



# AVALIAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE COMO BIOMARCADOR EM EXPERIMENTOS DE CONTAMINAÇÃO VIA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DO METILMERCÚRIO E CLORETO DE MERCÚRIO EM TRAÍRA, HOPLIAS MALABARICUS (BLOCK, 1794).

Juliana dos Santos Colombi

Táise Bomfim de Jesus; Carlos Eduardo Veiga de Carvalho

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro juliana.colombi@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Entre os contaminantes mais intensamente estudados em ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos estão os metais pesados (PALENZUELA *et al.*, 2004), que são capazes de provocar efeitos biológicos adversos quando presentes em concentrações elevadas. (DALLINGER & RAIMBOW, 1993).

Dentre esses metais pesados, está o mercúrio, que podem ser encontrados na forma orgânica e inorgânica no qual possuem propriedades específicas, capazes de bioacumular e de biomagnificar através dos níveis tróficos. Que do ponto de vista toxicológico é importante distinguir entre a forma inorgânica (Hg<sup>0</sup>-elementar; Hg<sup>2+</sup> - íon mercúrico e Hg<sup>2+</sup> - íon mercurioso) e orgânica do mercúrio devido às diferenças de absorção, distribuição corporal e efeito tóxico.

Os peixes representam a principal via de exposição dos seres humanos ao MeHg (WHO, 1991). A taxa de excreção do MeHg por organismos vivos é baixa. Praticamente todo o mercúrio apresenta - se na forma de metilmercúrio em peixes, já que se acumula mais eficientemente, tornando a forma química mais neurotóxica do mercúrio. (JOIRIS *et al.*, 000; GOCHFELD, 2003; ANDERSON *et al.*, 004).

Os efeitos que os metais podem causar aos organismos podem ser observados através do uso de bioindicadores, os quais são importantes no diagnóstico dos efeitos que estes elementos químicos podem causar aos sistemas biológicos. (MELA, 2004). A espécie alvo nessa pesquisa é a Hoplias malabaricus, sendo considerada um bom modelo biológico, já que possui uma grande resistência física, além do que ocupa níveis tróficos superiores na cadeia alimentar e vários trabalhos com essa espécie revelam uma intensa bioacumulação de metais pesados, e também mostram um excelente bioindicador de poluição ambiental nesses ecossistemas.

Os efeitos destes agentes químicos podem ser mensurados objetivando um diagnóstico simples e eficiente, detectando os efeitos destes poluentes sob a biota. Para fornecer estes

dados, tem sido recomendada a incorporação da análise de biomarcadores em programas que busquem avaliar a exposição e as alterações causados por contaminantes em ambientes marinhos. (CAJARAVILLE *et al.*, 2000); (VIANA, 2005).

A enzima acetilcolinesterase (Ache) foi escolhida nesse trabalho como biomarcador, já que há evidências de que o músculo possui principalmente Ache, sendo que sua principal função é a hidrólise da acetilcolina, o mediador das sinapses colinérgicas no sistema nervoso, prevenindo contínuas passagens de impulsos, o que é vital para um normal funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular. (STENESH, 1998). Quando expostas especificamente ao metilmercúrio, o principal alvo é o sistema nervoso central em todas as espécies, podendo inibir sua atividade afetando a transmissão de impulsos nervosos.

## OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral, avaliar a eficácia da acetilcolinesterase como biomarcador bioquímico em peixes expostos, via injeção intraperitoneal, a forma orgânica e inorgânica de mercúrio.

Determinar as concentrações de Hg no tecido muscular de traíra após a exposição aguda via injeção intraperitoneal e as diferentes formas de mercúrio (orgânico e inorgânico);

Determinar a atividade da acetilcolinesterase no músculo dos peixes, após 96 horas de exposição aguda, via injeção intraperitoneal e as diferentes formas de mercúrio (orgânico e inorgânico).

## MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das Espécimes

Espécimes de traíras foram coletadas e transportadas para o laboratório da Universidade Estadual do Norte Fluminense, onde passaram por um processo de aclimação.

Depois desse período, os peixes foram anestesiados com eugenol (1%). Os indivíduos foram divididos em três grupos tratados diferentemente obedecendo à forma química do mercúrio a ser exposto. Foram utilizados 10 indivíduos controles, 12 indivíduos MeHg e 6 indivíduos para HgCl<sub>2</sub>.

#### Design Experimental

Para os indivíduos controle apenas a solução de PBS foi administrada. Para a diluição dos reagentes de MeHg e HgCl<sub>2</sub> foi utilizada a solução de PBS (Phosphate Buffer Solution) e em seguida, foram submetidos à injeção intraperitoneal contendo a mesma concentração de mercúrio orgânico (MeHg) e mercúrio inorgânico (HgCl<sub>2</sub>). O volume final injetado nos indivíduos, em todos os tratamentos, foi de 0,1 mL. Após a contaminação, os peixes foram colocados em aquários individuais permanecendo nestes até finalizar o tempo de exposição estipulado em 96 horas. Após esse período, os indivíduos foram anestesiados com o eugenol (1%) e dissecados para retirada do músculo, para análise química e atividade colinesterásica.

#### Atividade Colinesterásica no músculo

Para verificar a atividade colinesterásica, foi utilizada amostra de músculos contaminados e controle homogeneizados, de acordo com Ellmann *et al.*, 1961), modificado para microplaca por Silva De Assis (1998), cujo princípio é o desenvolvimento da reação colorida entre o reagente de cor DTNB e tiocolina. Para quantificação protéica (proteína total), foi utilizado o método de Bradford (1976), adaptado por Silva De Assis (1998). As análises para verificação da atividade colinesterásica foram realizadas na Universidade Federal do Paraná, no Centro de Farmacologia.

#### Análise Química

Amostras contaminadas e controle de músculo, com peso de aproximadamente 1,0g foram retiradas para serem submetidas à digestão ácida para determinação o Hg tota. As amostras foram lidas em espectrofotômetro de absorvância atômica ICP - AES da Varian com acessório de geração de vapor frio (VGA - 77), segundo a metodologia descrita por BASTOS *et al.*, 1998); no qual as análises foram desenvolvidas no laboratório de Ciências Ambientais -LCA.

#### Análise Estatística

Para análise estatística, o programa utilizado foi o Graphpad versão 5.0. A análise de variância empregada foi ONE - WAY ANOVA (Repeated measures) com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). com objetivo de verificar possíveis diferenças na concentração de Hg no tecido muscular entre os diferentes tratamentos utilizados e para avaliar a significância da atividade colinesterásica nos diferentes tratamentos.

## RESULTADOS

A média da concentração de Hg nas amostras de músculos foi de 121,09  $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  em traíras submetidas à contaminação via injeção intraperitoneal por Metilmercúrio (MeHg), sendo considerado superior quando comparados com traíras submetidas à contaminação por Cloreto de Mercúrio (HgCl<sub>2</sub>), no qual a média foi de 103, 92  $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  e indivíduos controle em que a média foi de 76,48  $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ . Essas concentrações apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,005$ ) em relação ao grupo tratado por MeHg

com o grupo controle e o grupo tratado com HgCl<sub>2</sub>, o que confirma a tendência do MeHg de bioacumular, já que segundo Aschner (2002) cerca de 75 a 95% de todo o mercúrio encontrado nos tecidos dos peixes encontra-se na forma de metilmercúrio.

Não foi observada no presente estudo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o grupo tratado com Cloreto de Mercúrio e o grupo Controle, isso se deve possivelmente, por ser uma forma menos tóxica quando comparada com a forma orgânica, já que a forma inorgânica é excretada pelos organismos e a forma orgânica tem capacidade de acumular-se nas cadeias tróficas. O tempo de exposição ou ainda o número amostral de peixes utilizados para o experimento com HgCl<sub>2</sub>, pode também ter influenciado nesse resultado, sendo portanto possíveis justificativas para não haver diferença significativa.

O uso de biomarcadores bioquímicos é uma ótima ferramenta nos estudos de toxicologia ambiental. Através destes, é possível detectar os efeitos tóxicos de contaminantes nos níveis básicos de organização biológica, mesmo que tais xenobiontes estejam em uma baixa concentração no ambiente, devido a grande sensibilidade destes biomarcadores (Stegeman *et al.*, 1992). Os resultados referentes à enzima acetilcolinesterase demonstraram inibição significativa ( $p < 0,0001$ ) na atividade colinesterásica em indivíduos expostos ao metilmercúrio em relação ao grupo controle e ao grupo contaminado por Cloreto de Mercúrio, já em indivíduos contaminados por HgCl<sub>2</sub> não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) da atividade colinesterásica, quando comparado com os indivíduos controle.

Os valores encontrados para atividade colinesterásica para HgCl<sub>2</sub> foram de 210,0(n mol.min1.mg<sup>-1</sup>), para MeHg os valores foram de 80,0(n mol.min1.mg<sup>-1</sup>) e para o grupo controle os valores foram de 180,0(n mol.min1.mg<sup>-1</sup>). Isso mostra que a espécie *Hoplias malabaricus* possui grande susceptibilidade ao metilmercúrio, confirmando a tendência de que a atividade da enzima é inibida quando exposta a algum agente anticolinesterásicos. Sendo portanto considerada uma ótimo biomarcador de efeito de contaminação.

## CONCLUSÃO

A análise da concentração de mercúrio em músculo axial de traíras expostas ao MeHg e HgCl<sub>2</sub>, confirmou que a traíra teve uma tendência em acumular metilmercúrio durante o tempo de exposição utilizada no atual trabalho, possibilitando uma compreensão da toxicidade desse metal pesado em peixes.

Através da realização destes testes em laboratório, mesmo sendo via injeção intraperitoneal, forma de caráter não realística, foi possível conhecer como as diferentes formas do mercúrio agem no tecido muscular, afetando a atividade enzimática da acetilcolinesterase no tempo de 96h de todos os indivíduos que foram expostos ao MeHg e HgCl<sub>2</sub>. As medidas da atividade colinesterásica em músculo axial de traíras expostas ao metilmercúrio confirmaram a neurotoxicidade deste metal em peixes; já que os valores apresentados com relação à inibição da atividade colinesterásica foram maiores, quando comparados com o HgCl<sub>2</sub> e ao controle.

## REFERÊNCIAS

- Anderson, H.A; Hanrahan, L.P.; Smith, A; Draheim, L.; Kanarek, M. & Olsen, J. 2004. The role of sport - fish consumption advisories in mercury risk communication: a 1998 - 1999 12 - state survey of women age 18 - 45. *Environmental research*, 95:315 - 324.
- Aschner, M. 2002. Neurotoxic mechanisms of fish - borne methylmercury. *Environmental toxicology and pharmacology*, 12:101 - 104.
- Cajaraville, MP, Bebianno, JM, Blasco, J, Porte, C, Sarasquete, C, Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*; 247: 295
- Dallinger, R. & Raimbo, P.S. 1993. *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Chelsea ,Lewis publishers.
- Gochfeld, M. 2003. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and environmental safety*, 56:174 - 179.
- Joiris, C.R.; Hirenda, K.DAS & Holsbeek, L. 2000. Mercury accumulation and speciation in marine fish from bangladesh. *Marine pollution bulletin*, 40:454 - 457.
- Mela, M. 2004. Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) (Traíra). Tese de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- Palenzuela, B.; Manganiello, L.; Rios, A. & Valcarcel, M. 2004. Monitoring inorganic mercury and methylmercury species with liquid chromatographypiezoelectric detection. *Environmental research section*, 511:289 - 294.
- Stegeman, J.J.; Brouwer, M.; Di Giulio, R.T.; Forlin, L.; Fowler, B.A.; Sanders, B.M. & Van Veld. 1992 P.A. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: *Biomarkers Biochemical. Physiological, and histological markers of antropogenic stress* (Huggett, R.J.; Kimerley, R.A.; Mehrle, P.M.Jr.; Bergman, H.L.). Eds. Lewis Publishers, 235 - 234.
- Stenesh, J. 1998. *Biochemistry*. New York: Plenum. In: *Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR)* (Costa, J. R. M. A).
- Viana, TAP. 2005. *Bioindicadores e mercúrio em tubarões costeiros pescados no estado do Rio de Janeiro, Brasil*. [Monografia de bacharelado ] Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro.