

EFEITO PROTETOR DAS ESTERASES EM TILÁPIAS DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) EXPOSTAS AO ORGANOFOSFORDO MASOTEN®

Eduardo Santos Silva (UERJ) · Carlucio Rocha dos Santos (UFRJ) · Rojane Oliveira Paiva (UFRRJ)
Marcos Massao Murata (UERJ) · Artur Pedro do Carmo Moes (UERJ) · Rodolpho Rocha da Silva (IFFluminense)
Juliana Nogueira Berenger (IFFluminense) · Elimayra Carvalho Pacheco Figueiredo (IFFluminense)
Victor Barbosa Saraiva (IFFluminense) · Vicente de Paulo Santos de Oliveira (IFFluminense)
Manildo Marcião de Oliveira (IFFluminense)

Introdução

A aquicultura no Brasil é uma atividade que vem crescendo visando a uma alternativa alimentícia e à contenção da pesca predatória. Portanto, diversas espécies de peixes ganharam importância econômica, como a tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), que representa em torno de 40% da produção total de pescado de cativeiro. Esses animais, no entanto, possuem uma fauna parasitária específica que inclui numerosas espécies de diferentes grupos taxonômicos, tais como crustáceos, fungos, protozoários e helmintos, que podem reduzir a qualidade e produção do pescado (Figura 1). Como consequência, diversas classes de biocidas são usadas pela aquicultura para o combate a esses parasitas. Contudo, além do controle de parasitos, esses compostos também podem gerar efeitos nos peixes cultivados e em grupos não alvo (vida livre) quando a água usada nos tanques de cultivo é devolvida aos cursos d'água¹. Dessa forma, os biocidas passaram a ser alvo de diversos estudos de ecotoxicologia aquática.^{2,3,4}

¹ MAXIMIANO, A.A. et al. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 483-491, Apr. 2005.

² VENTURINI, F. P. et al. Metabolic effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish Physiol Biochem**, v. 41, p. 299-309, 2015.

³ CAMPOS, B. G. et al. Avaliação ecotoxicológica em piscicultura no parque estadual da Serra do Mar-SP, Núcleo Itariru. **O mundo da Saúde**, v. 38, n.1, p.98-104, 2014.

⁴ CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J. G.; MENEZES, M. L. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 14, jan./dez. 2004.

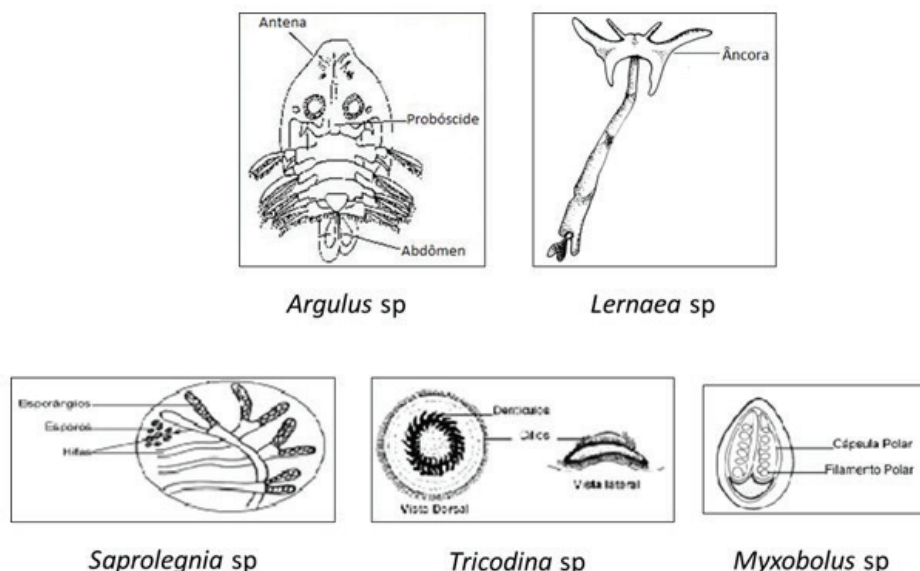


Figura 1: Exemplos de agentes etiológicos e grupos taxonômicos de ictioparasitoses: *Argulus* sp e *Lernaea* sp (crustáceos), *Saprolegnia* sp (fungo), *Tricodina* sp (protozoário) e *Myxobolus* sp (helminto)

Fontes: <http://petbh.com.br/guppy/html/guppy/parasitas.html>; Kumar (1992)⁵ Kubtiza. [2000]⁶

Os compostos organofosforados estão entre uma das principais classes de biocidas utilizadas no combate à argulose e lerneose, ectoparasitoses provocadas por crustáceos (*Argulus* sp – piolho-de-peixe e *Lernaea* sp – verme-âncora, respectivamente), com destaque para o paration metílico e o trichlorfon (Figura 2)^{7,8}. O trichlorfon (o,o-dimetil-(1-idroxi-2,2,2-tricloroetil)-fosfonato) é um biocida não sistêmico com ação de contato e ingestão, inibidor de colinesterases como a acetilcolinesterase (AChE) e enquadrado como altamente tóxico (classe I)⁹.

⁵ KUMAR, D. **Fish culture in undrainable ponds: A manual for extension**. Rome: FAO, 1992. 239 p. (FAO Fisheries Technical Paper, n. 325).

⁶ KUBTIZA, F. **Principais Parasitoses e Doenças em Tilápias**. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/60/doencas.asp>. Acesso em: 11 abr. 2017.

⁷ LUQUE, J. L. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, supl. 1, p. 161-165, 2004.

⁸ LUVIZOTTO-SANTOS, R. et al. O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. **B. Inst. Pesca**, v. 35, n.3, p.343-358, 2009.

⁹ ARAUCO, L. R.; CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J.G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do trichlorfon para três espécies de *Daphnia*. **Pesticidas: Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 15, p. 55-64, 2005.

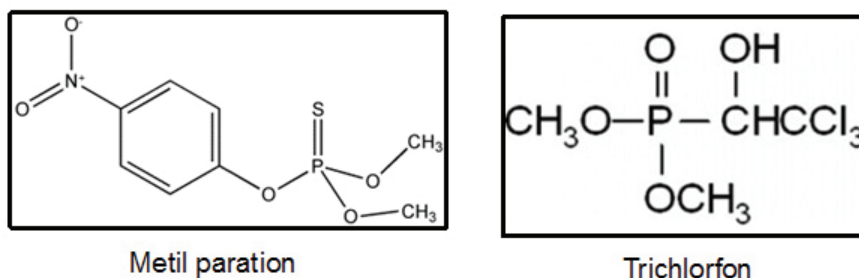


Figura 2: Estruturas de dois organofosforados utilizados em piscicultura

Fontes: Kegley et al. (2016)¹⁰, http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35110¹⁰, Insecticide, Herbicide Manufacturer, Eastchem Agricultural Chemical Eco-friendly (<http://www.insecticidechina.com/1-21-trichlorfon.html>)¹²

As esterases são uma importante família de enzimas envolvidas nos processos toxicológicos de organofosforados. Esterases são hidrolases que reagem sobre ésteres, podendo ser classificadas em quatro grupos, usando o critério de inibição: acetilesterase, arilesterase, carboxilesterase e colinesterase (figura 2)¹³.

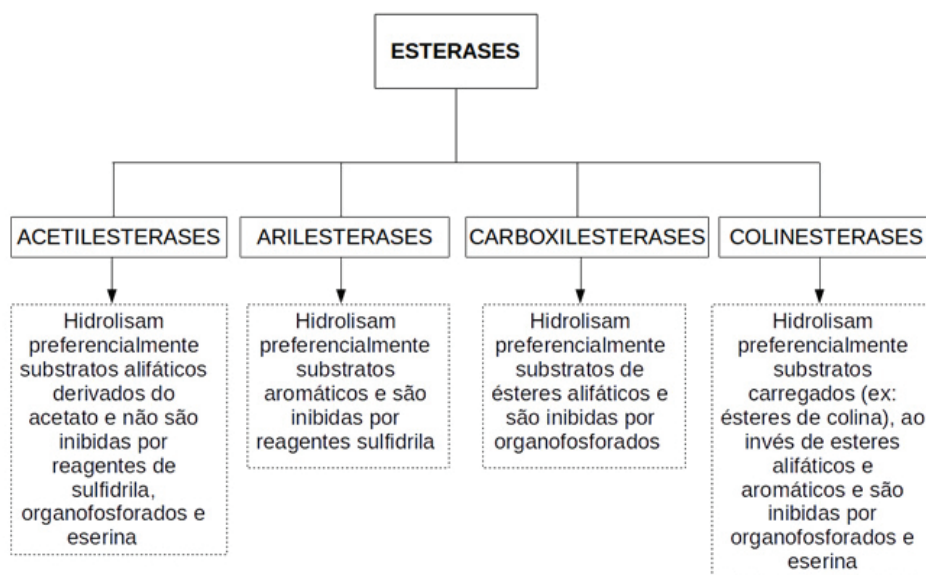


Figura 3 - Classificação de esterases, usando critério de inibidores

Fonte: Adaptado de Montella et al. (2012)

¹⁰ KEGLEY, S.E. et al. **PAN Pesticide Database**. Oakland, CA: Pesticide Action Network, North America, 2016. Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org>. Acesso em: 9 set. 2017.

¹¹ *Ibid.*

¹² INSECTICIDE, HERBICIDE MANUFACTURER, EASTCHEM AGRICULTURAL CHEMICAL ECO-FRIENDLY. Disponível em: <http://www.insecticidechina.com/1-21-trichlorfon.html>. Acesso em: 9 set. 2017.

¹³ MONTELLA, I.R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance: A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n.4, p. 437-449, Jun. 2012.

As enzimas colinesterases são esterases capazes de hidrolisar preferencialmente ésteres de colina, sendo encontradas em diversas espécies. Vertebrados apresentam dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE - EC¹⁴ 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE - EC 3.1.1.8). A AChE participa das sinapses neuronais e neuromusculares, sendo importante na transmissão do impulso nervoso. A inibição da atividade da AChE é comumente utilizada como biomarcador de efeito de organofosforados e carbamatos no ambiente¹⁵. A BChE é outra classe de colinesterase que, embora não possua atuação fisiológica conhecida, também é usada como biomarcador de efeito dos organofosforados e carbamatos^{16,17}. A carboxilesterase (CarbE EC 3.1.1.1) também é outra esterase pertencente à família da serina-hidrolases e, junto com a BChE, é produzida no fígado e posteriormente liberada no plasma sanguíneo, onde desempenha importante papel na desintoxicação dos organofosforados ao hidrolisar e servir de alvo para a ação desses compostos, impedindo, dessa forma, a inibição da AChE^{18,19}.

Além da inibição enzimática, uma alteração como o aumento da glicemia é também considerada uma das respostas fisiológicas secundárias ao estresse causado por xenobióticos como organofosforados^{20,21}.

Objetivou-se com o presente estudo avaliar as atividades enzimáticas das esterases e a glicemia em tilápia (*Oreochromis niloticus*), após uma exposição *in vivo* ao biocida trichlorfon, e comparar *in vitro* a inibição da AChE cerebral de *O. niloticus* com a inibição em outras duas espécies de peixe de cultivo (*Astyanax bimaculatus* e *Prochilodus lineatus*) na presença desse mesmo composto.

Metodologia

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com os princípios éticos vigentes, e o presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais do IFFluminense (protocolo n° 10/2015).

¹⁴ A sigla EC (enzyme commission) é atribuída às enzimas segundo a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) de acordo com o tipo de reação que catalisam. E os quatro dígitos que acompanham a sigla referem-se respectivamente a: 1. classe; 2. subclasse dentro da classe; 3. grupos químicos específicos que participam da reação; 4. a enzima, propriamente dita. Ex: AChE, EC 3.1.1.7, sendo: 3- hidrolase, 1- esterase, 1- hidrolases de ésteres carboxílicos, 7- acetilcolinesterase. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Acesso em: 9 set. 2017.

¹⁵ VAN DICK, J. S.; PLETSCHKE, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. **Chemosphere**, v. 82, p. 291-307, 2011.

¹⁶ MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus Poisons; catalytic complexities and hysteretic behavior. **Arch Biochem Biophys**, v. 494, n. 2, p. 107, 2010.

¹⁷ SALLES J. B et al. A novel butyrylcholinesterase from serum of *Leporinus macrocephalus*, a Neotropical fish. **Biochimie**, v. 88, n. 1, p. 59-68, 2006.

¹⁸ XING, H. et al. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and carboxylesterase in brain and muscle of common carp. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 26-30, 2010.

¹⁹ KÜSTER, E. Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 75, n.1, p. 76-85, 2005.

²⁰ NARRA, M. R. et al. The role of vitamin C as antioxidant in protection of biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish *Clarias batrachus*. **Chemosphere**, v. 132, p. 172-178.

²¹ MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p. 201-212, 1977.

Desenho experimental

Espécimes de tilápia foram obtidos de aquicultores locais instalados na proximidade do *Campus* Polo de Inovação Campos dos Goytacazes do Instituto Federal Fluminense (IFFluminense). Os animais foram distribuídos em dois tanques de 1.000 L contendo água filtrada por filtro biológico e aerada. Após 15 dias de aclimação, os animais foram distribuídos em quatro reservatórios de 20 L (dois animais em cada), enquanto os quatro animais restantes foram usados como controle e mantidos no tanque de 1000 L. Outro *pool* de tilápias (5 espécimes) foi sacrificado para obtenção de tecido cerebral para ensaio *in vitro* e análise de concentração inibidora de 50% da atividade enzimática (IC₅₀) da acetilcolinesterase em presença de trichlorfon.

Amostras de *Astyanax bimaculatus* (lambari) e *Prochilodus lineatus* (curimatã), fornecidas por aquicultores locais e obtidas em *pool* de 5 espécimes, foram utilizadas para os ensaios *in vitro*.

Exposição ao Masoten® e obtenção dos tecidos

Na água dos reservatórios de ensaio foi adicionado trichlorfon, na formulação comercial Masoten da aquicultura Bayer® (80% de trichlorfon), na concentração de 0,4 mg.L⁻¹. Após 16 horas de exposição ao trichlorfon, os espécimes foram retirados dos reservatórios de ensaio e do tanque controle, anestesiados para a coleta do sangue (em seringas contendo EDTA como anticoagulante), sacrificados por seção da coluna vertebral, medidos, pesados, e uma amostra de músculo foi retirada e congelada em freezer (-20°C).

287

Processamento do sangue

Após a retirada do sangue de um total de 12 tilápias, as amostras permaneceram por 10 minutos à temperatura ambiente, facilitando a coleta de plasma sanguíneo. Em seguida, foram centrifugadas a 3500 RPM, em centrífuga clínica, por 5 min. O plasma (sobrenadante) foi coletado, armazenado em microtubos de plástico (eppendorff) e armazenados a -20°C até a hora do uso.

Ensaio no sangue e plasma sanguíneo

A concentração sanguínea de glicose foi obtida com o uso de um glicosímetro comercial da marca Accu-Chek Active (Roche®). O ensaio de butirilcolinesterase (BChE) foi realizado usando 50 µL do plasma sanguíneo de tilápia, ácido ditionitrobenzóico (DTNB) concentração final de 0,32 mM, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 e butiriltiocolina iodeto 1,875 mM. O ensaio foi conduzido em espectrofotômetro em 412 nm (Coeficiente de Extinção Molar 14.150 M⁻¹. cm⁻¹)²². Uma unidade (U) enzimática é definida como quantidade de produto ácido tionitrobenzóico em µmol.min.

²² ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

O ensaio da carboxilesterase (CarbE) foi realizado de acordo com Morgan e colaboradores²³. Em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,7 a 25 °C, foi adicionado o plasma e o substrato p-nitrofenilacetato (p-NPA) em concentração final de 5 mmol/L. O ensaio foi conduzido em espectrofotômetro com leitura da absorvância do p-nitrofenol a 400 nm. O coeficiente de absorvidade molar utilizado foi 13000 mol/L⁻¹. cm⁻¹ para o p-nitrofenol. Uma unidade (U) enzimática é definida como a quantidade de produto p-nitrofenol em µmol.min.

Processamento do músculo e ensaio enzimático

As amostras de músculos foram descongeladas e homogeneizadas com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,5 na proporção de 1 g de músculo para 19 mL de tampão em aparelho Potter-Elvehjem²⁴. O homogeneizado obtido foi usado no ensaio de colinesterase adaptado do método de Ellman²⁵, 100 µL (diluídos 1:10) de homogeneizado de músculo, ácido ditionitrobenzóico (DTNB) concentração final de 0,32 mM, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 e acetiltiocolina iodeto 1,875 mM. O ensaio foi conduzido em espectrofotômetro em 412 nm (Coeficiente de Extinção Molar 14.150 mol/L⁻¹. cm⁻¹). Uma unidade enzimática é definida como quantidade ácido tionitrobenzóico (TNB) em µmol.min.

Parâmetros cinéticos e de inibição *in vitro* da acetilcolinesterase cerebral (K_m aparente; V_{Max} , IC50)

288

Após anestesia e sacrifício, os cérebros foram retirados e armazenados a -20°C. No laboratório, os tecidos foram descongelados e processados com tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,5 acrescido de Triton X-100 0,1% na proporção de 1 grama de tecido úmido por 10 mL de tampão em aparelho do tipo Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado a 9000.g por 30 min a 4°C, e o sobrenadante foi recolhido para os ensaios cinéticos e de inibição. Para a determinação da Constante de Michaelis-Mentem (K_m) e velocidade máxima (V_{max}), foram usadas concentrações de substrato entre 0,015-15 (0,015; 0,062; 0,12; 0,23; 0,47; 0,94; 1,87; 2,81; 3,75; 7,5; 15,0) mmol/L. Para o ensaio de inibição com trichlorfon, foram usadas as concentrações entre 0,8-80 (0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 25,6; 51,2; 80) mg.L⁻¹ com período de 60 minutos de incubação. O ensaio enzimático da acetilcolinesterase foi conduzido de acordo com o método descrito para AChE muscular.

Análise estatística

As tabelas foram construídas com o uso do programa Microsoft Excel® para os resultados cinéticos e de inibição *in vitro*. A análise dos resultados e a construção dos gráficos foram feitas com o uso do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA)

²³ MORGAN, E. et al. Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hydrolase A and B). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 315, p. 495-512, 1994.

²⁴ POTTER V. R. Tissue Homogenates. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (eds.). *Methods Enzymol*, v.1, p. 10-15, 1955.

²⁵ ELLMAN, op. cit., p.6.

no experimento *in vivo*. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 0,05.

Resultados e discussão

Biometria e glicemia

Não foram observadas diferenças significativas de peso e comprimento entre as médias de animais controle e ensaio (Tabela 1). Os níveis sanguíneos de glicose foram mantidos nos dois grupos (controle e ensaio), com maior coeficiente de variação nos

animais expostos ao trichlorfon.

Tabela 1 – Biometria e níveis de glicose sanguínea nos espécimes de tilápia (*Oreochromis*

Experimento	Comprimento (cm)	Peso (g)	Glicose (mg/dL)
Controle	17,13 ± 1,55 (4)	92,75 ± 20,71 (4)	73,25 ± 17,27 (4)
Ensaio	17,43 ± 2,37 (8)	105,38 ± 42,28 (8)	77,88 ± 27,24 (8)

niloticus) expostos por 16 horas a 0,4 mg.L⁻¹ de trichlorfon

Legenda - média ± desvio padrão; Parênteses = número de indivíduos; Comprimento (cm) = Comprimento total em centímetros; Peso (g) = Peso em gramas; Glicose (mg/dL) = Concentração de glicose por decilitro de sangue

A concentração de 0,4 mg.L⁻¹ é uma concentração acima da recomendação do fornecedor, que é de 0,25 mg.L⁻¹. Contudo, podemos considerá-la ainda como subletal, pois, ao longo de 16 horas de exposição, nenhum animal apresentou sinais comportamentais evidentes de intoxicação, como alteração no comportamento de natação, aumento do movimento opercular e letargia²⁶. A dosagem de glicose realizada nos peixes do experimento demonstrou que a exposição ao trichlorfon não desencadeou um quadro de hiperglicemia como uma resposta secundária ao estresse fisiológico²⁷. A glicemia alterada para o estado hiperglicêmico é um indicativo de estresse fisiológico desencadeado normalmente pela liberação de cortisol no sangue, que é caracterizada como a resposta primária ao estresse^{28,29}. Em experimentos de exposição aguda como o realizado por Langiano³⁰ em *Prochilodus lineatus* (curimatás), ocorreu hiperglicemia após diferentes tempos de exposição a 10 mg.L⁻¹ de glifosato (Roundup). Em contrapartida, concentrações crônicas (1,58 mg.L⁻¹) do mesmo herbicida em *Leporinus macrocephalus* (piavuçu) não promoveram alteração na glicemia³¹. Assim, é possível que a concentração do organofosforado usada em

²⁶ DEB, N.; DAS, S. Chlorpyrifos toxicity in fish: A Review. **Curr World Environ.**, v. 8, n.1, p. 77-84, 2013.

²⁷ MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; RAMOS-ENRIQUEZ, R. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 2, p. 158-178, 2009.

²⁸ *Ibid.*

²⁹ WAGNER, E.J.; DRISCOLL, D.M. Physiological stress responses of cutthroat trout to loading by fish pump, conveyor, or dip net. **Journal of applied Aquaculture**, v. 4, n.1, p. 19-27, 1994.

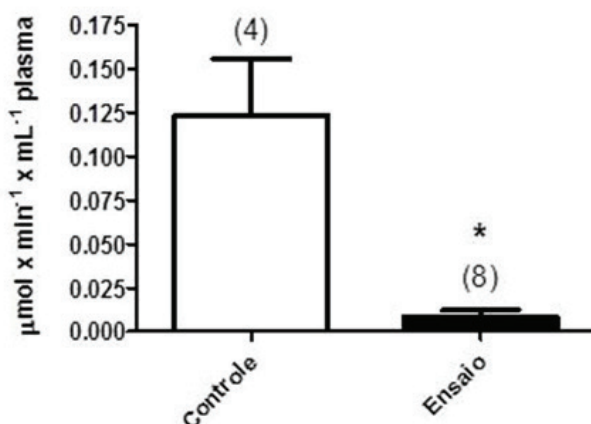
³⁰ LANGIANO, V.C. **Toxicidade do Roundup e seus efeitos para o peixe neotropical Prochilodus lineatus**. 62f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2006.

³¹ ALBINATI, A.C.L. et al. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n.3, p. 621-627, 2009.

nosso trabalho não tenha sido suficiente para desencadear um quadro de hiperglicemia, podendo esse tipo de estresse ocorrer em concentrações mais altas.

Esterases plasmáticas

Observamos inibição significativa de esterases plasmáticas de tilápias após 16



horas de exposição ao trichlorfon em comparação com animais controle. A enzima butirilcolinesterase (ChE) apresentou uma média de inibição de 90,7% (Figura 4).

Figura 4 - Atividade da butirilcolinesterase plasmática em tilápias expostas a 0,4 mg.L⁻¹ de trichlorfon (Masoten®) por 16 horas. *Indica diferença significativa entre as médias

290

segundo teste T de Student (p<0,05)

Os números entre parênteses indicam o número de indivíduos que tiveram suas atividades de BChE plasmática determinadas.

A enzima butirilcolinesterase é uma colinesterase inibida por um amplo espectro de organofosforados e carbamatos sintéticos ou naturais, provocando um efeito de proteção para a acetilcolinesterase. O fato de estar ausente ou em baixas concentrações em alguns indivíduos diminui a tolerância à intoxicação por estas neurotoxinas, sendo por este motivo considerada como uma enzima com função desintoxicadora e, portanto, uma enzima biomarcadora de exposição de organofosforados, mesmo em baixas concentrações desse xenobiótico^{32,33}. De fato, a espécie *Leporinus macrocephalus* (piavuçu) possui uma alta atividade dessa enzima no plasma sanguíneo, o que lhe confere importante proteção diante da exposição a organofosforados³⁴. Em nosso experimento, apesar da baixa atividade apresentada pelas tilápias para essa enzima, a alta inibição da butirilcolinesterase plasmática demonstrou que houve absorção do trichlorfon e evidenciou a sensibilidade dessa enzima a esse

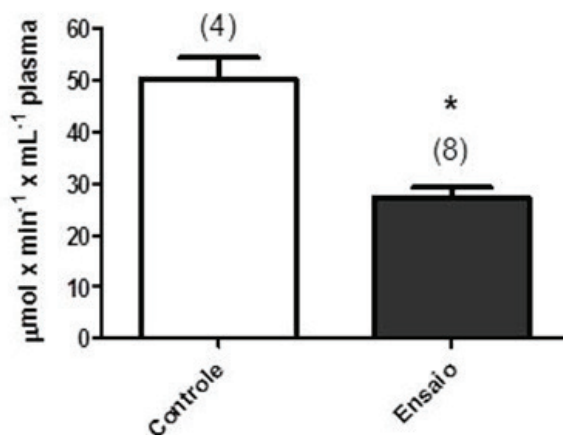
³² MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus Poisons; catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch Biochem Biophys*, v. 494, n. 2, p. 107, 2010.

³³ DUYSEN, E.G. et al. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. *Toxicology*, v. 233, n.1-3, p.60-69, 2007.

³⁴ SALLES et al., 2006, op. cit., p.4.

³⁵ GOLD-BOUCHOT, G. et al. Biomarkers and pollutants in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, in four lakes from San Miguel, Chiapas, Mexico. *International Journal Environmental and Pollution*, v. 26, n. 1/2/3, 2006.

organofosforado. A atividade butirilcolinesterase, de músculo de tilápias, também é inibida quando elas são expostas a outros poluentes anticolinérgicos no ambiente³⁵.



A carboxilesterase apresentou menor grau de inibição (45,8%) após a exposição ao trichlorfon (Figura 5).

Figura 5: Atividade da carboxilesterase plasmática em tilápias expostas a 0,4 mg.L⁻¹ de

trichlorfon (Masoten®) por 16 horas

291

*Indica diferença significativa entre as médias segundo teste T de Student ($p < 0,05$). Os números entre parênteses indicam o número de indivíduos que tiveram suas atividades de carboxilesterase plasmática determinadas.

A carboxilesterase é outra enzima que também possui um importante papel na biomarcação de exposição a organofosforados^{36,37}, atuando na desintoxicação dos organofosforados por meio do sequestro desse xenobiótico³⁸ e, dessa forma, protegendo a acetilcolinesterase³⁹. Isoenzimas de carboxilesterase também foram estudadas em muco de pele de *Cirrhinus mrigala* (Mrigal), como biomarcador de exposição a organofosforado (Nuvan®, 76% de dichlorvos) em concentrações entre 5-15 mg.L⁻¹⁴⁰. Além disso, a inibição da atividade de carboxilesterase em cérebros de carpa também pode ser usada como biomarcador secundário contra exposição a organofosforados⁴¹. Neste estudo atual, a carboxilesterase plasmática foi inibida pelo trichlorfon, confirmando

³⁶ XU, Y. et al. Regulations of xenobiotics and endobiotics on carboxylesterases: A Comprehensive Review. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, p. 1-10, 2016.

³⁷ SATOH, T.; HOSOKAWA, M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 257-288, 1998.

³⁸ Xenobióticos (do grego, xenos = estranho) são compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Xenobi%C3%B3tico>. Acesso em: 9 set. 2017.

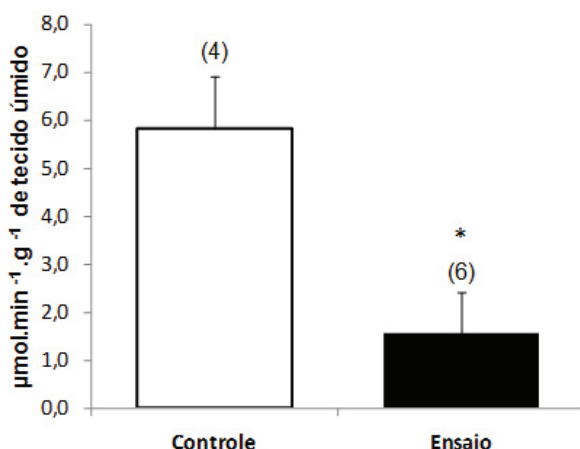
³⁹ ABBAS, R.; HAYTON, W.L. A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for paraoxon in Rainbow trout. **Toxicol. Applied Pharmacol.** San Diego, v. 145, p. 192-201, 1997.

⁴⁰ NIGAM, A. K. et al. Characterization of carboxylesterase in skin muçus of *Cirrhinus mrigala* and its assessment as biomarker of organophosphate exposure. **Fish Physiol Biochem**, v. 40, p. 635-644, 2014.

⁴¹ XING, H. et al. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and carboxylesterase in brain and muscle of common carp. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 26-30, 2010.

⁴² PATHIRATNE, A.; GEORGE, S. G. Toxicity of malathion to nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. **Aquatic Toxicology**, v. 43, p. 261-271, 1998.

sua eficácia como biomarcador. Resultados semelhantes também foram encontrados por Pathiratne e George⁴² em carboxilesterases de fígados de tilápias expostas a 3 ppm do organofosforado malation durante 24 horas. Deve ser ressaltado que a atividade de carboxilesterase no plasma das tilápias deste trabalho foi cerca de 500 vezes maior do que a de butirilcolinesterase, sendo assim mais importante na desintoxicação de xenobióticos nessa matriz. No entanto, isso pode variar de acordo com a espécie estudada. De fato, Abass⁴³, ao estudar esterases de *Coturnix coturnix*, *japonica*, observou que a atividade de butirilcolinesterase no plasma é cerca de 10 vezes maior do que a de CarbE. O perfil de inibição de esterases frente ao trichlorfon, porém, é semelhante ao encontrado nas tilápias, em que as BChE são mais sensíveis do que as CarbE.



Colinesterase muscular

A atividade de Colinesterase muscular teve uma porcentagem de 73% de inibição após 16 horas de exposição a Masoten (Figura 6).

Figura 6 - Atividade da colinesterase muscular em tilápias expostas a 0,4 mg.L⁻¹ de trichlorfon (Masoten®) por 16 horas

*indica diferença significativa entre as médias segundo teste T de Student ($p < 0,05$). Os números entre parênteses indicam o número de indivíduos que tiveram suas atividades de carboxilesterase plasmática determinadas.

A acetilcolinesterase em músculo é normalmente utilizada como um dos principais biomarcadores de exposição a organofosforados^{44,45}. Entretanto, aqui

⁴³ ABASS, K. S. A Method for Fast Assessment of OP/CB Exposure in the Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Using Combined Esterases Enzyme Activity as Biomarkers. **Enzyme Research**, v. 201, p. 1-15, 2014.

⁴⁴ ALVES, L. M. et al. The potential of cholinesterases as tools for biomonitoring studies with sharks: Biochemical characterization in brain and muscle tissues. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 465, p. 49-55, 2015.

⁴⁵ XING et al., op. cit., p.5.

chamaremos as colinesterases encontradas no músculo apenas de colinesterases, pois recentemente observou-se que, com a tilápia, a atividade colinesterásica realizada por diferentes substratos de cadeia alquílica de tamanho variável (acetiltiocolina, propioniltiocolina e butiriltiocolina) não evidenciou prevalência na reação de hidrólise a nenhum dos substratos testados em enzimas solubilizadas com NaCl e detergente não iônico⁴⁶. Lopes e colaboradores⁴⁷ ressaltam a importância dos métodos de extração da acetilcolinesterase da placa motora, indicando que, sem utilização de detergentes e força iônica adequados, não é possível afirmar que as colinesterases tenham sido extraídas, e muito provavelmente o resultado obtido pode ser apenas de esterases solúveis.

Guimarães e colaboradores⁴⁸, expondo *Oreochromis niloticus* por até 96 horas a uma concentração de 0,25 mg.L⁻¹ de trichlorfon, observaram uma inibição acima de 20% de acetilcolinesterase muscular quando comparado aos animais controle, sendo também observadas alterações histológicas nas brânquias. Em outro estudo, indivíduos de *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) submetidos a uma concentração subletal de trichlorfon (8,4 µg.L⁻¹), durante o intervalo de 96 horas, não apresentaram inibição da acetilcolinesterase muscular durante a exposição, sendo, contudo, observada uma inibição de até 31% durante o período de recuperação⁴⁹. Em nosso estudo, a colinesterase muscular foi inibida acima de 50%, após a exposição de 16 horas, sem que os animais morressem. Uma explicação para a resistência de peixes a organofosforados, quando comparados com outros vertebrados, envolve a constante bimolecular (k_i), que em geral é menor em peixes quando eles são

comparados a outros vertebrados, indicando menor sensibilidade^{50,51}.

Espécies	K _{Map} (µmol.L ⁻¹)	V _{Max} (mU.mL ⁻¹)	IC ₅₀ (mg.L ⁻¹)
Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	0,044 ± 0,015	4,03 ± 0,58	1,85 ± 0,12
Lambari (<i>Astyanax bimaculatus</i>)	0,045 ± 0,026	3,529 ± 1,222	0,99
Curimatá (<i>Prochilodus lineatus</i>)	0,259 ± 0,099	6,320 ± 2,568	0,028

Os parâmetros cinéticos obtidos *in vitro* para a acetilcolinesterase cerebral de três espécies de água doce mostrou uma discrepância de valores de constante de Michaelis

⁴⁶ LOPES, R.M. et al. Cholinesterase activity of muscle tissue from freshwater fishes: Characterization and sensitivity analysis to the organophosphate methyl-paraoxon. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.33, n.6, p.1331-1336, 2014.

⁴⁷ LOPES et al., op. cit., p. 12.

⁴⁸ GUIMARÃES, A.T.B.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BOEGERA, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, p. 57-62, 2007.

⁴⁹ VENTURINI, F. P. et al. Metabolic effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish Physiol Biochem.**, v. 41, p. 299-309, 2015.

⁵⁰ CARR, R. L.; CHAMBERS, J. E. Kinetic Analysis of their VitroInhibition, Aging, and Reactivation of Brain Acetylcholinesterase from Rat and Channel Catfish by Paraoxon and Chlorpyrifos-oxon. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 139, p. 365-373, 1996.

⁵¹ KEMP, J. R.; WALLACE, K. B. Molecular determinants of the species-selective inhibition of brain acetylcholinesterase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.104, n. 2, p. 246-258, 1990.

Menten ($K_{M \text{ aparente}}$) e sensibilidade (IC_{50}) entre a *O. niloticus* e o *P. lineatus* (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos *in vitro* de acetilcolinesterase cerebral de tilápia comparada com a de lambari e curimatã

Legenda: $K_{M \text{ app}}$: Constante de Michaelis-Menten aparente de acetilcolinesterase representa a concentração de substrato na qual a atividade enzimática atingiu metade da velocidade máxima; $V_{M \text{ app}}$: Velocidade máxima de acetilcolinesterase representa a maior atividade enzimática que a enzima atinge e depende da concentração da enzima no tecido considerado; IC_{50} : Concentração de trichlorfon necessária para inibir 50% da atividade *in vitro* de acetilcolinesterase.

Silva Filho e colaboradores⁵² compararam k_i e IC_{50} para o metil paraoxon, outro organofosforado, em acetilcolinesterase cerebral de espécies de peixes neotropicais (por exemplo, *Piaractus mesopotamicus* IC_{50} - 3108 nM) encontrados no Brasil e constatou que todos os peixes analisados são mais resistentes que galinhas (IC_{50} - 37 nM) e ratos (IC_{50} - 29 nM). Contudo, mesmo entre as espécies de peixes analisadas, existem variações de sensibilidade que podem chegar a uma ordem de grandeza^{53,54}.

Para verificar se realmente poderemos encontrar diferenças importantes de sensibilidades de colinesterases a organofosforados em peixes, compararam-se à tilápia outras duas espécies de peixes de água doce comuns em rios brasileiros: *Astyanax bimaculatus* e *Prochilodus lineatus*. No estudo comparativo *in vitro* das acetilcolinesterases cerebrais de *O. niloticus*, *A. bimaculatus* e *P. lineatus*, o resultado foi semelhante ao encontrado por Silva Filho e colaboradores⁵⁵. Os valores de IC_{50} de acetilcolinesterase cerebral de *O. niloticus* após exposição ao trichlorfon foi maior quando comparado com as outras duas espécies analisadas, chegando a duas ordens de grandeza em comparação com *P. lineatus*, indicando que a tilápia é menos sensível a esse organofosforado. Ainda observamos o mesmo padrão com os resultados $K_{M \text{ aparente}}$. O valor dessa constante é menor *O. niloticus*, o que pode estar relacionado com a velocidade de dissociação durante a formação do complexo enzima-inibidor (EI). Em recente trabalho *in vitro* relata-se que quando a acetilcolinesterase cerebral de *O. niloticus* (tilápia), *Arapaima gigas* (pirarucu) e *Rachycentron canadum* (cobia) foi exposta a organofosforados e carbamatos, também foram encontrados valores de IC_{50} semelhantes ao do nosso estudo para dois organofosforados (Dichlorvos - $5,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$; Clorpirifos - $26,78 \mu\text{mol.L}^{-1}$)⁵⁶. Ressalta-se que, após longos períodos, mesmo baixas concentrações de trichlorfon podem se converter em dichlorvos, mantendo o efeito tóxico por mais tempo⁵⁷.

Em conjunto, nossos dados indicam cautela no uso de trichlorfon na dosagem indicada pelo fornecedor ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$), em especial para espécies mais sensíveis como *P. lineatus*, podendo resultar em efeitos tóxicos e até mesmo morte de animais em cultivo. Ressalta-se ainda que o uso desse composto para o controle de ectoparasitas em tilápias, embora visualmente inócuo para essa espécie, pode resultar em impacto ambiental, uma vez que sua lixiviação e/ou escape para outros compartimentos aquáticos pode afetar outras espécies.

⁵² SILVA FILHO, M. V. et al. Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 247-254, 2004.

⁵³ ASSIS, C. R. D. et al. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 141-150, 2012.

⁵⁴ OLIVEIRA, M.M. et al. Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. **Marine Environmental Research**, v. 63, n. 4, p. 303-312, 2007.

⁵⁵ SILVA FILHO et al., *op. cit.*, p.13.

⁵⁶ ASSIS et al., *op. cit.*, p.13.

⁵⁷ GUIMARÃES et al., *op. cit.*, p.12.

Conclusões

As espécies de peixes cultivadas no Brasil apresentam diferentes sensibilidades a organofosforados. Com relação ao trichlorfon, componente do produto comercial Masoten®, usado como ectoparasiticida, observamos que a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo) apresentou resistência ao composto. As esterases estudadas no plasma sanguíneo e no músculo foram inibidas em experimento *in vivo* conduzido durante 16 horas. Estudos de parâmetros cinéticos *in vitro* da acetilcolinesterase cerebral confirmaram a maior resistência que a espécie apresenta ao trichlorfon, principalmente quando comparada à espécie *Prochilodus lineatus* (curimatã).

Os resultados alertam que políticas de incentivo à atividade de piscicultura que envolver toda uma cadeia produtiva baseada em espécies exóticas podem estimular o uso de compostos químicos tóxicos em quantidades mais elevadas. Tais práticas favorecem as grandes corporações que comercializam esses produtos, em detrimento do uso manejado que diminui o risco de contaminação ambiental.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos servidores do Polo de Inovação Campos dos Goytacazes do IFFluminense pelo apoio logístico para a realização deste trabalho.