOS, R.B.S., TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (PISCES, DORADIDAE) oriundos da bacia do médio rio solimões, estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 36(4): 283 – 292, 2010.

SERIANI, R.; MOREIRA, L. B.; ABESSA, D. M. S.; MARANHO, L. A.; ABUJAMARA, L. D.; CARVALHO, N. S. B.; KIRSCHBAUM, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematological analysis in *Micropogonias furnieri* Desmarest, 1823, Scianidae, from two estuaries of Baixada Santista, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. Vol. 58, p. 87-92, 2010.

SERIANI, R.; ABESSA, D. M. S.; KIRSCHBAUM, A. A.; PEREIRA, C. D. S.; ROMANO, P.; RANZANI -PAIVA, M. J. T. Relationship between toxicity and hematological water changes in *Oreochromis niloticus*. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. Vol. 15 p.47-53, 2011.

SILVA, A. S. E. **Perfil hematológico do peixe beijupirá, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), cultivado em diferentes salinidades**. 38f. Dissertação (Mestrado em

Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2012b.

SILVA, K.C.C.; ASSIS, C. R. D.; OLIVEIRA, V. M.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdã, v. 126, p. 191-197, jan. 2013.

STEGEMAN, J. J, et al. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R. J., Kimerly, R. A., Mehrle, P. M., Jr., Bergman, H. L. (Ed.). Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, pp. 235-335. 1992.

STOSKOPF, M. K. Hematological of elasmobranchs. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J.E Schalm's Veterinary Hematological. 6ª Ed. Ames: Wiley-Blackwell, p. 1013-1017. 2010

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características Hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p.107-114, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ed.1, Ribeirão Preto, p.131, 2004.

TAVARES-DIAS, M. Cytochemical method for staining fish basophils. **Journal of Fish Biology**, v.69, p.312–317, 2006.

TAVARES-DIAS, M. et al. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimidae) in net cage culture. **Electronic Journal of Ichthyology**, v.2, p.61-68, 2007.

TAVARES –DIAS , M; BARCELLOS, J.F.M. peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* HANCOCK, 1828: A morphological and cytochemical study. Braz. J. morphol. Sci. (2005) 22(4), 215-220.

THOMÉ, R.G.; SILVA, P.M.; SANTOS, H.B. Avaliação de Genotoxicidade da Água de um Rio Urbano Utilizando Estudo de Células Sanguíneas de *Danio rerio*. **Revista Conexão Ciência** Vol. 11; nº 2; 2016.

VALBONESI, P., BRUNELLI, F., MARTTIOLI, M., ROSSI, T., FABBRI, E., Cholinesterase activities and sensitivity to pesticides in different tissues of the silver European eel, *Anguilla anguilla*. Comp. **Biochem. Physiol.**, Part C. 154 (4), 353 -359. 2011.

VIADANNA, P. H. O. **Uso de imunoestimulante *Saccharomyces cerevisiae* em peixes da espécie *Cyprinus carpio***. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2012.

VILLATTE, F.; SCHULZE, H.; SCHMID, R. D.; BACHMANN T. A disposable acetylcholinesterase-based electrode biosensor to detect anatoxin-a(s) in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Nova Iorque, v. 372, n. 2, p. 322–326, jan 2002.

WEINERT, N. C. **Hematologia de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a protocolos anestésicos e de anticoagulação**. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2014

7. CONCLUSÕES GERAIS

A AChE cerebral de *H.littorale* foi caracterizada e mostrou potencial como biomarcador de pesticidas (principalmente Diclorvós) e íons metálicos (principalmente Mercúrio). Além disso, este estudo apresentou o primeiro relato de inibição da AChE cerebral de siluriformes por novaluron e piriproxifeno, sendo portanto, um estudo inédito.

Os testes de genotoxicidade aplicados no presente estudo foram capazes de detectar os danos genômicos em espécimes de *H. littorale*. A maior incidência de danos ao DNA foram observadas durante o período seco em razão da natureza das atividades realizadas no trecho da coleta e seu entorno, as quais produzem efluentes não carregados e cujo volume independe das chuvas.

Tendo em vista que a análise das atividades das enzimas AChE, CAT e SOD demonstraram maior inibição e estresse oxidativo, respectivamente, nos espécimes dos pontos de coleta em relação ao controle (em todos os períodos analisados) e que esses resultados foram corroborados pelos níveis de TBARS, geração de ROS e NO $\cdot$, foi possível confirmar a presença de agentes poluentes nas amostras de água do Cavouco, nos períodos de amostragem.

A resposta hematológica obtida pela contagem diferencial de leucócitos indicou através da relação neutrófilos/linfócitos e contagem de monócitos e leucócitos LG-PAS, a presença de agentes infecciosos nas mesmas amostras.

Os metais analisados estavam em concentrações abaixo das recomendadas na legislação em vigor e o único parâmetro físico-químico fora das especificações da legislação foi o oxigênio dissolvido, que não afetou os espécimes de *H.littorale* por apresentar respiração facultativa. Já os metais, embora estejam dentro das especificações, sabe-se que mesmo em concentrações sub-letais estes tem potencial para afetar os organismos aquáticos.

Os testes aplicados no presente estudo mostraram-se bons biomarcadores da presença de substâncias anticolinesterásicas, genotóxicas e que causam estresse oxidativo e foram capazes de detectar os danos bioquímicos, genômicos e hematológicos em espécimes de *H. littorale*, indicando que o riacho Cavouco encontra-se impactado.

Os parâmetros analisados no presente trabalho apresentaram seletividade importante quanto à natureza dos poluentes presentes nas águas do “Cavouco” nos períodos analisados e apresentaram potencial para serem incluídos em programas de monitoramento, não apenas no referido riacho, mas também em outros corpos d’água de características similares.

REFERÊNCIAS

- ABDELKHALEK, N. K. M.; GHAZY, E. W.; ABDEL-DAIM, M. M. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress **Environ Sci Pollut Res**. DOI 10.1007/s11356-014-3578-0. 2014.
- ADAM, M. L.; TORRES, R. A.; SPONCHIADO, G.; MOTTA, T.S.; OLIVEIRA, C. M. R.; CARVALHO-FILHO, M. A.; CORREIA, M. T. S. Environmental degradation at a public park in southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). **Water, Air and Soil Pollution**, 211:61-68.2010.
- AKINROTIMI, O.A.; ORLU, E.E.; GABRIEL, U.U. Hematological responses of *Tilapia guineensis* Treated Industrial Effluent. **Applied Ecology and Environmental Sciences** Vol. 1. p. 10-13, 2013.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.
- ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 150-156, 2011.
- ARAÚJO, M.C. ; OLIVEIRA, M.B.M. Monitoring of water quality of a stream at the Federal University of Pernambuco, Brazil. **Rev. Ambient. Água**. vol.8 no.3 Taubaté Sept./Dec. 2013. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1192>
- ARAÚJO. M.C. **Caracterização da acetilcolinesterase cerebral do ciclídio jaguar (*Parachromis managuensis*) e seu potencial como biomarcador de pesticidas e íons metálicos**. Dissertação (mestrado) – 67 folhas. CRB 1728, cdd (22.ed.) UFPE/CCB-2015-237, 2015.

ARAÚJO, M. C.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, L. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, K. C. C.; LIMA, A. V. A.; CARVALHO JR., L. B.; BEZERRA, R. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdã, v. 177, p. 182-189, 2016.

ASSIS, C.R.D.; CASTRO, P.F.; AMARAL, I.P.G.; MACIEL CARVALHO, E.V.M.; CARVALHO Jr, L.B., BEZERRA, R.S. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, p. 2243–2248, 2010.

ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO Jr, L. B. **Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides**. In: Pesticides in modern world, Book 5 - Pests control and pesticides exposure and toxicity assessment. Stoytcheva, M. (Ed). Intech, Rijeka, Croatia, 2011.

ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A. G.; OLIVEIRA, V. M.; FRANÇA, R. C. P.; MACIEL CARVALHO, E. V. M.; BEZERRA, R.S.; CARVALHO JR, L. B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 141–150, 2012.

ASSIS, C. R. ; Araújo, MC ; ARAUJO, A. V. ; MARCEL, F. ; MEDEIROS, A. C. ; BEZERRA, R. ; BEZERRA JUNIOR, L. ; OLIVEIRA, M.B.M. **Biomarcadores enzimáticos: uma alternativa para o monitoramento do riacho cavouco**. In: Maria Betania Melo de Oliveira/Rodrigues Gonçalves/Kenia Valença. (Org.). Riacho Cavouco: que Riacho é Esse?. 1ed.Recife: Editora Universitaria, p. 33-50, 2014.

ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANÇA, R.C.P., SANTOS, J.F., MARCUSCHI, M., CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR, L.B. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. **Fish Physiology and Biochemistry** v. 40, p. 1659-1668, 2014.

ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANÇA, R.C.P., SANTOS, J.F., MACIEL CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR, L.B. Effect of ions on the activity of brain acetylcholinesterase from tropical fish. **Journal of Coastal Life Medicine** v. 3, p. 505-514, 2015.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 145:282-287, 2007.

AVILEZ, I. M.; HORI, T.S.F.; ALMEIDA, L.C.; HACKBARTH, A.; BASTOS NETO, J.C.; BASTOS, V.L.F.C.; MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and physiology Part C** 148:136-142. 2008.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinusphoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v. 467, p. 177-186, 2000.

BARŠIENE, J. et al. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. SUPPL., p. 99–104, 2006.

BRAHAM, R.P. Micronuclei and Other Erythrocyte Nuclear Abnormalities in Fishes from the Great Lakes Basin, USA. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. DOI 10.1002/em. 2017.

BRASIL. Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89. **Dispõe sobre o tratamento de embalagens e resíduos de agrotóxicos e dá outros tratamentos**. DOU, 12/07/1989. Brasília. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9974.htm.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como

estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2005

BELCHIOR, D.C.V et al. Impactos de agrotóxicos sobre o meio Ambiente e a saúde Humana.

Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v. 34, n. 1, p. 135-151, jan./abr. 2017

BOTTÉ, E.S., JERRY, D.R., CODI KING, S. SMITH – KEUNE, C., NEGRI, A.P., Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. **Mar. Pollut. Bull.** 65 (4-9), 384-393. 2012.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011.

BOTELHO, R.G.; MONTEIRO, S.H.; Christofoletti, C.A.; Moura-Andrade, G.C.R.; Tornisiel, V.L. Environmentally Relevant Concentrations of Atrazine and Ametrine Induce Micronuclei Formation and Nuclear Abnormalities in Erythrocytes of Fish Arch Environ Contam Toxicol DOI 10.1007/s00244-015-0171-6 2015.

CABRAL, J. J. S. P.; PREUSS, S. L. da C. NETO, G. C. da F. **Capibaribe e seus afluentes na planície de Recife: visão multidisciplinar de um rio urbano e sua importância para o sistema de drenagem das águas pluviais**. XII Simp de Rec Hídricos do Nordeste, Natal – RN, 2014. 10p.

CABRAL, J.J.S et al. **Início da mudança de paradigma em relação aos cuidados com os rios e riachos urbanos em Recife**. XXI Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. De 22 a 27 de novembro de 2015, Brasília – DF.

CABRAL, W.B.M. **Análise da genotoxicidade in vivo dos agrotóxicos ciromazina e mancozeb em baixas doses**. Dissertação de Mestrado, 76 folhas, 363.7384 CDD (23.ed.), BIBCAV/UFPE-009/2014.

CALADO, S. C. S.; SILVA, A. M. R. B.; SILVA, V. L., Qualidade da Água do Riacho Cavouco - Recife/PE. **XLII Congresso Brasileiro de Química**. Rio de Janeiro. Resumos. p. 66, 2002.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S. RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98p.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123 -2136, 1990.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.19, p.107-111, 2005.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A.A.; MOHANDAS, S. S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology Part C** 140:422-426.2005.

CLASEN, B.; LORO V. L.; MURUSSI, C.R.; TIECHER, T.L.; MORAES, B.; ZANELLA, R. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. **Science of the Total Environment** 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.154>. 2018.

COGO AJD, SIQUEIRA AF, RAMOS AC, CRUZ ZMA & SILVA AG (2009) Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line** 7 (1): 37-42. [on line] <http://www.naturezaonline.com.br>

COIMBRA, R.S.C.; SANTOS, C.R.S.; SARAIVA, V.B.; OLIVEIRA, M.M. 2013. Biomarcadores como ferramentas na avaliação da qualidade do pescado contaminado com metais traço. Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, Campos dos Goytacazes/RJ, v. 7 n. 1, p. 153-172.

COLLINS, A. R. (March 2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations". *Mol Biotechnol.* **26** (3): 249–61

CONNOR, R. E., Geist, J., Werner, I. (2012). Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment, *Sensors*, 12(9), pp. 12741-127

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. I. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DAI, Y.-J. et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 11-17, 2014. ISSN 1552-8618. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2406>

DAUTERMAN, W. C. Biological and nonbiological modifications of organophosphorus compounds. **Bulletin of the World Health Organization**, 44, 133-150, 1971.

DUFFUS, J.H. “Heavy metals” - A meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, 74, 793–807, 2002.

EL-BASSYOUNI, H. T., ABDEL MAKSOUD, S. A., SALEM, F. A., BADR EL-DEEN, REEM, ABDEL AZIZ, H., THOMAS, M. M.. Evidence of oxidative stress in peroxisomal disorders. **Singapore Med J**, 53(9): 608-614, 2012.

FAO, Food Agriculture Organization, 2007. Pesticides in Food Report 2007 FAO Plant Production and Protection Paper 191. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, 2000.

GABER, H. S.; EL-KASHEIF, M. A. IBRAHIM, S. A.; AUTHMAN, M.M.N. Effect of water pollution in El - Rahawy drainage canal in hematology and bodies of freshwater fish. **World Applied Sciences Journal**. Vol.21, p. 329-341, 2013.

GHAZALA.; MAHBOOB, S.; AHMAD, L.; SULTANA, S.; ALGHANIM, K.; AL-MISNED, F.; AHMAD, Z. Fish Cholinesterases as Biomarkers of Sublethal Effects of Organophosphorus and Carbamates in Tissues of *Labeo Rohita*. **J Biochem Molecular Toxicology** DOI 10.1002/jbt.2014.

GODEFROID, R.S.; FONSECA, A.S.; SILVA, R.C. Utilização dos peixes do rio bacacheri como indicadores da qualidade ambiental. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade** | Ed. Especial, vol. 7, n. 3, p. 675 - 690 | jul – dez 2014.

GU, J.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. 2006.

GUPTA, R. C. (2014). Chapter 1: Introduction. In: Gupta. R. C. (Ed.). Biomarkers in Toxicology. Kentucky, USA, Elsevier, pp. 3-5.

GUSTAVINO, B.; SCORNAJJENGHI, K.A.; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X- Ray and colchicine. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.494, p.151-159, 2001.

HÖRNBERG, A.; TUNEMALM, A.; EKSTRÖM, F. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with organophosphorus compounds suggest that the acyl pocket modulates the aging reaction by precluding the formation of the trigonal bipyramidal transition state. **Biochemistry**, New York, v. 46, n. 16, p. 4815-4825, Feb. 2007.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. 2005. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 936 p.

HOWCROFT, C.F., GRAVATO, C., AMORIM, M.J.B., SOARES, A.M.V.M., GUILHERMINO, L. Biochemical characterization of cholinesterase in *Enchytraeus albidus* and assesment of in vivo and in vitro effects of different soil properties, copper and phenmedipham. **Ecotoxicology** 20 (1), 119-130. 2001.

HUSSAIN, B. et al. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. **Saudi Journal of Biological Sciences** (2017), <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.048>

IVANINA AV, HABINCK E & SOKOLOVA IM (2008) Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:72-79.

JAVEDE, M. et al. Bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in fish (*Channa punctatus*) exposed to a thermal power plant effluent. **Ecotoxicology and Environmental safety** (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.007>

JEBALI, J. et al. Cholinesterase activity as biomarkers of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination, *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 13(8), pp. 525-537.2013.

KOUSAR, S.; JAVED, M. Diagnosis of Metals Induced DNA Damage in Fish Using Comet Assay (2015). **Pak Vet J**, 35(2): 168-172.

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK. P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. Uso de peixes como bioindicadores para monitoramento ambiental aquático. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, out./dez. 2010.

MACEDA, E.B.; GRISOLIA, A.B.; VAINI, J.O. ; CANDIDO, L.S. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brillhante, MS, Brasil. **Rev. Ambient. Água** vol. 10 n. 1 Taubaté – Jan. / Mar. 2015.

MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 148, 265–272. 2008.

MANSOURI, B.; EBRAHIMPOUR, M.; BABAEI, H. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (*Capoeta fusca*). **Toxicology and Industrial Health**, v.28, n.4, p.361-368, 2012.

MARQUES, S.M.; ANTUNES, S.C.; NUNES, B.; GONÇALVES, F.; PEREIRA. Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine. **Ecotoxicology** 20:1315–1327. 2011.

MARTINS, M. L. et al. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.2, p.631-637, 2009.

MATSUMOTO, S.T., MANTOVANI, M.S., MALAGUTTI, M.I.A., DIAS, A.L., FONSECA, I.C. & MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, 29: 148-158.2006.

MATOS, L.A et al. The influence of heavy metals on toxicogenetic damage in a Brazilian tropical river. **Chemosphere**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.103>, 2017

MATOS, K.S. **Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano / Karina Silvia Matos.** – Lavras : UFLA, 2012. 148 p. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

MARQUES, S.M.; ANTUNES, S. C; NUNES, B; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine. **Ecotoxicology** 20:1315–1327. 2011.

MENEZES, N. A.; WEITZMAN, S. H.; OYAKAWA, O. T.; LIMA, F. C. T.; CASTRO, R. M. C.; WEITZMAN, M. J. 2007. Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre a conservação de peixes de água doce Neotropical. São Paulo: **Museu de Zoologia**, Universidade de São Paulo. 2007.

MONSERRAT, J.M.; LIMA, J.V.; FERREIRA, J.L.R.; ACOSTA, D.; GARCIA, M. L.; RAMOS, P.B.; MORAES, T.B.; SANTOS, L.C.; AMADO, L.L. Modulation of antioxidant

and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:287-292. 2008.

MODESTO, K. A., MARTINEZ, C. B. R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**. v.78 p. 294-299, 2010

MORCILLO, P.; ESTEBAN, M. A.; CUESTA, A. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. **Chemosphere**, 225 – 233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.020>. 2016.

NANDHAKUMAR, S; PARASURAMAN, S; SHANMUGAM, MM; RAO, KR; CHAND, P; BHAT, BV (Apr 2011). "Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay)". *J Pharmacol Pharmacother*. **2** (2): 107–11

NUNES, B., BARBOSA, A.R., ANTUNES, S.C., GONÇALVEZ, F. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. **Environ Sci Pollut Res** 21:6258–6262. 2014.

NIGAM, A.K., SRIVASTAVA, N., RAI, A.K., KUMARI, U., MITTAL, A.K., MITTAL, S. The first evidence of cholinesterase in skin mucus of carps and its applicability as biomarker of organophosphate exposure. **Environmental Toxicology**. Doi 10.1002/tox.2012.

NTE, M. E.; HART, A. E.; EDUN, O. M.; AKINROTIMI, A, O. Effects of industrial effluents on the hematology of the maxilla black tilapia *Sarotherdon melanotheron* (Rupell, 1852). **Continental J. Environmental Sciences**. Vol. 5, p. 29-37, 2011

OBIAKOR, M.; OKONKWO, J. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as In situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. **Journal of Animal Science Advances**, v. 2, n. 1, p. 123–133, 2012.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; SILVA, L. R. da. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1, p. 27-48, jan./abr. DOI: 10.5380/re.v36i1.20523. 2010.

PENATTI, F.; GUIMARÃES, S. Avaliação dos riscos e problemas ambientais causados pela disposição incorreta de resíduos de laboratórios. **Geografia Ensino & Pesquisa**, v. 15, n.1, p. 43-52, 2011.

PINHEIRO, D.A. ; DIAS, M.T. ; DIAS, M.K.R. ; SANTOS, E.F. ; MARINHO, R.G.B. Primeiro registro da ocorrência de protozoários em Tamoatá *Hoplosternum littorale* no Brasil. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, 39(2): 169 – 177, 2013.

PEZZEMENTI, L., CHATONNET, A., Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. **Chem. Biol. Interact.** 187 (1–3), 27–33.2010.

PURIFICAÇÃO JÚNIOR et al. Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. **African Journal of Microbiology Research**. Vol. 11(28), pp. 1142-1149, 28 July, 2017. DOI: 10.5897/AJMR2017.8577.

RANZANI-PAIVA, M. T. J. e SILVA-SOUZA, A. T. **Hematologia de Peixes Brasileiros** . In: Sanidade de Organismos Aquáticos / organizadores Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de Los Angeles Perez Lizama. – São Paulo: Editora Varela, 2004.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., S. B. PÁDUA, M. TAVARES-DIAS, M. I. EGAMI: **Métodos para análise hematológica em peixes**. EDUEM, Brazil, 135pp. 2013.

RICHENDRFER, H. et al. Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Neurotoxicol Teratol**, v. 34, n. 4, p. 458-65, Jul 2012. ISSN 0892-0362.

RIACHOS URBANOS. (2013/2014) riachosurbanos.blogspot.com.br.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2, p. 505-509, 2004/08/01/ 2004. ISSN 0141-1136.

ROTCHELL, J. M. e Ostrander, G. K. Molecular markers of endocrin disruption in aquatic organisms. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 6, pp. 453-496.2003.

ROESIJADI, G. e Robinson, W. E. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: Malins, D. C., Ostrander, G. K. (Ed.). *Aquatic Toxicology, Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, pp. 387-420. 1994.

RODRIGUES SR, CALDEIRA C, CASTRO BB, GONÇALVES F, NUNES B, ANTUNES SC. Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. **Pestic Biochem Physiol** 99:181–188. 2011.

SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. **Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica**. In. : SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. *Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica*. In. : TAVARES-DIAS, M. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. 1º ed. Macapá: Embrapa Amapá, p. 330-45, 2009.

SÁ-OLIVEIRA, J. C.; CHELLAPPA, S.; VASCONCELOS, H. C. G. Estrutura populacional, relação peso-comprimento e fator de condição de *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae) da área de proteção ambiental do Rio Curiaú, Macapá-AP. **Biota Amazonica**, Macapá, 1: 38-41.2011.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON. J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: IBAMA/PROVÁRZEA, 144pp. 2006.

SALVADOR-JR; SILVA.F.A. Actinopterygii, Siluriformes, Callichthyidae, *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828): Distribution extension in the upper São Francisco River region, southeast Brazil. **Check List** | Volume 7 | Issue 5 | ISSN 1809-127X (online edition), 2011.

SCALON, M.C.S.; RECHENMACHER, C.; KAYSER, M. L.C.; RODRIGUES, M.T.C.; MALUF, S.W.D.; RODRIGUES, M.A.S.; SILVA, L.B.F. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Braz. J. Biol.**, 2010, vol. 70, no. 4 (suppl.), p. 1217-1222

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SERIANI, R.; MOREIRA, L. B.; ABESSA, D. M. S.; MARANHO, L. A.; ABUJAMARA, L. D.; CARVALHO, N. S. B.; KIRSCHBAUM, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematological analysis in *Micropogonias furnieri* Desmarest, 1823, Scianidae, from two estuaries of Baixada Santista, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. Vol. 58, p. 87-92, 2010.

SERIANI, R.; ABESSA, D. M. S.; KIRSCHBAUM, A. A.; PEREIRA, C. D. S.; ROMANO, P.; RANZANI -PAIVA, M. J. T. Relationship between toxicity and hematological water changes in *Oreochromis niloticus*. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. Vol. 15 p.47-53, 2011.

SERIANI, R. & RANZANI-PAIVA, M.J.T. Alterações hematológicas em peixes: Aspectos fisiopatológicos e aplicações em ecotoxicologia aquática In: SILVA-SOUZA, A.T.; PEREZ LIZAMA, M. A.; TAKEMTO, R.M. (Org). **Patologia e sanidade de organismos aquáticos**. Maringá: ABRAPOA, p.221-242, 2012.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, Birmingham, v. 5, n. 3, p. 293–302, jun. 2005.

SILVA, K.C.C.; ASSIS, C. R. D.; OLIVEIRA, V. M.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdã, v. 126, p. 191-197, jan. 2013.

SILVA, J.M et al. Determination of genotoxic effect of trifluralin on *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae, Cuvier, 1816) using a multibiomarker approach. **Ecotoxicol. Environ. Contam.** v. 12, n. 1, , 85-93 doi: 10.5132/eec.2017

SILVA, F.A et al. Genomic Organization Under Different Environmental Conditions: *Hoplosternum Littorale* as a Model. **Zebrafish** Volume 13, nº 3, Doi: 10.1089/zeb.2015.1237. 2016

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

SOARES, M. G. M.; COSTA, E. L.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K.; ANJOS, H. D. B.; YAMAMOTO, K. C.; FREITAS, C. E. C. 2008. **Peixes de lagos do médio Rio Solimões**. 2a ed. rev. Manaus: Instituto Piatam. 160pp.

SOREQ, R.; SEIDMAN, S. Acetylcholine - news roles for an old actor. **Nat. Rev. Neurosci.** v.2, p. 294-302, 2001.

SOUZA, M.S. et al. Avaliação da qualidade da água do Rio dos Sinos (Brasil) por meio do teste de micronúcleos em *Cyprinus carpio* e de análises físico-químicas e microbiológicas. **Acta Toxicol. Argent.** 24 (3): 193-199, 2016.

STAGG, R. M. et al. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on expression of the cyp1a in salmon (*Salmo salar*) following experimental exposure and after the Braer oil spill, **Environmental Toxicology**, 19, pp. 2797-2805, 2000.

STEGEMAN, J. J, et al. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R. J., Kimerly, R. A., Mehrle, P. M., Jr., Bergman, H. L. (Ed.). *Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, pp. 235-335. 1992.

SUMPTER, J. P. e JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, *Environmental Health Perspectives*, 103(7), pp. 173-178. 1995.

SOREQ, R.; SEIDMAN, S. Acetylcholine- news roles for na old actor. **Nat.REV.Neurosci.** v.2, p. 294-302, 2001.

SOARES, M. G. M.; COSTA, E. L.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K.; ANJOS, H. D. B.; YAMAMOTO, K. C.; FREITAS, C. E. C. 2008. **Peixes de lagos do médio Rio Solimões**. 2a ed. rev. Manaus: Instituto Piatam. 160pp.

SUN, R.; LIU, C.; ZHANG, H.; WANG, Q. Benzoylurea chitin synthesis inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemesrty**, v. 63, p. 6847-6865, 2015.

TAVARES-DIAS, M., ONO, E. A., PILARSKI, F., e MORAES, F. R. Can thrombocytesparticipate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? Acytochemical study and ultrastructural analysis. **J. Appl. Ichthyol.** v.23, p.709-712, 2007.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R.**Hematologia de peixes teleósteos**. Ed.Eletrônica e Arte Final. Ribeirão Preto-SP. 144 paginas, 2004.

THRALL. M.A, et al.; **He matologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1 Ed. São Paulo: Roca, 2007.

THOMÉ, R.G.; SILVA, P.M.; SANTOS, H.B. Avaliação de Genotoxicidade da Água de um Rio Urbano Utilizando Estudo de Células Sanguíneas de *Danio rerio*. **Revista Conexão Ciência** Vol. 11; nº 2; 2016.

VAN DER OOST et al. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13(2), pp. 57-149.

VALBONESI, P., BRUNELLI, F., MARTTIOLI, M., ROSSI, T., FABBRI, E.,Cholinesterase activities and sensitivity to pesticides in different tissues os silver European eel, *Anguilla anguill*. Comp. **Biochem. Physiol.**, Part C. 154 (4), 353 -359. 2011.

VALE, J. A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. **Toxicology Letters**. 102-103, 649-652, 1998.

VOSYLIENÉ, M.Z., The effects of heavy metals on haematological indices of fish(Survey). **Acta Zoologica Lituanica**. v. 9, p.76-82, 1999.

WANG. Y., CHEN, C., ZHAO, X., WANG. Q., QIAN. Y. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 122 (2015) 81–85. 2015.

WINSTON, G. W. e GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, **Aquatic Toxicology**, 19, pp. 137-16, 1991.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organophosphorus insecticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria** 63. Genebra, 1986.

WHO/UNEP/ILO/IPCS. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard**. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2006.