

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

**ATIVIDADE COLINESTERÁSICA NO MONITORAMENTO
AMBIENTAL: IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE
PARÂMETROS CINÉTICOS EM PEIXES ESTUARINOS**

Biol. Vanessa Tortelli

Tese defendida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em Fisiologia Animal Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Elton Pinto Colares

Co-orientador: Prof. Dr. José Maria Monserrat

Rio Grande
2005

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, o Prof. Dr. Elton Pinto Colares e o Prof. Dr. José Maria Monserrat primeiramente por me aceitarem como orientada (mesmo vindo de tão longe e sem evidências de que seria uma boa aluna), pelo carinho e atenção, e principalmente pela paciência. Foi muito bom chegar a Rio Grande e poder contar com vocês sempre (quase conseguiram fazer com que não sentisse saudades de casa). Também quero agradecer ao Prof. Dr Adalto Bianchini meu orientador ocasional, pelas correções, grande ajuda durante terríveis dúvidas e pelas boas risadas durante o Ecotox.

Ao Projeto Milênio, pela oportunidade de fazer parte de um projeto grandioso; foi muito gratificante poder dar a minha colaboração. Também devo agradecer por terem proporcionado coletas extremamente organizadas, e grande apoio logístico (inclusive os famosos lanches que ficaram conhecidos como Mac Milênio Feliz!).

Gostaria também de agradecer a todos os professores do DCF, que me receberam com muita alegria (sempre cheios de informações científicas e piadinhas) que fazem com que estes dois anos passem bem rápido.

Um obrigado especial pros amigos que compartilham muitos trabalhos e muitas coisas boas também! Alguns em especial acabaram virando babás ocasionais do Igor, como a Grazi e a Lílian, outros agüentaram as brincadeiras “levemente” violentas dele (Nino e Ju) e a todos os amigos queridos (não vou citar nomes, por que são muitos) que vou sentir muita falta assim que botar o pé pra fora de Rio Grande. Ao Robaldo pelas grandes informações de laboratório e pelo bom humor sempre presente. A Laura, pelos almoços e paciência comigo durante fim de semanas e feriados.

A minha mãe que agüenta minhas ligações de madrugada (às vezes aos berros), meu irmãozinho e seus e-mails, e ao Igor meu filhote por acompanhar todos os meus ensaios de seminários e saber que a mamãe trabalha com a colinesterase.

O último é pro Gustavo (aluno mais bonito do mestrado), pelo carinho, atenção, paciência, amor e por ter deixado de ser um solteirão convicto e topou dividir a sua vida comigo, te amo muito.

ÍNDICE

Resumo Geral	4
Introdução	6
Objetivo Geral	15
Use of Cholinesterase Activity In Environmental Monitoring: Importance of Kinetic Parameters Determination In Estuarine Fish	16
Abstract.....	18
1. Introduction	19
2. Materials And Methods	22
3. Results	25
4. Discussion.....	26
References	30
Figure Captions	40
Conclusões.....	44
Referências	45

RESUMO GERAL

Neste trabalho foram analisados os parâmetros cinéticos e a atividade colinesterásica de duas espécies de peixes estuarinos: a corvina *Micropogonias furnieri* (Teleostei, Scianidae) e o bagre *Cathorops spixii* (Teleostei, Ariidae), buscando avaliar o uso destas espécies como bioindicadores da presença de compostos anticolinesterásicos no meio aquático. Os exemplares de corvina e bagre, respectivamente, foram coletados nos estados do RS (Lagoa dos Patos) e PR (Baía de Paranaguá) no inverno (corvina) e verão (corvina e bagre) em dois pontos de coleta: um local controle e outro poluído. Os peixes foram anestesiados (bezocaína, 200 ppm) e os cérebros dissecados, homogeneizados e centrifugados. Foram estimados os parâmetros cinéticos (V_{max} e K_{map}), utilizando iodeto de acetiltiocolina como substrato, nas seguintes concentrações: 0,025; 0,05; 0,2; 0,8; 1,6; 3,2 e 9 mM. Nos estudos de inibição enzimática foi utilizado o carbamato eserina em concentrações de 0,3 a 10 mM e de 1×10^{-4} a 1 μ M, a fim de determinar os parâmetros cinéticos de inibição e a concentração de eserina que inibia 50% da atividade colinesterásica (CI_{50}), respectivamente. Os resultados mostraram pouca variação nos valores de K_{map} nas duas espécies, porém diferenças significativas nos valores de CI_{50} foram observadas, indicando que a ChE do cérebro da corvina *M. furnieri* é resistente à inibição por eserina. Nos estudos de cinética de inibição da ChE do cérebro do bagre *C. spixii*, foram encontradas diferenças entre alguns parâmetros, quando foram comparados os peixes coletados no local controle com aqueles coletados no local poluído. Houve uma maior atividade colinesterásica de bagres coletados no local poluído ($p < 0,05$), sendo que o mesmo resultado foi observado em exemplares de corvinas *M. furnieri* coletados durante o inverno no local poluído. Os resultados obtidos *in vitro* demonstram que a ChE de *M. furnieri* possui pouca sensibilidade à eserina.

Porém, o fato de ter sido registrada inibição colinesterásica nos organismos coletados durante o verão região poluída sugere a possibilidade de alterações significativas na capacidade de bio-oxidação de pesticidas nesta espécie, ou a possibilidade de inibição por outros contaminantes que também afetam a atividade colinesterásica, como por exemplo, metais. No caso de *C. spixii*, a determinação dos parâmetros cinéticos e de atividade colinesterásica sugere que pode estar ocorrendo alterações bioquímicas nos peixes previamente expostos a contaminantes no ambiente, provavelmente devido a respostas adaptativas ao ambiente impactado. Desta forma, o presente estudo indica a importância de estudos cinéticos prévios, quando se utiliza ou pretende utilizar, a atividade colinesterásica como bioindicador da presença de compostos anticolinesterásicos no ambiente em espécies aquáticas.

Palavras chave: atividade colinesterásica, cinética de inibição, eserina, estuários, peixes estuarinos, poluição

INTRODUÇÃO

O ambiente aquático está exposto a processos de poluição causados pelo ingresso de uma grande variedade de contaminantes. Estes contaminantes podem atingir ambientes aquáticos (costeiros e continentais) de várias formas, como esgoto urbano, transporte eólico, deposição atmosférica, lançamentos acidentais, escoamento de produtos usados na agricultura e pecuária, bem como sob a forma de efluentes industriais resultantes da produção de pesticidas (Livingston, 1998).

A avaliação do efeito destes contaminantes nos organismos pode ser utilizada em programas de biomonitoramento. De acordo com Martin (1988), o biomonitoramento é um sistema de avaliação biológico, no qual a resposta de um organismo vivo é usada para detectar a presença de alguma condição de interesse, e são denominados como biomarcadores, os efeitos em fluídos corpóreos, células ou tecidos que indicam a presença de contaminantes (Vasseur & Cossu-Leguille, 2003).

O estudo de biomarcadores compreende um vasto ramo de pesquisa que detecta e avalia o impacto de poluentes nos organismos expostos, e pode ser dividido em: biomarcadores morfológicos, moleculares, bioquímicos ou fisiológicos. As respostas adversas (fisiológicas, comportamentais ou energéticas) dos organismos expostos, também são consideradas como biomarcadores (Fent, 2003). Assim, biomarcadores têm sido sensível instrumento de monitoramento e indicação de riscos ambientais em organismos aquáticos (Rodriguez-Fuentes & Gold-Bouchot, 2000).

A atividade colinesterásica tem sido usada como biomarcador de presença de alguns pesticidas, como os organofosforados e carbamatos, bem como de toxinas quimicamente semelhantes a pesticidas organofosforados. Os inseticidas organofosforados e carbamatos são amplamente utilizados na agricultura em substituição aos organoclorados. Esta substituição é devida ao fato de que os

organofosforados e carbamatos serem mais tóxicos, porém de menor persistência no ambiente e nos seres vivos (Morris et al., 1995, Rao et al., 2003, Ferrari et al., 2004). Os inseticidas organofosforados também são utilizados na aquicultura, para combater ectoparasitas, como o isópodo *Ceratothoa gaudichaudii* (Sievers et al., 1995).

Os pesticidas organofosforados e carbamatos são, respectivamente, ésteres do ácido fosfórico e do ácido carbâmico, susceptíveis à degradação no meio ambiente e nos organismos, sendo menos estáveis que os pesticidas organoclorados. Os organofosforados e carbamatos, ou seus metabólitos, possuem um mecanismo de ação comum, a inibição da acetilcolinesterase. Esta enzima tem a função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares (Beuvais et al., 2001).

A existência de colinesterases foi postulada em 1914 por Dale e demonstrada por Lolwi e Navrotil em 1926. Em 1937, Marnay e Nachmansotin observaram grandes concentrações de acetilcolinesterase nas junções neuromusculares e órgãos elétricos de *Torpedo* e *Electrophorus*. Desde então, as colinesterases vêm sendo estudadas por um grande número de pesquisadores (Massoulié et al., 1993).

A acetilcolinesterase possui dois sítios ativos responsáveis pela degradação de acetilcolina: o sítio esterásico e o sítio aniônico. O sítio aniônico possui um grupo carboxila do aminoácido aspartato ou glutamato, e tem como função atrair o nitrogênio quaternário positivo da acetilcolina. O sítio esterásico é composto por três aminoácidos chamados de tríade catalítica: serina, histidina e glutamato. Este sítio exerce a função hidrolítica da enzima, através de forças eletrostáticas, dipolo-dipolo, hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e de van der Waals. Desta forma o sítio aniônico funciona atraindo o substrato (acetilcolina) para ligar-se à enzima, e o sítio esterásico funciona transformando o substrato em produto. No final da reação, a acetilcolinesterase estará

acetilada, mas desdobra-se rapidamente em enzima livre e ácido acético (Soreq & Seidman, 2001).

A acetilcolinesterase possui ampla distribuição nos grupos animais, tanto em invertebrados como em vertebrados, com diferentes valores de atividade e sensibilidade nas distintas espécies (Bocquené, et al., 1990). Ela é encontrada principalmente em sinapses do sistema nervoso central. É também denominada colinesterase I ou específica, de acordo com sua afinidade pela acetilcolina (Habig & DiGiulio, 1988).

Além da acetilcolinesterase, há também outras formas de colinesterases, como a butirilcolinesterase, também chamada de colinesterase II ou inespecífica. A butirilcolinesterase é encontrada, principalmente no plasma e fígado. Esta enzima possui, em média, 50% de homologia com a acetilcolinesterase e considera-se que a butirilcolinesterase atua como “scavenger” de inibidores colinesterásicos, preservando a atividade da acetilcolinesterase (Johnson & Moore, 2002, Schwarz et al., 1995). Outras diferenças entre a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase são: o fato de possuírem inibidores específicos, diferentes níveis de sensibilidade ao substrato e parâmetros cinéticos próprios, além de terem diferentes locais de ação nos organismos (Massoulié, et al., 1999).

Ambas, acetil e butirilcolinesterase são encontradas nos tecidos nas formas livres, denominadas globulares, e nas formas ligadas à membrana chamadas de assimétricas (Lassiter et al., 2003). De acordo com Massoulié & Bon (1982), existe uma subunidade catalítica básica que é responsável, através de associações, pelas formas mais complexas: o monômero globular (G_1). O dímero (G_2) é formado através de pontes dissulfeto entre duas formas (G_1); e dois dímeros (G_2) formam um tetrâmero (G_4), provavelmente através de interações de van der Waals (Ferenczy et al., 1997). Os tetrâmeros podem, através de ligações covalentes via ponte dissulfeto, ligar-se a

subunidades de colágeno, interligadas em forma de espiral, sendo que cada subunidade liga-se a um tetrâmero catalítico, formando a denominada cauda de colágeno (Massoulié et al., 1993). No geral, de uma a três cabeças de tetrâmeros podem se ligar a uma cauda, criando as formas assimétricas (A_4 , A_8 e A_{12}).

As formas globulares (G_1 , G_2 e G_4) são igualmente extraídas com tampões iônicos fracos ou com ajuda de detergentes, no caso de estarem ligadas à membrana. As formas assimétricas não interagem com detergentes, mas são solubilizadas em tampões com altas concentrações de sal (Chatonnet & Lockridge, 1989). A forma G_4 é encontrada no plasma sanguíneo e líquido cérebro-espinhal. As formas assimétricas ocorrem, geralmente, no músculo esquelético, coração e órgãos elétricos de vertebrados, mas não foi encontrada em invertebrados (Massoulié et al., 1993). No cérebro, a proporção de formas assimétricas de acetilcolinesterase é relativamente grande em peixes, anfíbios e répteis; e pequena em grandes vertebrados (Ferenczy et al., 1997).

A acetilcolinesterase tem sua atividade inibida pela ação de compostos anticolinesterásicos. Estas substâncias podem ser de origem natural, como formas produzidas por cianobactérias (anatoxina-a(s)) e outros microorganismos, que podem ocorrer como consequência indireta de poluição, além da ação tóxica de substâncias utilizadas em inseticidas, como organofosforados e carbamatos, citados anteriormente (Monserrat et al., 2001).

Estas substâncias, após a sua incorporação no organismo, podem seguir duas diferentes vias enzimáticas de desintoxicação. A primeira é através da troca do oxigênio pelo hidrogênio no grupamento amino (redução) por enzimas denominadas redutases e posterior hidrólise enzimática do composto reduzido transformando-o em um fenol, que pode ser facilmente eliminado na urina. A segunda via é através de processos de oxidação realizados por OMF (monooxigenases de função mista) ou pelo citocromo

P450, em que a substância troca o átomo de enxofre ligado ao grupamento fosfato por um átomo de oxigênio (dessulfuração oxidativa). Este metabólito oxidado pode ser conjugado pela GST (glutathione S-transferase), aumentando sua polaridade e favorecendo a sua eliminação, ou pode sofrer ação de hidrolases e ser convertido em fenol e ser posteriormente eliminado (Vasseur & Cossu-Leguille, 2003).

Desta forma, a oxidação é um evento comum no processo de desintoxicação do organismo, já que o metabólito oxidado pode ser conjugado ou hidrolisado por enzimas específicas possibilitando posterior eliminação. Porém, a forma oxidada possui propriedades anticolinesterásicas bem mais pronunciadas que as formas parentais, reduzidas ou conjugadas (Livingstone, 1998, El-Alfy & Schelenk, 1998, Richardson et al., 2001). Portanto um organismo com grande capacidade de oxidação pode ser prejudicado, se não tiver, simultaneamente, também alta capacidade de conjugação ou hidrólise. Vários autores, Richardson et al. (2001), Kousba et al. (2003) e Silva Filho et al. (2004) já estudaram a ação tóxica das formas oxidadas dos pesticidas, verificando inibição *in vitro* da acetilcolinesterase por azinfos-metil-oxon, clorpirifos-oxon e metilparaoxon, respectivamente. O mecanismo de inibição da enzima ocorre através da formação de um complexo enzima-inibidor (reversível) e posterior fosforilação, no caso do organofosforado ou carbamilação, no caso do carbamato. No caso dos organofosforados este segundo complexo é irreversível e inativa a enzima, no caso dos organofosforados, já que a enzima fosforilada é altamente estável e possui baixas taxas de hidrólise, que não ocorre de forma espontânea, mas somente através de oximas, que são conhecidas como drogas reativadoras da acetilcolinesterase (Maxwell et al., 1999). No caso dos carbamatos, as

taxas de hidrólise são maiores, e podem ser quantificadas através do cálculo de uma constante de hidrólise (K_{hidr}) que quantifica a quebra do complexo irreversível.

A enzima inibida por organofosforados possui taxas de hidrólise baixas, mas podem ser reativadas por alguns fármacos (oximas), como a piridina 2-aldoxima (2-PAM). As taxas de reativação da enzima, porém, só ocorrem em determinada faixa de tempo inicial de inibição, já que a enzima inibida pelo organofosforado sofre um processo de dealquilação chamado de “aging”. Após o “aging” a enzima não pode mais ser reativada, perdendo irreversivelmente a sua atividade. As taxas de “aging” variam entre os pesticidas, sendo que os que possuem substituintes metoxi têm taxa de “aging” maior que aqueles que possuem substituintes etoxi ou metoxi-fenilo (Velan et al. 1996). A inibição por anatoxina-a(s), toxina produzida por cianobactérias acontece de forma semelhante aos organofosforados, porém a enzima inibida por esta toxina não sofre reativação, já que a anatoxina-a(s) já possui um grupo metoxi. Ou seja, a anatoxina-a(s) exerce grande toxicidade de forma direta e irreversível, sem necessidade de oxidação como os tio-organofosforados (Monserrat et al., 2001).

Bagchi et al. (1995) estudando o efeito de vários tipos de inseticidas em diferentes tecidos (*in vivo* e *in vitro*) observaram que as respostas de inibição da acetilcolinesterase são diferentes, tanto em relação aos tecidos como em relação ao inibidor estudado, concluindo que a ação tóxica depende da interação entre o inibidor e o tecido alvo.

Além disso, os animais possuem adaptações fisiológicas, que visam diminuir os danos da ação tóxica destas substâncias. Em estudos de adaptação aos compostos anticolinesterásicos, Cossio-Bayugar et al. (2002) observaram em células de carrapato resistentes aos organofosforados um aumento dos níveis de enzimas anti-oxidantes, redução no potencial de membrana plasmática e mitocondrial. Antunes-Madeira & Madeira (1987, 1989), em estudos com diferentes inseticidas e modelos de membrana, observaram que os organofosforados tendem a acumular-se em membranas da mitocôndria e retículo sarcoplasmático e sugerem que a mudança estrutural da membrana pode proteger a célula da acumulação do contaminante.

Algumas espécies adquirem tolerância aos anticolinesterásicos com a diminuição do número e do grau de afinidade dos receptores muscarínicos da acetilcolina. Blanchet et al. (1986) e Beuvais et al. (2001) estudaram, respectivamente, em ratos e larvas de truta arco-íris, os diferentes comportamentos de redução do número e da afinidade destes receptores, após introdução de compostos anticolinesterásicos nos organismos estudados. Esta diminuição da atividade dos receptores visa diminuir o efeito do acúmulo da acetilcolina durante as sinapses, causado pela inibição da acetilcolinesterase, reduzindo assim a hiperatividade das funções colinérgicas causadas pelo aumento da acetilcolina. Estes mecanismos de modulação são geralmente associados à tolerância a compostos anticolinesterásicos

Quando estes mecanismos de adaptação não são suficientes para manter a homeostasia do animal, ou seja, impedir o efeito do acúmulo do neurotransmissor acetilcolina, este terá uma atividade bioelétrica contínua (Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). Esta alteração provoca distintos sintomas entre os animais. Em peixes, são observadas alterações na respiração, natação, alimentação e comportamento em geral,

além de convulsões, perda do equilíbrio e aumento dos movimentos operculares (Vasseur & Cossu-Leguille 2003).

A relação entre exposição aos compostos anticolinesterásicos e a inibição da atividade enzimática tem sido amplamente estudada em organismos aquáticos utilizados como biomonitores (Sturm et al., 1999, Rodríguez-Fuentes & Gold-Bouchot, 2000, De La Torre, 2002). Estes estudos são realizados tanto com invertebrados como com vertebrados (Bocquené et al., 1997). A principal vantagem de se utilizar biomarcadores em níveis baixos de organização biológica como o bioquímico é a possibilidade de detectar precocemente efeitos deletérios dos poluentes, antes de serem evidenciados alterações em níveis de organização biológica superiores (Livingstone, 1998).

Weiss (1958) foi um dos pesquisadores que iniciou os estudos do uso da atividade colinesterásica em peixes, como indicador de exposição aos compostos organofosforados. Vários autores determinaram a atividade colinesterásica em peixes em estudos de biomonitoramento (Magnotti et al 1994; Sturm et al., 1999; Rodríguez-Fuentes & Gold-Bouchot, 2000; Beuvais, et al., 2000; De La Torre et al., 2002; Flammarion et al., 2002; Corsi et al., 2003; Varò et al., 2003; Silva Filho et al., 2004). A vantagem do uso de peixes é que eles apresentam maior capacidade de oxidação que os invertebrados (Livingstone, 1998), tornando-os mais sensíveis aos compostos anticolinesterásicos, sendo, portanto, bons indicadores em avaliações de contaminação por pesticidas que precisem de bio-oxidação para adquirir sua toxicidade.

No Brasil, alguns trabalhos já foram realizados utilizando a atividade colinesterásica, em conjunto ou não com atividade de outras enzimas, em pesquisas

relacionadas à biomarcadores de poluição. Dentre eles estão os de Cunha Bastos et al. (1988), Cunha Bastos et al. (1991), Silva et al. (1993); Monserrat & Bianchini (1998), Ventura et al. (2002), Monserrat et al. (2002) e Silva et al. (2003).

Neste trabalho, foi analisada a atividade colinesterásica do cérebro de duas espécies de peixes estuarinos e demersais: a corvina *Micropogonias furnieri* (Teleostei, Scianidae) coletada na Lagoa dos Patos (RS) e o bagre *Cathorops spixii* (Teleostei, Ariidae) coletado na Baía de Paranaguá (PR), em datas e pontos de coleta determinados previamente pelo projeto “Uso Adquirido dos Recursos Costeiros do Ministério da Ciência e Tecnologia” (RECOS) no âmbito do programa Institutos do Milênio. As coletas foram realizadas durante as estações de inverno e verão. O projeto RECOS foi idealizado tendo como um dos seus objetivos a padronização de espécies e protocolos em estudos com biomarcadores ao longo da costa brasileira.

Devido à abundância e ampla distribuição das duas espécies de peixes escolhidas (Isaac, 1988, Cervigón et al., 1992) e sua facilidade de coleta, é de grande valia a verificação da viabilidade de sua utilização em estudos como biomarcadores de compostos anticolinesterásicos no ambiente. Foram determinados parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase e valores de concentração do carbamato eserina que inibiram 50% da atividade colinesterase (CI_{50}), visto que o fator mais relevante na determinação dos efeitos tóxicos de compostos anticolinesterásicos é a sensibilidade da enzima (Wang & Murphy, 1982, Richardson et al., 2001).

OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo determinar a sensibilidade da colinesterase do cérebro dos peixes *Micropogonias furnieri* e *Cathorops spixi*, caracterizando-a através do estudo de constantes cinéticas, e avaliar a viabilidade do uso da colinesterase do cérebro dos peixes em estudo como biomarcador de compostos anticolinesterásicos no ambiente aquático.

Objetivos Específicos

Caracterizar parâmetros cinéticos e toxicológicos da atividade colinesterásica, tendo como fonte de enzima o cérebro de duas espécies de peixes estuarinos, o bagre *Cathorops spixi* e a corvina *Micropogonias furnieri*.

Comparar os parâmetros cinéticos obtidos, com dados similares observados por outros autores em outras espécies de peixes, e avaliar se as espécies estudadas são apropriadas para serem utilizadas como espécies sentinela em programas de biomonitoramento.

Determinar a concentração de inibidores colinesterásicos que inibem 50% da atividade colinesterásica *in vitro* (CI₅₀) e suas constantes de inibição em exemplares de *C. spixi* coletados em locais com diferentes impactos de poluição .

Avaliar a atividade colinesterásica do cérebro nas duas espécies de peixes (bagre e corvina) coletados em locais com diferentes históricos de poluição e em diferentes estações do ano (inverno e verão).

**USE OF CHOLINESTERASE ACTIVITY IN ENVIRONMENTAL
MONITORING: IMPORTANCE OF KINETIC PARAMETERS**

DETERMINATION IN ESTUARINE FISH

(submetido à revista Marine Pollution Bulletin)

USE OF CHOLINESTERASE ACTIVITY IN ENVIRONMENTAL MONITORING:
IMPORTANCE OF KINETIC PARAMETERS DETERMINATION IN ESTUARINE
FISH

V. Tortelli¹, E.P. Colares^{1,2}, A. Bianchini^{1,2}, J.M. Monserrat^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada -

²Laboratório de Zoofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação

Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, 96201-900-Rio Grande, RS

Brazil

*Corresponding author.

Address: Laboratório de Zoofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas,

Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, 96201-900-Rio

Grande, RS, Brazil.

Phone/Fax: +55 53 233 6850.

E-mail address: jose@octopus.furg.br

Abstract

The aim of the present work was to determine the kinetic parameters and cholinesterase (ChE) activity from two teleost fishes *Micropogonias furnieri* (Scianidae) and *Cathorops spixii* (Ariidae), to verify its suitability as sentinels of aquatic pollution by anticholinesterasic compounds. Fish were collected in a reference and in a polluted site in Southern Brazil. Brain cholinesterase was used as enzyme source. Inhibition kinetic parameters employing ChE from *C. spixii* showed that fish collected in the reference site showed more affinity (K_a) for eserine than those collected in the polluted site. Overall, these differences resulted in similar inhibition constants. Considering the *in vitro* inhibition (IC_{50}) observed with eserine, *M. furnieri* seems to be not a suitable species to be employed a sentinel of anticholinesterasic compounds. Results obtained in the present study point to the importance of kinetic studies when cholinesterasic activity is employed as a biomarker in environmental quality monitoring programs.

Keywords: biomarkers, cholinesterase, eserine , fish, IC_{50} , kinetic parameters

1. Introduction

Anticholinesterasic compounds constitute a major portion of modern synthetic insecticides, including organophosphorus and carbamate pesticides (Valbonesi et al., 2003). When directly released into the environment, these molecules can reach rivers and sometimes the sea, leading to the contamination of various aquatic ecosystems (Mora et al., 1999).

The use of biochemical measurements in organisms as an indicator of pollution can complement chemical analysis, giving information about the adaptive or deleterious responses in organisms containing a certain amount of chemicals. Moreover, among biological effects of pollutants, biochemical ones occur more quickly, thus providing earlier warning of a potential pollution effect (Livingstone, 1998).

Since organophosphates and carbamates have a relatively short half-life, the assessment of cholinesterase (ChE) inhibition is a useful tool to evaluate their environmental impact on aquatic biota, even when they are not longer detectable in the environment (Valbonesi et al., 2003). Considerable efforts have been made in the last two decades to

develop and validate measurements of biological parameters to complement the information given by the chemical analysis of contamination. The main advantage of using biomarkers at low levels of biological organization is the possibility to detect deleterious effect pollutants precociously, before being evidenced alterations in higher levels of biological organization could be observed. Among biochemical biomarkers, the measurement of fish cholinesterase activities has become a classical tool for biomonitoring pollution in marine (Bocquené et al., 1990) and continental waters (Sturm et al., 1999).

Since more than one ChE may be present in tissues of marine fish and that they can show different sensitivities to anticholinesterase agents, it is important to characterize biochemically these enzymes prior their employment as biomarkers in biomonitoring programs (Varò et al., 2003). Moreover, the correlation between brain AChE inhibition and mortality has not been well established, since some species tolerate high levels of brain AChE inhibition and others do not (Ferrari et al., 2004; Silva Filho et al., 2004). Thus, the potential effects of organophosphate and carbamate pesticides are widely variable between different aquatic species.

The dynamics of the interaction of ChE with organophosphate and carbamate compounds has been shown to depend largely upon the affinity of a particular insecticide for the enzyme, commonly represented as the enzyme affinity for a particular insecticide, which is commonly represented as the affinity constant K_a (Wang & Murphy, 1982). Silva Filho, et al. (2004) showed extremely great differences in the inhibition kinetic parameters between several fish species, an important point to be considered in the selection of a fish species to be employed as a sentinel organisms in biomonitoring programs. In this context, the concentration of eserine that inhibits 50%

of cholinesterase activity (IC_{50}) and inhibition kinetic parameters are important characteristics for the selection of sensitive ChEs to be employed as biomarkers.

The relationship between the anticholinesterasic compounds exposure and enzymatic activity has been widely studied and employed as a biomarker in aquatic invertebrate and vertebrate species (Bocquené et al., 1997; Sturm et al., 1999; Rodriguez-Fuentes & Gold-Bouchot, 2000; De la Torre et al., 2002). However, vertebrates are more suitable since they have greater oxidation capabilities than invertebrates when we consider of the P450 system activity (Livingstone, 1998). Considering that many organophosphorus pesticides acquire their anticholinesterasic properties after oxidation by the P450 system, fish species could be *a priori* considered as sensitive organisms to indicate the presence of anticholinesterasic compounds.

However, the use of ChE activity as tool to monitor aquatic pollution by organophosphate or carbamate insecticides requires a good knowledge of the enzyme activity of several fish species of high occurrence and wide distribution in the aquatic environments. Considering the facts previously described, the objectives of the present study were to determine the kinetic parameters and eserine (physostigmine) sensitivity of brain cholinesterases from two estuarine fish species, *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Scianidae) and *Cathorops spixii* (Teleostei: Ariidae) collected in polluted and non-polluted sites in Southern Brazil.

The white mouth croaker *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823), is a subtropical fish found in muddy and sandy bottoms in coastal waters. Its feeding habit varies along the ontogenic development and season, juveniles feed on benthic migratory crustaceans

and sessile mollusks, while adults are benthic feeders, occasionally preying on fish (Isaac, 1998). *Cathorops spixii* (Spix and Agassiz, 1829) is a demersal tropical cat fish found in shallow coastal marine waters and brackish estuaries, lagoons and river mouths, as well as in hypersaline waters. In South America, its distribution includes Atlantic and Caribbean rivers and estuaries from Colombia to Brazil. Adults feed mainly on invertebrates and small fishes, while juveniles feed on amphipods, isopods and copepods (Cervigón et al., 1992).

This study is part of a research project developed along the Brazilian coast, the RECOS project in the scope of the Millenium Institute (Brazilian Ministry of Science and Technology). One of the as well as the aims of the RECOS project is the effective standardization of sampling protocols, quantitative and qualitative evaluations biochemical, physiological and histological biomarkers in different animal species collected polluted and non-polluted sites. In the present study biochemical biomarker responses were analyzed in fish collected in different seasons (winter and summer), to evaluate the natural variability of ChE activity and its sensitivity to eserine inhibition.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Acetylthiocholine iodide, eserine (physostigmine), 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). The protein content was determined using a kit from Doles Reagentes e Equipamentos Ltda. (Belo Horizonte, Brazil), based on Biuret method.

2.2. Organisms

Micropogonias furnieri was collected in summer and winter seasons in reference (unpolluted) site, “Ilha dos Marinheiros” (32°02’005” S and 52°12’151” W) and in a polluted site, “Saco da Mangueira” (32°04’369” S and 52°06’473” W). *Cathorops spixii* was collected only in summer in a reference site, “Baía das Laranjeiras” (25°31’271” S, 48°29’690” W) and in a polluted one, “Baía de Paranágua (25°21’050” S, 48°25’97” W) (Figure 1).

In every case, ten fish were collected in each season and site. Immediately after collection, fish were anesthetized with benzocaine (200 ppm), measured total length and weight and head isolated and stored at –20 °C until arrival at the laboratory, where they were kept at –80 °C before biochemical determinations.

2.3. Enzyme extraction

Fish brain dissected was homogenized (5% w/v) in cold phosphate buffer (0.05 M) containing 20% glycerol at pH 7.40. The homogenate was then centrifuged at 850 xg (4°C) for 15 min. The supernatant was again centrifuged at 12,800 xg (4°C) during 15 min. The supernatant of this last centrifugation was used as enzyme source.

2.4. Enzyme assay

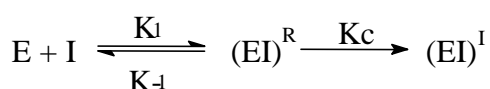
Cholinesterase activity was determined using the method described by Ellman et al., (1961). Phosphate buffer (0.05 M, pH 7.40) was placed at least for 15 min in a water bath at 25°C. Aliquots of homogenate, DTNB and substrate (acetylthiocholine iodide-ATCh) were then added and the absorbance (412 nm) was immediately determined, during 90 s, in an ELISA reader (Victor 2, Perkin Elmer). To determinate the substrate affinity (K_m) and maximum cholinesterase activity (V_{max}), different ATCh

concentrations ranging from 0.025 to 9 mM were assayed, being the cholinesterase activity expressed as $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteins}^{-1}$. In each experiment, a first blank without substrate was assayed to evaluate the reaction of protein thiol groups with DTNB, and a second blank without sample was used to estimate the rate of spontaneous substrate hydrolysis.

2.5. *In vitro* enzyme inhibition by eserine

The sensitivity of brain ChE to inhibition by eserine was investigated. ChE activity was measured on extracts after 5 min of incubation at 25°C with several eserine concentrations, ranging from 1×10^{-4} to 1 μM . Enzyme activity was measured as described above.

Kinetic parameters of enzyme inhibition were also estimated employing the carbamate eserine. The inhibition of an enzyme (E) with an inhibitor (I) can be summarized as follow (Main, 1964):



where $(\text{EI})^{\text{R}}$ represents a reversible enzyme-inhibitor complex and $(\text{EI})^{\text{I}}$ an irreversible one. The affinity equilibrium constant is defined as $K_a = K_{-1}/K_1$ and K_c represents the carbamylation constant (Hastings et al., 1970). The bimolecular inhibition constant, K_i is defined as $K_i = K_c/K_a$. The constants K_a and K_i can be estimated according to the following equation: $1/i = \Delta t \cdot (2.303 \cdot \Delta \log_{10} v)^{-1} \cdot K_i - 1/K_a$, where i represents the inhibitor concentration and $\Delta t \cdot (2.303 \cdot \Delta \log_{10} v)^{-1}$ is the reciprocal of the pseudo-first-order rate of enzyme inhibition at a fixed concentration (i) of the inhibitor (Monserrat et al., 2002). Six

concentrations ranging from 0.3 to 10 mM were tested, at least in duplicate, and after four or five different times of inhibition (range: 30-360 s).

2.6. Data analysis

Enzyme kinetic parameters (V_{\max} and K_m) were estimated by fitting experimental data to Michaelis-Menten equation. IC_{50} values were obtained through probit analysis (Monserrat & Bianchini, 1998). Linear regression and ANCOVA was employed to estimate and compare inhibition kinetic parameters (K_i and K_a). Statistical analysis of enzyme activity was performed using ANOVA followed by *a posteriori* comparisons using the Newman-Keuls test. A significance level of 95% was employed in all cases.

3. Results

Fish from of both species were homogeneous ($P>0.05$) in length and weight at the different sampling sites and seasons analyzed. For *M. furnieri*, the mean weight and total length of fish collected were 25.78 ± 7.72 g and 14.41 ± 1.83 cm, respectively. For *C. spixii*, mean weight and total length of sampled fish were 35.77 ± 11.45 g and 16.14 ± 1.56 cm, respectively.

The Michaelis-Menten constants (K_m and V_{\max}) for brain ChE of *M. furnieri* showed different patterns. K_m values were statistically similar ($P>0.05$) in all seasons and sampling sites (Table 2). On the other hand, V_{\max} showed a complex response, since fish collected in the reference site showed higher values ($P<0.05$) in summer and the opposite was verified in winter (Table 2). Regarding *C. spixii*, no significant difference ($P>0.05$) in the K_m values was observed in summer, the only season analyzed. However,

higher ($P < 0.05$) V_{\max} values was registered in fish collected at the polluted site (Table 2).

ChE from *M. furnieri* showed an extremely lower sensitivity to eserine when compare that observed for the ChE from *C. spixii*. The IC_{50} value (4,472 μM) in the *M. furnieri* was significantly ($P < 0.05$) higher than that in *C. spixii* (0.077 μM).

Taking into account the extremely low reactivity of ChE of *M. furnieri* to eserine, only ChE from *C. spixii* was assayed for determination of inhibition kinetic parameters. Results shows that the affinity constants (K_a) were significantly different ($P < 0.05$) between fish collected at the reference and polluted site ($K_a = 17.18$ and 3.27 mM, respectively). Also differences in carbamylation constants were observed between ChE from fish collected in reference ($K_c = 7.5 \text{ min}^{-1}$) and polluted site ($K_c = 1.24 \text{ min}^{-1}$). No significant difference ($P > 0.05$) was observed between K_i values: 0.44 and $0.38 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for fish collected at the reference and the polluted site, respectively.

4. Discussion

Results obtained in the present study showed inhibition (lower V_{\max} values) of ChE activity *Micropogonias furnieri* collected summer at in the polluted site. However, higher V_{\max} values were registered in fish collected in winter at the polluted site. A similar result was observed for *Cathorops spixii* collected in the summer. Similar results were reported in previous studies. For example, Flammarion et al. (2002) evaluated muscle ChE from *Leuciscus cephalus*, and concluded that most of the observed differences in ChE activity from fish collected in several areas were due to fish length and other natural factors. In fact, a negative correlation between ChE activity and fish length has been documented, including a decrease in brain ChE activity during

ontogeny (Chuiko et al., 1997). However, no difference in length of fish collected at the different sampling sites and seasons was observed in the present study, indicating that the influence of this factor can be ruled out.

The increased V_{\max} values registered in fish collected at the polluted sites could be related to higher ChE concentrations in homogenates. Previous studies reported several potential adaptations to ChE inhibition, including increase synthesis of ChE (Kaufer et al., 1999), a fact that can result in an increased enzyme activity. Stress can also affects ChE activity. It can be generated by several factors, including pollutants, lowering of dissolved oxygen content in water, temperature or salinity variations and the presence of anticholinesterasic compounds. For example, Kaufer et al. (1999) registered an 8-fold increase in AChE mRNA levels under exposure to anticholinesterasic compounds and a 2-fold increase induced by psychological stress in brain mouse. Other compounds like adrenaline can also increase brain ChE and protein synthesis. Pavlov et al. (1994) verified an augmented ChE activity after an increase adrenaline level in fish brain. As previously mentioned, abiotic factors can influence ChE activity. For example, water temperature can exert a significant effect on ChE activity (Bocquené et al., 1990; Chuiko et al., 1997). However, this was not the case in the present study, at least for *M. furnieri*, since water temperature varied on a seasonal basis, but not between sampling sites (winter: $14.6 \pm 2.39^{\circ}\text{C}$, summer: $14.22 \pm 0.99^{\circ}\text{C}$).

The other possibility that can not be ruled out is the presence of anticholinesterasic pollutants in the sampling sites *a priori* considered as non-polluted. The RECOS project aimed to make a prospecting study along the Brazilian coast and results like the obtained in the present study can point to the need of re-evaluate the sampling site

classification. In fish species, it has been shown that the recovery period of ChE after inhibition with carbamate pesticides is shorter than with organophosphates. Ferrari et al. (2004) verified in goldfish exposed to organophosphates pesticides that the recovery of enzyme activity is substantial only after 35 days of transference to clean water. However, enzyme activity recovery after inhibition with carbamate pesticides was much quicker (after 96h). Whether occasional discharges of anticholinesterasic pesticides occurred in the reference sites during the sampling period is a fact that remains to be studied.

For both species analyzed in present study K_m values were higher than those reported other aquatic species, including mollusks and crustaceans. However, De La Torre et al. (2002) showed similar kinetic parameters in the fishes *Cyprinus carpio* and *Cnesterodon decemmaculatus*. However, it is remarkable the fact that both species studied here showed lower V_{max} values than other fish species (Table 3). Previous studies showed that ChE specific activities, kinetic parameters, and sensitivity to anticolinesterasic compounds varied among species (Li & Fan, 1996; Chuiko, 2000). Furthermore, differences among individuals of the same species were also observed (Chuiko et al., 1997). Results from the present study do not indicate conspicuous differences in the kinetic (K_m and V_{max}) parameters of the two species, but a markedly difference in ChE sensitivity to eserine was observed. Table 4 depicts the IC_{50} values for different aquatic species. It can be observed that some fish species are particularly sensitive to eserine (*Odontesthes bonariensis* and *Odontesthes argentinensis*, for example), whereas other aquatic species including mollusks and some crustaceans, like *Chasmagnathus granulata*, show high resistance to eserine inhibition (Table 4). However, it can be observed that ChE from *M. furnieri* showed the lowest sensitivity,

whereas ChE from *C. spixii* showed similar values to other moderately sensitive to eserine species (IC_{50} : 0.077 μ M). Preliminary data from another studies performed in our laboratory with Ariidae species *Hexanemathics hezbergii* showed a similar IC_{50} value for eserine (0.075 μ M) in brain ChE while *Lutjanus synagris* (Teleostei, Lutjanidae) showed intermediary values (0.294 μ M) between Ariidae species and *M. furnieri*. In fish, other authors showed low *in vitro* ChE sensitivity with carbamates and organophosphorus pesticides. Silva Filho et al. (2004) found different levels of ChE inhibition in neotropical fishes, using methyl para-oxon, registering IC_{50} values ranging from 3.34 μ M in *Paralanchurus brasiliensis* to 0.123 μ M in *Prochilodus lineatus*. These authors registered a negative relationship between K_m values and IC_{50} , an unexpected result if we consider that carbamate and organophosphates pesticides are substrate analogues that inhibit cholinesterase. In this way, it can be expected that ChE with lower substrate affinity should present lower sensitivity to anticholinesterasic agents. In fact, some authors like Monserrat & Bianchini (2001) observed a positive correlation between K_m and IC_{50} values for several aquatic species. However, as previously mentioned, Silva Filho et al. (2004) found inverse results in neotropical fishes, fish brain ChE more sensitive to methyl-paraoxon (lower IC_{50}), showed higher K_m values.

Differences in ChE sensitivity and kinetic parameters values were also found by Boquen  et al. (1997) in the common oyster *Cassostrea gigas*. These authors observed two kinds of AChE: an “A” form, without resistance to carbamates and organophosphorus pesticides; and a “B” form, possessing resistance to both kinds of pesticides. These two AChE forms posses different K_m values (“A” form: 77.6 μ M and “B” form: 18 μ M). In the present study, similar K_m values were observed for both

species collected at different sites. However, the inhibition constants were quite different in *C. spixii* collected at the reference and the polluted site (Fig. 3). The inhibition kinetic parameters suggest that the generation of the reversible enzyme-inhibitor complex is more easily formed in ChE from fish collected at the polluted site (lower K_a value). On the other hand, the generation of the irreversible enzyme-inhibitor complex is more likely to occur in ChE from fish collected at the reference site (higher K_c value). Although general sensitivity to eserine, as measured by K_i , seems to be similar in fish collected at the reference and polluted sites, the generation rate of the reversible and irreversible complex are not the same, indicating that the different environments are differentially influencing in some way the kinetic characteristics of *C. spixii* brain ChE.

Results from *in vitro* inhibition assays with eserine showed a low sensitivity of brain ChE from *M. furnieri*. However, fish collected in summer at the polluted site showed lower enzyme activity than those from the reference site, suggesting that seasonal changes in phase I enzymes could be occurring. The higher ChE activity registered in fish collected at the polluted site suggests other factors that influence cholinesterase activity, such as stress responses mediated by adrenaline, as previously reported by Pavlov et al. (1994). Overall, results obtained in the present study indicate that kinetic are necessary before studies using cholinesterase activity as a biomarker of aquatic pollution. Therefore, of ChE activity measurements in fish collected at reference and polluted regions should be analyzed in a broader context, taking into account not only the enzymatic activity but also other physiological parameters affecting it or subtle differences, such as responses in terms of inhibition kinetics to standard anticholinesterasic compounds.

Acknowledgements. This research project was supported by “Projeto RECOS- Instituto do Milênio” (Brazilian Ministry of Science and Technology). V. Tortelli was a recipient of a CNPq fellowship. A. Bianchini and J.M. Monserrat are research fellows from Brazilian CNPq.

References

- 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.
- Bocquené, G., Roig, A. & Fournier, D. 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble Acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Letters* 407, 261-266.
- Cervigón, F., Cipriani, R., Fischer, W., Garibaldi, L., Hendrickx, M., Lemus, A.J., Márquez, R., Poutiers, J.M, Robaina, G. & Rodriguez, B. 1992. Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América. FAO, Rome. 513 p.

- Chuiko, G.M. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticides. *Comparative Biochemistry Physiology* 127, 233-242.
- Chuiko, G.M., Zhelnin, Y. & Podgornaya, V.A. 1997. Seasonal fluctuations in brain acetylcholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus*): a fresh water fish from Northwest Russia. *Comparative Biochemistry Physiology* 117C, 251-257.
- De La Torre, F.R., Ferrari, D. & Salibián, A. 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131, 271-280.
- Ellman, G.L., Courtney, D., Andres Jr., V. & Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-96.
- Flammarion, P., Noury, P. & Garric, J. 2002. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution* 120, 325-330.
- Ferrari, A., Venturino, A. & D'Angelo, A.M.P. 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphos

- methyl, parathion and carbaryl exposure in the gold fish (*Carassius auratus*).
Ecotoxicology Environmental Safety 57, 420-425.
- Habig, C.E & Di Giulio, R.T. 1988. The acetylcholinesterase effect of the cotton defoliant S, S, S, tri-n-butyl phosphorotrithioate (DEF) on channel catfish. *Marine Environmental Research* 24, 193-197.
- Hastings, F.L., Main, A. & Iverson, I. 1970. Carbamylation and affinity constant of some carbamate inhibitors of acetylcholinesterase and their relation to analogous substrate constants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18, 497-502
- Isaac, V.J. 1988. Synopsis of biological data on the white-mouth croaker, *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823). *FAO Fish Synopsis* 150, 1-35.
- Johnson, G. & Moore, S.W. 2002. Catalytic antibodies with acetylcholinesterase activity. *Journal of Immunological Methods* 269, 13-28.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman & S., Soreq, H. 1999. Anticholinesterases induce mutagenic transcriptional feedback response suppressing cholinergic neurotransmission. *Chemico-Biological Interactions* 119-120, 349-360.
- Li, S.N. & Fan, D.F. 1996. Correlation between biochemical parameters and susceptibility of freshwater fish to malathion. *Journal of Toxicology Environmental Health* 48, 413- 418.

- Livingstone, D.R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120, 43-49.
- Main, A.R. 1964. Affinity and phosphorylation constants for the inhibition of esterases by organophosphates. *Science* 144, 992-993.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. & Vallete, F.M. 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress of Neurobiology* 41, 31-91.
- Monserrat, J.M. & Bianchini, A. 1998. Some kinetic and toxicological characteristics of thoracic ganglia cholinesterase of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 120, 193-199.
- Monserrat, J.M. & Bianchini, A. 2001. Anticholinesterase effect of eserine (physostigmine) in fish and crustacean species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* vol 44, 63-68.
- Monserrat, J.M., Bianchini, A. & Bainy, A.C.D., 2002. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Marine Environmental Research* 54, 781-785.
- Mora, P., Fournier, D. & Narbonne, J.F. 1999. Cholinesterases from marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from freshwater bivalve

- Corbicula fluminea* Müller. *Comparative Biochemistry and Physiology* 122, 353-361.
- Pavlov, D.F., Chuiko, G.M. & Shabrova, A.G. 1994. Adrenaline induced changes of acetylcholinesterase activity in the brain of perch (*Perca fluviatilis* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 108C, 113-115.
- Rodriguez-Fuentes, G. & Gold-Bouchot, G. 2000. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research* 50, 357-360.
- Schwarz, M., Loewenstein-Lichtenstein, Y., Glick, D. Liao, J., Norgaard-Pedersen, B. & Soreq, H. 1995. Successive organophosphate inhibition and oxime reactivation reveals distinct responses of recombinant human cholinesterase variants. *Molecular Brain Research* 31, 101-110.
- Silva Filho, M.V., Oliveira, M.M., Salles, J.B., Cunha Bastos, V.L.F., Cassano, V.P.F. & Cunha Bastos, J. 2004. Methyl-paroxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterase from brain of neotropical fishes. *Toxicology Letters* 153, 247-254.
- Singhy, A. & Spassova, D. 1998. Effects of hexamethonium, phenothiazines, propranolol and ephedrine on acetylcholinesterase carbamylation by physostigmine, aldicarb and carbaryl: interaction between the active site and the

functionally distinct peripheral sites in acetylcholinesterase. *Comparative Biochemistry Physiology* 119, 97-105.

Sturm, A., Silva, H.C. & Hansen, P.D. 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research* 47, 389-398.

Valbonesi, P., Sartor, G. & Fabbri, E. 2003. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *The Science of the Total Environment* 312, 79-88.

Varò, I., Navarro, J.C., Amat, F. & Guilhermino, L. 2003. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 75, 61-72.

Wang, C. & Murphy, S.D. 1982. The role of non-critical binding proteins in the sensitivity of Acetylcholinesterase from different species to diisopropyl fluorophosphates (DFP), *in vitro*. *Life Science*, 31, 139-149.

Table 1. Substrate affinity constant (K_m) and maximal activity (V_{max}) of brain cholinesterase from brain of *Cathorops spixii* and *Micropogonias furnieri*. K_m is expressed in mM and V_{max} in $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of protein⁻¹. Values are expressed as mean \pm 1 S.D. (n= 4-10). Equal letters means absence of significant differences ($P>0.05$) for each kinetic parameter and fish species.

Fish	Season	Site	K_m	V_{max}
<i>C. spixii</i>	Summer	Reference	0.196 \pm 0.078 a	21.1 \pm 5.0 a
		Polluted	0.155 \pm 0.048 a	31.0 \pm 8.0 b
<i>M. furnieri</i>	Summer	Reference	0.201 \pm 0.076 a	18.6 \pm 1.2 a
		Polluted	0.158 \pm 0.067 a	12.5 \pm 2.8 b
	Winter	Reference	0.179 \pm 0.039 a	11.6 \pm 4.6 b

Polluted	0.170 ± 0.029 a	17.5 ± 5.3 a
----------	---------------------	------------------

Table 2. Substrate affinity constant (K_m , expressed in mM) and maximal activity (V_{max} , expressed in $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteins}^{-1}$) registered for several aquatic organisms. F: fish, C: crustacean, M: mollusk.

Species	K_m	V_{max}	Reference
<i>Odontesthes argentinensis</i> (F)	0.050	180	Monserrat and Bianchini (2001)
<i>Callinectes sapidus</i> (C)	0.060	550	Monserrat and Bianchini (2001)
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (M)	0.076	18.36	Valbonesi et al. (2003)
<i>Ostrea edulis</i> (M)	0.093	4.82	Valbonesi et al. (2003)
<i>Oreochromis niloticus</i> (F)	0.102	229.3	Rodríguez-Fuentes and Gold- Bouchot (2000)
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (F)	0.170	464.6	De la Torre et al. (2002)
<i>Cyprinus carpio</i> (F)	0.230	482.1	De la Torre et al. (2002)

Table 3. Concentration of eserine that inhibits 50% of cholinesterase activity (IC_{50} , in μM) in different fish (F), crustaceans (C) and mollusks (M) species. Inhibition kinetic parameters are also showed. K_a : affinity equilibrium constant (in mM). K_c : carbamylation constant (in min^{-1}). K_i : bimolecular inhibition constant (in $mM^{-1}.min^{-1}$).

Species	K_a	K_c	K_i	IC_{50}	Reference
<i>Oreochromis niloticus</i> (F)				9.76×10^{-4}	Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot (2000)
<i>Odontesthes bonariensis</i> (F)				1×10^{-3}	Montserrat et al. (2002)
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (F)	3.4×10^{-3}	0.39	137.5	1.43×10^{-3}	De la Torre et al. (2002)
<i>Ciprinus carpio</i> (F)	2.1×10^{-3}	1.18	244.2	5×10^{-3}	De la Torre et al. (2002)
<i>Cathorops spixii</i> (F)	17.2	7.5	0.44	7.7×10^{-2}	Present work
<i>Oestrea edulis</i> (M)				0.10	Valbonesi et al. (2003)
<i>Ictalurus punctatus</i> (F)				0.34	Habig & Di Giulio (1988)
<i>Crassostrea</i>	1.6×10^{-2}	0.83	51.0	0.91	Montserrat et al. (2002)
<i>Rhizophorae</i> (M)					
<i>Perna perna</i> (M)				4.58	Montserrat et al. (2002)
<i>Micropogonias furnieri</i> (F)				4,472.00	Present work

Figure captions

Figure 1. Sites of collection of *Micropogonias furnieri* and *Cathorops spixii* in Southern Brazilian coast. **R:** reference site. **P:** polluted site.

Figure 2. Inhibition percentage of brain cholinesterase from *Micropogonias furnieri* and *Cathorops spixii* after exposure to different concentrations of eserine. Data are expressed as mean \pm 1 S.D. (n= 3)

Figure 3. Determination of inhibition kinetics parameters of ChE from *Cathorops spixii* collected in reference and polluted sites, using different eserine concentrations (range: 0.3 to 10 mM). $\Delta t \cdot (2.303 \cdot \Delta \log_{10} v)^{-1}$ is the reciprocal of the pseudo-first-order rate of the enzyme inhibition at a fixed concentration (*i*) of the inhibitor. Data are expressed as mean of 2-3 independent experiments.



Figure 1

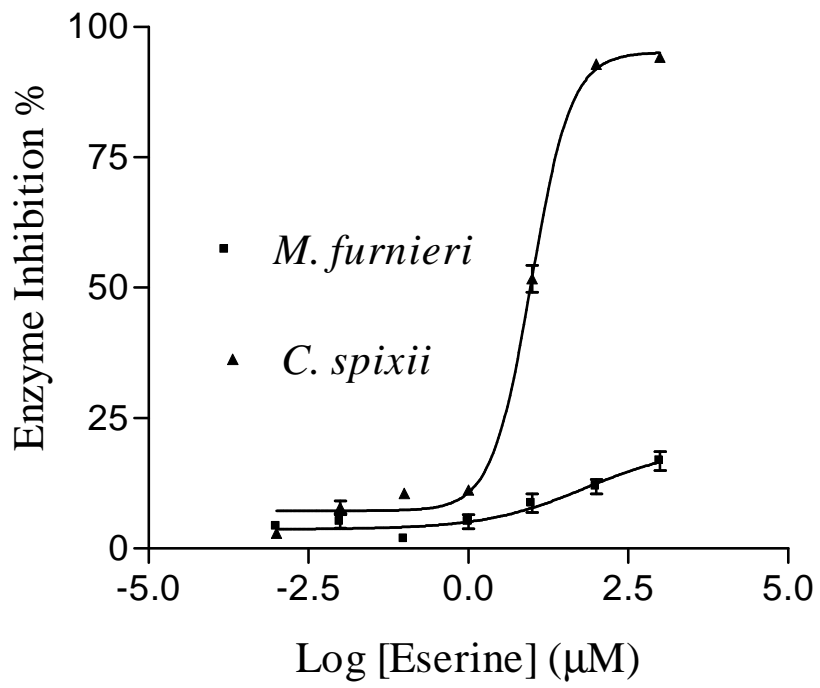
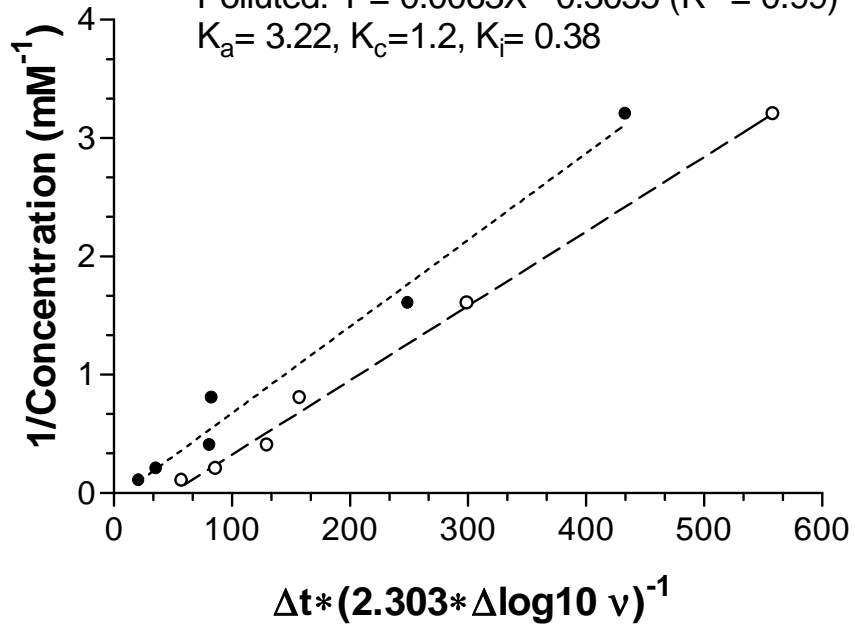


Figure 2

• Control: $Y = 0.0073X - 0.0582$ ($R^2 = 0.98$)
 $K_a = 17.2, K_c = 7.5, K_i = 0.44$

○ Polluted: $Y = 0.0063X - 0.3055$ ($R^2 = 0.99$)
 $K_a = 3.22, K_c = 1.2, K_i = 0.38$



CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a ChE cerebral da corvina *Microponias furnieri* possui baixa sensibilidade a eserina, sugerindo que este parâmetro não é um eficiente biomarcador de pesticidas organofosforados e carbamatos. No caso do bagre *Cathorops spixii*, as diferenças nos parâmetros cinéticos de inibição sugerem alterações em nível bioquímico nos peixes coletados no local controle poluído, demonstrando assim a dificuldade em se comparar peixes da mesma espécie coletados em locais com diferentes históricos de poluição. A atividade colinesterásica significativamente mais alta nos peixes do local poluído, também sugere que pode estar ocorrendo diferenças em peixes que foram previamente expostos a contaminantes, provavelmente devido à respostas adaptativas ao ambiente impactado. Desta forma, o presente estudo indica a importância da necessidade de estudos cinéticos prévios quando se utiliza ou pretende utilizar a atividade colinesterásica como bioindicador da presença de compostos anticolinesterásicos no ambiente aquático.

REFERÊNCIAS

- Antunes-Madeira, M.C. & Madeira, V.M.C. 1989. Membrane fluidity as affected by the insecticide lindane. *Biochemica et Biophysica Acta* 982, 161-166.
- Antunes-Madeira, M.C. & Madeira, V.M.C. 1987. Partition of malathion in synthetic and natives membranes. *Biochemica et Biophysica Acta* 901, 61-66.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. A. & Stohs, S.J. 1995. *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 104, 129-140.
- Beuvais, S.L., Jones, S.B., Parris, J.T., Brewer, S.K. & Little, E.E. 2001. Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 84-90.
- Blanchet, G., Baubichon, D., Mavet, S., Morelis, P. & Lemercier G. 1986. Modulation of the number of muscarinic receptors in mouse neuroblastoma cells by Soman. *Biochemical Pharmacology* 22, 4077-4081.
- 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.

- Bocquené, G., Roig, A. & Fournier, D. 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Cassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble Acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Letters* 407, 261-266.
- Cervigón, F., Cipriani, R., Fischer, W., Garibaldi, L., Hendrickx, M., Lemus, A.J., Márquez, R., Poutiers, J.M, Robaina, G. & Rodriguez, B. 1992. Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América. FAO, Rome. 513 p
- Chatonnet, A. & Lockridge, O. 1989. Comparison of acetylcholinesterase and butirilcholinesterase. *Biochemistry* 260, 625-634
- Corsi, I., Mariottini, M., Sensini, C., Lancini, L. & Focardi, S. 2003. Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanologica Acta* 26, 129-138.
- Cossio-Bayugar, R., Barhoumi, R., Burghardt, R.C, Gale Wagner, G. & Holman, P.J., 2002. Basal cellular alterations of esterase, glutatione, glutatione S- transferase, intracellular calcium, and membrane potentials in coumaphos-resistant *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) cell lines. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72, 1-9.

- Cunha Bastos, V.L.F., Cunha Bastos, J. & Castro Faria, M.V. 1991. Brain acetylcholinesterase as an *in vitro* detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. *Water Research* 25, 835-840.
- Cunha Bastos, V.L.F., Cunha Bastos Neto, J., Medonça, R.L. & Castro Faria, M.V. 1988. Main kinetic characteristics of acetylcholinesterase from brain of *Hypostomus punctatus*, a Brazilian bentonic fish (cascudo). *Comparative Biochemistry and Physiology* 91C, 327-331.
- De La Torre, F.R., Ferrari, D. & Salibián, A. 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131, 271-280.
- El-Alfy, A. & Schlenk, D. 1998. Potential mechanisms of enhancement of aldicarb toxicity to japanese medaka (*Oryzias latipes*), at high salinity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 152, 175-183.
- Fent, K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters* 140-141, 353-365.
- Ferenczy, J., Szegletes, T., Bálint, T., Ábrahám, M. & Nemcsók, J. 1997. Characterization of acetylcholinesterase and its molecular forms in organs of freshwater teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry* 16, 515-529.

- Ferrari, A., Venturino, A. & D'Angelo, A.M.P., 2004 Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in gold fish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 450-425.
- Flammarion, P., Noury, P. & Garric, J. 2002. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution* 120, 325-330.
- Habig, C.E & Di Giulio, R.T. 1988. The acetylcholinesterase effect of the cotton defoliant S, S, S, tri-n-butyl phosphorotrithioate (DEF) on channel catfish. *Marine Environmental Research* 24, 193-197.
- Isaac, V.J. 1988. Synopsis of biological data on the whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823). *FAO Fish Synopses*. (150).
- Johnson, G. & Moore, S.W. 2002. Catalytic antibodies with acetylcholinesterase activity. *Journal of Immunological Methods* 269, 13-28.
- Kousba, A.A., Poet, T.S. & Timchalk, C. 2003. Characterization of the *in vitro* kinetic interaction of chlorpyrifos-oxon with rat salivary cholinesterase: a potential biomonitoring matrix. *Toxicology* 188, 219-232.

- Lassiter, T. L., Marshall, R.S., Jackson, L.C., Deborah, L.H., Vu, J.T. & Padilla, S. 2003. Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. *Toxicology* 186, 241-253.
- Livingstone, D.R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environmental. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 57, 195-211.
- Livingstone, D.R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120, 43-49.
- Magnotti, R.A., Zaino, J.P. & McConnell, R.S. 1994. Pesticide-sensitive fish muscle cholinesterases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 108C, 187-194.
- Martin J.V. 1988. Biomonitoring of polluted waters: three systems. Automated biomonitoring. Living sensors as environmental monitors. Eds. Gruber DS, Diamond JM, John Wiley and Sons, New York, pp. 172-181.
- Massoulié, J. & Bon, S. 1982. The molecular forms of cholinesterase in vertebrates. A review. *Neuroscience* 5, 57-106.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. & Vallete, F.M. 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress of Neurobiology* 41, 31-91.

- Massoulié, J., Anselmet A., Bom, S., Krejci, E., Legay, C., Morel N. & Simon, S. 1999. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chemico-Biological Interactions* 119, 29-42.
- Maxwell, D.M., Saxena, A. Gordon, R.K. & Doctor, B.P. 1999. Improvements in scavenger protection against organophosphorus agents by modification of cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions* 119-120, 419-428.
- Monserrat, J.M. & Bianchini, A. 1998. Some kinetic and toxicological characteristics of thoracic ganglia cholinesterase of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 120, 193-199.
- Monserrat, J.M., Yunes, J.S. & Bianchini, A. 2001. Effects of *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1228-1235.
- Monserrat, J.M., Bianchini, A. & Bainy, A.C.D. 2002 Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Marine Environmental Research*, 54, 781-785.
- Morris, P., Alexandre, I., Roger, M. & Remacle, J. 1995. Chemiluminescence assays of organophosphorus and carbamate pesticides. *Analytica Chimica Acta* 302, 53-59.

- Rao, J.V., Pavan, S. & Madhavendra, S.S., 2003. Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 296-301.
- Richardson, J.R., Chambers, H.W. & Chambers, J. 2001. Analysis of the additivity of *in vitro* inhibition of cholinesterase by mixtures of chlorpyrifos-oxon and azinphos-methyl-oxon. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172, 128-139.
- Rodriguez-Fuentes, G. & Gold-Bouchot, G. 2000. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research*. 50, 357-360.
- Schwarz, M., Loewenstein-Lichtenstein, Y., Glick, D. Liao, J., Norgaard-Pedersen, B. & Soreq, H. 1995. Successive organophosphate inhibition and oxime reactivation reveals distinct responses of recombinant human cholinesterase variants. *Molecular Brain Research* 31, 101-110.
- Sievers, G. Palácios P., Inostroza, R. & Dölz, H. 1995. Evaluation of the toxicity of 8 insecticides in *Salmo salar* and the *in vitro* effects against the isopode parasite *Ceratothoa gaudechaudii*. *Aquaculture* 134, 9-16.
- Silva Filho, M.V., Oliveira, M.M., Salles, J.B., Cunha Bastos, V.L.F., Cassano, V.P.F. & Cunha Bastos, J. 2004. Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterase from brain of neotropical fishes. *Toxicology Letters* 153, 247-254.

- Silva, H.C., Medina, H.S.G., Fanta, E. & Bacila, M. 1993. Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei). *Comparative Biochemistry and Physiology* 105, 193-199.
- Silva, R.S., Cognato, G.P., Vuaden, F.C., Rezende, M.F., Thiesen, F.V., Fauth, M.G., Bogo, M.R., Bonan C.D. & Dias, R.D. 2003. Different sensitivity of Ca^{+2} -ATPase and cholinesterase to pure and commercial pesticides in nervous ganglia of *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca). *Comparative Biochemistry and Physiology* 1135, 215-220.
- Soreq, H. & Seidman, S. 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature* 2, 295-302.
- Sturm, A., Silva, H.C. & Hansen, P.D. 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research* 47, 389-398.
- Varò, I., Navarro, J.C., Amat, F. & Guilhermino, L. 2003. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 75, 61-72.
- Vasseur, P. & Cossu-Leguille, C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environmental International* 28, 711-717.

- Velan, B., Barak, D., Ariel, N., Leitner, M., Bino T., Ordentlich A. & Shafferman, A. 1996. Modifications of the Ω loop in human acetylcholinesterase. *FEBS Letters* 395, 22-28.
- Ventura, E.C., Gaelzer, L.R., Zanette, J., Marques, M.R.F. & Bainy, A.C.D. 2002. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. *Marine Environmental Research* 54, 775-779.
- Wang, C. & Murphy, S.D. 1982 The role of non-critical binding proteins in the sensitivity of acetylcholinesterase from different species to diisopropyl (DFP) *in vitro*. *Life Science* 31, 139-149.
- Weiss, C.M. 1958. The determination of cholinesterase in brain tissue of three species of fresh water fish and its inactivation *in vivo*. *Ecology* 39, 194-199.