

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



“Filogenia da Sensibilidade da Acetilcolinesterase Cerebral de Peixe ao Metil-paraoxon como um Possível Marcador Ambiental”

por

Amanda Pereira Freitas

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.

Orientadora principal: Prof.^a Dr.^a Ana Rosa Linde-Arias

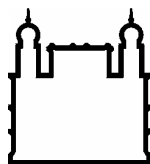
Segunda orientadora: Prof.^a Dr.^a Paula de Novaes Sarcinelli

Rio de Janeiro, março de 2009.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Esta dissertação, intitulada

***“Filogenia da Sensibilidade da Acetilcolinesterase Cerebral de Peixe
ao Metil-paraoxon como um Possível Marcador Ambiental”***

apresentada por

Amanda Pereira Freitas

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Renato Matos Lopes

Prof. Dr. Sérgio Rabello Alves

Prof.^a Dr.^a Paula de Novaes Sarcinelli – Segunda Orientadora

Dissertação defendida e aprovada em 27 de março de 2009.

Catálogo na fonte

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica

Biblioteca de Saúde Pública

F866 Freitas, Amanda Pereira de
Filogenia da sensibilidade da acetilcolinesterase cerebral
de peixes ao metil-paraoxon como um possível marcador am-
biental. / Amanda Pereira de Freitas. --Rio de Janeiro: s.n.,
2009.
xii, 49 f., il., tab.

Orientadora: Arias, Ana Rosa Linde
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Públi-
ca Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2009

1. Monitoramento Ambiental. 2. Filogenia. 3. Peixes.
4. Acetilcolinesterase-administração e dosagem. 5. Metil Parati-
on. 6. Marcadores Biológicos. I. Título.
CDD - 22.ed. –363.7063

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Moacelio, grande companheiro e um verdadeiro pai-amigo, pela parceria, paciência, dedicação e motivação para chegar até aqui.
- À professora Paula, pela orientação, auxílio e carinho ao longo do curso, sempre paciente e sorridente.
- Aos professores Gustavo, Museu Nacional – UFRJ, e Ricardo, UNIRIO, pelo auxílio na identificação e escolha das espécies, fundamental para realização do trabalho.
- Aos meus amigos e companheiros de almoço, Rafaela, Eros, Isa, Francisco, Ana Luíza, Leandro, Dani, Vinício, Marina e Ione, que contribuíram também nos momentos de descontração.
- Ao pessoal do laboratório de Bioquímica da UERJ, Aline, João, Manildo, Lin e ao professor Jayme, por conceder o laboratório para realização das primeiras dosagens deste trabalho.
- Aos pescadores amadores de Itaipuaçu, que cederam gentilmente os exemplares utilizados na pesquisa.
- Ao meu pai, que sempre me incentivou a prosseguir nos estudos e por todo seu amor e apoio durante a minha vida.
- À minha mãe, à vovó Olinda, minha irmã querida, Sabrina, e meu cunhado Leandro, pelo apoio, paciência e por proporcionarem momentos inesquecíveis na minha vida.
- Ao meu futuro marido, Dhéo, por estar ao meu lado em todos os momentos, dando força, paz, equilíbrio e servindo de ouvido para os comentários tentando sempre estar por dentro do meu trabalho.
- E a todos que colaboraram indiretamente, cujos nomes não foram citados, e a Deus por me dar saúde e colocar em minha vida pessoas tão maravilhosas.

“É durante as fases de maior adversidade
que surgem as grandes oportunidades de se
fazer o bem a si mesmo e aos outros”.

Dalai-Lama

RESUMO

Todos os animais com células nervosas e musculares possuem a enzima acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7, AChE) e essa seqüência de aminoácidos está presente em muitas outras proteínas, com ou sem atividade catalítica, fato que permite que essa proteína seja utilizada em estudos de filogenia e de evolução. A grande diferença de afinidade entre substratos e inibidores é utilizada como um biomarcador para estudos genéticos de vários grupos de animais, especialmente insetos. Peixes possuem uma grande diferença na sensibilidade da AChE ao metil-paraoxon (MP) em relação aos animais terrestres e essa diferença pode estar relacionada à evolução. As constantes cinéticas de inibição (CCI) para o mecanismo de inibição progressivamente irreversível da AChE cerebral ao MP foram determinadas em duas fontes de AChE como um modelo para avaliação do potencial de uso das CCI como biomarcador para estudos evolucionários e filogenéticos. As CCI da AChE cerebral de seis exemplares de tainha (*Mugil liza*), coletados em duas lagoas da costa do Estado do Rio de Janeiro (Araruama e Saquarema), em tempos diferentes (2005 e 2007, respectivamente), foram determinadas em dois laboratórios distintos (CESTEH - FIOCRUZ e Dept. Bioquímica - UERJ). As CCI, medidas separadamente em cada exemplar, indicaram que essas constantes são preservadas em todos os exemplares de uma mesma espécie e que a metodologia empregada pode ser conduzida em laboratórios distintos sem grandes variações. A AChE cerebral de tainha foi tomada como um exemplo de enzima menos sensível ($IC_{50} = 2118nM$) e a de galinha comercial (*Gallus gallus domesticus*) como um exemplo de uma enzima muito mais sensível ao MP ($IC_{50} = 26nM$). Alguns testes foram feitos para a validação dessa metodologia. A AChE cerebral dessas duas fontes de enzima foi parcialmente purificada descartando o sobrenadante do homogeneizado e solubilizando o sedimento com o detergente Triton X-100. A inibição da atividade de AChE nessas preparações pelo substrato acetiltiocolina, comportamento típico da AChE, comprovou a homogeneidade dessa atividade enzimática como representativa da AChE verdadeira em cada animal. A utilização do MP permitiu aferir as soluções de inibidor com métodos colorimétricos no momento do uso e a preparação solúvel de AChE eliminou artefatos insolúveis que atrapalham a quantificação da enzima. Algumas características matemáticas do cálculo das CCI foram discutidas e um modelo foi validado para ser utilizado em estudos de evolução e filogenia de peixes marinhos da costa brasileira. Como a AChE cerebral de todos os animais terrestres, cujos resultados estão disponíveis, é muito mais sensível ao MP, exemplares de uma espécie de baiacu (baiacu-arara, *Lagocephalus laevigatus*) foram testados como um exemplo de peixe mais jovem na escala evolutiva. Os resultados das CCI da AChE cerebral para essa espécie ($IC_{50} = 2243nM$) indicaram que entre os peixes a idade evolutiva não está correlacionada com a sensibilidade aos organofosforados. A AChE mais sensível entre os peixes testados foi a de um tipo de bagre (bagre-branco, *Genidens barbatus*, $IC_{50} = 606nM$) e a enzima do cação-frango (*Rhizoprionodon porosus*), exemplo de um peixe mais antigo na evolução, apresentou uma sensibilidade intermediária ($IC_{50} = 1280nM$). Estudos com outras espécies correlacionadas com aquelas que se mostraram mais sensíveis ao MP terão que ser feitos para uma resposta mais adequada sobre o uso das CCI de inibição da AChE cerebral por MP como possível marcador evolutivo e filogenético.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, filogenia, metil-paraoxon, biomarcador

ABSTRACT

The enzyme acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7, AChE) is present in all animals with neurons and muscle cells, and many other proteins have the same sequence, with or without catalytic activity, allowing them to be used for phylogenetic and evolutionary studies. The great difference between substrates and inhibitor affinities makes it useful as a biomarker for genetic studies of various animals groups, especially insects. There are great differences among fish in AChE sensitivity to methyl-paraoxon (MP) in relation to terrestrial animals, and these differences can be related to evolution. The inhibition kinetic constants (IKC) for progressive irreversible inhibition of brain AChE with MP were determined in these two AChE sources as models for evaluating IKC as potential biomarkers in evolutionary and phylogenetic studies, especially among fish. IKC of brain AChE from six specimens of *Mugil liza*, a very common coastal fish, was collected from two of Brazil's lagoons in Rio de Janeiro State during 2005 at Araruama and 2007 at Saquarema. First samples were assayed at CESTEH - Fundação Oswaldo Cruz and the latter at Dept. Bioquímica - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. The IKC was measured separately for each fish showing that these constants were maintained for all animals of the same species and that this methodology can be used in different laboratories without variations. The cerebral AChE of tainha was used as an example of a less sensitive enzyme (Concentration which inhibits 50% of enzyme activity after 30 minutes of incubation, or IC₅₀, = 2118nM). The commercial hen (*Gallus gallus domesticus*) was used as an example of a very highly sensitive enzyme to MP (IC₅₀ = 26nM). Some tests were carried out to validate this methodology. The cerebral AChE of these two sources of enzyme was partially purified discarding the supernatant of the homogenate and solubilizing the pellet with Triton X-100 detergent. The AChE activity inhibition in these preparations by excess of the substrate acetylthiocholine, a typical AChE behaviour, proved the homogeneity of this preparation and that it is representative of the real AChE of each animal. Using MP allows checking out the solutions of inhibitor with colorimetric methods in the moment of use. The preparation of soluble AChE eliminates insoluble matters which confound the enzyme quantification. Some characteristics of mathematical calculations of IKC were defined to create a valid model that is able to be used for evolutionary and phylogenetic studies of fish and other animals. The cerebral AChE of all terrestrial animals, whose results are available, is highly sensitive to MP. To compare with a similar recently evolved fish, a sample of baiacu (baiacu-arara, *Lagocephalus laevigatus*) was tested for IKC and the results (IC₅₀ = 2243nM) indicated that evolutionary age of the fish does not correlate with sensitivity to organophosphorus compounds. The most sensitive AChE among the fish tested was a type of catfish (bague-branco, *Genidens barbus*, IC₅₀ = 606nM) and the enzyme of an older evolved fish, a small shark (cação-frango, *Rhizoprionodon porosus*), had an intermediate sensitivity (IC₅₀ = 1280nM). Studies with other species correlated to those being more sensitive to MP have to be made to get adequate answers about the use of IKC for cerebral AChE inhibition by MP as a possible evolutionary and phylogenetic marker.

Keywords: acetylcholinesterase, phylogeny, methyl-paraoxon, biomarker

LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Resultados individuais para as determinações da atividade residual de AChE no cálculo de kapp de 3 exemplares de tainha e de 3 exemplares de galinha	32
Tabela 2 - Constantes Cinéticas de Inibição da AChEsol de tainha e galinha usadas para a validação da metodologia usada nesse trabalho.....	33
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase cerebral dos animais que foram estudados neste trabalho	34
Tabela 4 - Filogenia da sensibilidade ao metil-paraoxon da acetilcolinesterase cerebral de alguns peixes	44
Figura 1 - Curvas de inibição pelo substrato da AChEsol de tainha (A) e de galinha (B). 23	
Figura 2 - Verificação do mecanismo de inibição da AChEsol pelo metil-paraoxon. ...	24
Figura 3 - Gráficos para a determinação das CCI de AChEsol de tainha inibida por MP. 25	
Figura 4 - Gráfico e regressão linear para a determinação das CCI de AChEsol inibida por MP para a espécie <i>Mugil liza</i> com os resultados de 3 exemplares distintos na mesma regressão.	26
Figura 5 - Gráfico e regressão linear para a determinação das CCI de AChEsol inibida por MP para a espécie <i>Mugil liza</i>	27
Figura 6 - Gráficos para a determinação das CCI de AChEsol de galinha inibida por MP..	28
Figura 7 - Gráfico e regressão linear para a determinação das CCI de AChEsol de galinha inibida por MP de 3 exemplares distintos na mesma regressão.	29
Figura 8 - Gráfico e regressão linear para as determinações das CCI das AChEsol inibidas por MP para a espécie de peixe <i>Mugil liza</i> (tainha) e para a galinha comercial com todas as determinações de kapp em uma mesma regressão. ..	30
Figura 9 - Correlação entre a sensibilidade da AChEsol dos animais estudados ao MP (A) e a afinidade da AChEsol pelo substrato acetiltiocolina (B) e a especificidade da AChEsol pelo substrato (P%)	31

ABREVIATURAS

AceScol	Acetiltiltiocolina, iodeto
AChE	Acetilcolinesterase
AChEsol	Acetilcolinesterase cerebral insolúvel solubilizada em detergente
BChE	Butirilcolinesterase
CCI	Constantes cinéticas de inibição
DTNB	Ácido ditionitrobenzeno
EI	Complexo intermediário reversível enzima-inibidor
E_o	Quantidade inicial de enzima
E_r	Quantidade residual de enzima
IC₅₀	Concentração de inibidor que consegue inibir 50% da atividade de um enzima, em condições controladas e após um tempo determinado
k_{app}	Constante aparente de fosforilação
K_d	Constante de equilíbrio entre enzima e inibidor
k_i	Constante biomolecular de reação
K_m	Constante de Michaelis & Menten
k_p	Constante de velocidade de fosforilação
MP	Metil-paraoxon
P%	Porcentagem da atividade enzimática obtida com o substrato propri-oniltiocolina sobre a atividade obtida com acetiltiocolina
PNP	Para-nitrofenol
ProScol	Propioniltiocolina, iodeto
RegLin	Regressão Linear
TNB	Ácido tionitrobenzeno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Monitoramento Ambiental	1
1.2	Biomarcadores	3
1.2.1	Tipos de Biomarcadores	4
1.3	Colinesterases	5
1.3.1	Acetilcolinesterase como biomarcador de exposição e efeito	8
1.4	Inibição de AChE pela ação dos pesticidas organofosforados	8
1.5	Estudos filogenéticos como ferramenta de monitoramento ambiental	10
1.6	Objetivos	11
1.6.1	Objetivo geral	11
1.6.2	Objetivos específicos	11
2	MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1	Material	12
2.1.1	Reagentes	12
2.1.2	Equipamentos	12
2.1.3	Animais	12
2.2	Métodos	17
2.2.1	Preparo da fração enzimática	17
2.2.2	Dosagem de acetilcolinesterase	17
2.2.3	Solução de metil-paraoxon	17
2.2.4	Análises cinéticas	18
3	RESULTADOS	21
4	DISCUSSÃO	35
4.1	Conclusões	45
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Monitoramento Ambiental

Nas últimas décadas, devido ao crescimento populacional, à industrialização, ao desenvolvimento tecnológico e ao uso intensivo de agrotóxicos, os problemas ambientais cresceram de forma contínua.

Nos tempos atuais, é reconhecido que esses fatores modificaram o equilíbrio e a qualidade do meio ambiente. Mas, também não há dúvidas de que tais fatores trouxeram muitos benefícios à humanidade. Como consequência desses problemas gerados pela agressão ao meio ambiente, resulta na necessidade de identificação dos efeitos sobre a saúde, não só humana, mas de todo o ecossistema, tendo em vista que um meio ambiente saudável é sinônimo de qualidade de vida.

Com o passar do tempo, tornou-se perceptível que a detecção precoce de uma exposição a um determinado agente químico pode diminuir de forma expressiva a ocorrência dos efeitos adversos na saúde. Nesse contexto surgiram informações provenientes do monitoramento da exposição ambiental ou ocupacional, possibilitando a implementação de medidas de prevenção e controle apropriados.¹

Atualmente existe uma grande expansão dos estudos de monitoramento ambiental, porém os riscos decorrentes da exposição aos diversos produtos químicos não podem ser categoricamente quantificados devido às dificuldades de identificação e reconhecimento imediato de todos os seus efeitos tóxicos. Entretanto, esses riscos podem ser estimados pela utilização de determinados biomarcadores, ou marcadores biológicos.^{2,3}

Segundo Oost e colaboradores (2003)⁴, os cinco métodos de monitoramento ambiental que devem ser seguidos para avaliar o risco de contaminantes para os organismos e classificar a qualidade ambiental dos ecossistemas são:

1 - Monitoramento químico – Avalia os níveis de contaminantes conhecidos nos compartimentos ambientais;

2 - Monitoramento da bioacumulação – Avalia a exposição medindo os níveis de contaminantes na biota ou determinando a dose crítica no local de interesse (bioacumulação);

3 - Monitoramento do efeito biológico – Avalia a exposição e o efeito determinando as primeiras alterações adversas que são parcial ou totalmente reversíveis (biomarcadores);

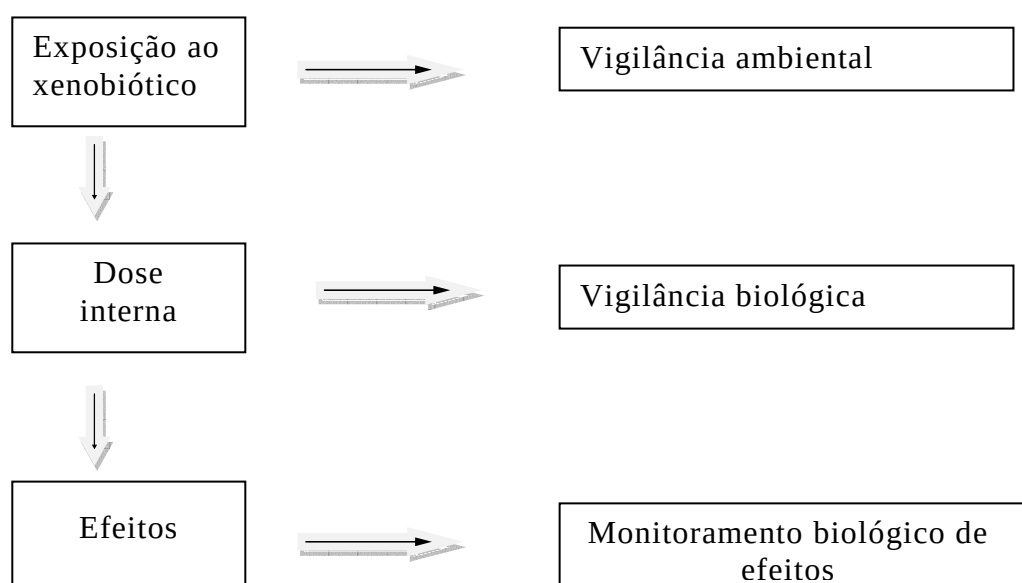
4 - Monitoramento da saúde – Avalia o efeito através do exame da ocorrência de doenças irreversíveis ou danos no tecido dos organismos;

5 - Monitoramento dos ecossistemas – Avalia a integridade de um ecossistema através de um inventário de composição, densidade e diversidade das espécies.

Conforme Piveta e colaboradores (2001)⁵, alguns fatores provocaram o avanço acentuado nas pesquisas de monitoramento, dentre eles: o interesse nas atividades de prevenção, entendida como principal meio para limitar as patologias que estão correlacionadas ao ambiente; a demonstrada associação entre alguns parâmetros biológicos e as alterações do estado de saúde e o extraordinário desenvolvimento de técnicas analíticas, que permitiram individualizar e quantificar parâmetros biotóxicológicos até a pouco tempo impossíveis de se determinar.

O Monitoramento Ambiental avalia a exposição pela medida da concentração do agente químico em amostras ambientais; já o Monitoramento Biológico avalia a exposição através de parâmetros biológicos, denominados indicadores biológicos ou biomarcadores.¹

A seguir, um esquema que resume os principais conceitos do Monitoramento Ambiental e Biológico, adaptado de Oga (2003)⁶:



1.2 Biomarcadores

Em decorrência dos efeitos causados ao ambiente e, conseqüentemente, à saúde humana, existe uma necessidade de controlar a emissão de poluentes que prejudicam as águas naturais, que são de extrema importância para os ecossistemas, para o consumo humano e para as práticas agrícolas. Com isso, para monitorar um ambiente, faz-se necessária a utilização de marcadores apropriados para detectar e também localizar essas fontes de poluição.⁷

Presentemente, têm sido identificados biomarcadores que traduzem uma resposta biológica, desde os níveis molecular, celular e fisiológico, até o comportamental, relacionado com a exposição a efeitos tóxicos de produtos químicos liberados no ambiente.⁸

Existe atualmente uma ampla discussão diante da definição de bioindicadores e biomarcadores. Usualmente ocorre uma unificação a partir do termo indicador, o qual designa um parâmetro que pode indicar a ocorrência de um evento em um sistema ou em uma amostra biológica.⁶

Bioindicador é descrito na literatura de diversas formas, sendo seu conceito resumido como: organismos ou comunidades cuja presença, comportamento ou estado fisiológico respondem de forma correlacionada à poluição ambiental no meio em que cresceram e se desenvolveram.

Biomarcadores são originalmente definidos⁹ como alterações bioquímicas, histológicas ou fisiológicas ou manifestações de estresse ambiental. Biomarcador é toda substância ou seu produto de biotransformação, ou qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde.¹

Segundo Cairns Jr. e colaboradores (*apud* Baptista, 2003)¹⁰, tudo é indicador de alguma coisa, mas nada é indicador de tudo. A questão da escolha do organismo teste depende do que se quer responder.

A intensa utilização de biomarcadores está correlacionada com o grande impacto ambiental provocado por tóxicos cada vez mais lançados no meio sem um tratamento ou cuidado prévio. De acordo com Sarkar e colaboradores (2006)¹¹, existem vários significados para o uso de biomarcadores: identificar a interação que ocorre entre o contaminante e o organismo; revelar a presença de agentes contaminantes conhecidos e desconhecidos; fornecer a temporalidade e a espacialida-

de integrada a biodisponibilidade dos poluentes; a capacidade de antecipar as mudanças que ocorrem no ecossistema e o impacto da poluição; prever o caminho acerca das estratégias de biorremediação antes de danos ambientais irreversíveis, dentre outros significados.

1.2.1 Tipos de Biomarcadores

A Organização Mundial da Saúde definiu “biomarcador” como qualquer medida que expresse a interação entre um sistema biológico e um agente ambiental, que pode ser químico, físico ou biológico.¹² De acordo com a OMS, três classes de biomarcadores são identificadas:

- 1 - Biomarcador de exposição:** uma substância exógena ou seu metabólito, ou o produto da interação entre o agente xenobiótico e algum alvo molecular ou célula, que é mensurada em um compartimento dentro do organismo;
- 2 - Biomarcador de efeito:** mensuração bioquímica, fisiológica, comportamental ou outra interação dentro do organismo que, dependendo da magnitude, pode ser relacionada com os danos à saúde do organismo ou com o estabelecimento de doenças;
- 3 - Biomarcador de susceptibilidade:** indica a capacidade de resposta, inerente ou adquirida, de um organismo quando exposto a um xenobiótico específico.

Análise de substâncias químicas em tecidos e fluidos sanguíneos, metabólitos tóxicos, atividades enzimáticas e outras variabilidades bioquímicas têm sido freqüentemente utilizadas em documentação da interação de toxinas com sistemas biológicos.¹³

A utilização de peixes como modelo biológico tem como objetivo identificar as potenciais interações químicas dos xenobióticos ao nível do homem, com isso, o estudo do metabolismo desse tipo de composto nos peixes permite compreender a toxicidade química nos diferentes níveis de organização biológica, tanto ao nível individual como da população ou da comunidade.⁸

A utilização de biomarcadores em peixes, segundo Oost (2003)⁴, pode ser instrumento de estimável utilidade em algumas etapas no processo de avaliação do risco ambiental, sendo estas:

- 1 - Na avaliação de efeitos, exposição e danos;
-

2 - Na caracterização ou classificação dos riscos;

3 - No monitoramento da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos.

De acordo com Epifanio (*apud* Fontaínhas-Ferandes,2005)⁸, estudos realizados em condições laboratoriais sugerem que os peixes acumulam níveis superiores de organoclorados provenientes da água em relação a organismos presentes no alimento. Entretanto, ainda são necessários estudos que possam selecionar e validar biomarcadores adequados, de acordo com as espécies a serem utilizadas como indicadoras das condições de um corpo hídrico.¹⁴ Muitos estudos vêm sendo realizados utilizando a inibição da enzima acetilcolinesterase como biomarcador de exposição aos organofosforados.

A acetilcolinesterase, em peixes dulcícolas, está muito bem estabelecida como biomarcador de exposição aos organofosforados, contudo poucos estudos estão disponíveis para espécies marinhas.^{15,16}

1.3 Colinesterases

Um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo é a acetilcolina (ACh). Esse mediador químico é necessário para a transmissão do impulso nervoso em todas as fibras pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo, em todas as fibras parassimpáticas pós-ganglionares e em algumas simpáticas pós-ganglionares. Para que ocorra a transmissão do impulso nervoso, a acetilcolina deve ser liberada no espaço intersináptico ou entre a fibra nervosa e a célula efetora. A partir daí, a acetilcolina se liga a um receptor colinérgico, gerando um potencial pós-sináptico e a propagação do impulso nervoso. A ACh é imediatamente liberada e hidrolisada pela acetilcolinesterase.^{6,17}

Colinesterases são enzimas que hidrolisam ésteres de colina com alta velocidade, velocidade essa maior do que a obtida com qualquer outro substrato. Em geral os vertebrados possuem duas colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE, EC. 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE, EC.3.1.1.8). A diferença entre essas duas enzimas é baseada na especificidade por substratos e na sensibilidade a inibidores específicos.¹⁸ A AChE apresenta uma maior afinidade pelo substrato acetilcolina do que por qualquer outro éster de colina, enquanto a BChE possui uma maior afinidade por substratos mais hidrofóbicos, tais como a butirilcolina.

Tanto a AChE como a BChE são serina-hidrolases e seus centros catalíticos contêm uma tríade catalítica formada pelos resíduos dos aminoácidos serina, histidina e ácido glutâmico. Na AChE, o centro catalítico é constituído por um sítio aniônico (resíduo de glutamato), que interage com o nitrogênio quaternário da acetilcolina, e um sítio esterásico (histidina e serina). O grupo acetil do substrato é transferido para o grupo hidroxila da serina, formando transitoriamente uma molécula de enzima acetilada e liberando uma molécula de colina. Em seguida ocorre a hidrólise da ligação éster que une o radical acetil à serina, recuperando-se o sítio catalítico da enzima.¹⁴

AChE está envolvida na desativação da acetilcolina na fenda sináptica, prevenindo o estímulo contínuo do neurônio, o que é vital para o funcionamento normal do sistema sensorial e motor.¹⁹ A acetilcolinesterase é uma carboxil-esterase do Tipo B que hidrolisa rapidamente o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas, assim como nas junções neuromusculares.²⁰

A maioria das formas moleculares de AChE são estruturas complexas, que incluem subunidades estruturais, garantindo a fixação da enzima na membrana plasmática ou na matriz extracelular. Esta imobilização, justaposta no local onde suas ações são necessárias, como sinapses e placas motoras, também contribui para a eficácia na eliminação dos estímulos, garantindo o fluxo de informação ou o relaxamento muscular.¹⁸

As formas moleculares das colinesterases são semelhantes em suas propriedades catalíticas, mas diferem nos parâmetros hidrodinâmicos e nas suas interações iônicas ou hidrofóbicas. Formas assimétricas (A) e globulares (G) das colinesterases são distinguidas pela análise das suas estruturas quaternárias.^{14,21} O Quadro 1, a seguir, apresenta as características principais das formas moleculares das colinesterases.

Formas assimétricas de AChE e BChE existem em todas as classes de vertebrados e, aparentemente, não estão presentes em invertebrados. Essas formas assimétricas interagem com poliânions, como glicosaminoglicanas, amplamente distribuídas na matriz extracelular. Logo, essas interações são responsáveis pela fixação dessas enzimas nas lâminas basais neuromusculares. Sendo assim, para uma eficiente extração dessas enzimas do músculo, faz-se necessário o uso de soluções tampão de alta força iônica (obtido através de 0,4 a 1,0M de NaCl), e a so-

lubilização das formas assimétricas ocorre através da interação das cargas dos sais com as das glicosaminoglicanas, liberando as moléculas enzimáticas dos tecidos musculares.¹⁴

Forma Molecular	Coeficiente de sedimentação na presença de Triton X-100 (sem detergente)	Subunidades estruturais	Características em solução	Natureza da subunidade catalítica
A ₁₂	16-20S (não muda)	cauda tipo colágeno (subunidade Q)	não-anfifílica, solúvel em alta força iônica + EDTA	Tipo T
A ₈	14-15S (não muda)		sensível à collagenase	
A ₄	8-9S (não muda)			
G ₄ ^{na}	10-11S (não muda)	Nenhuma	não anfifílica, totalmente solúvel	Tipo T
G ₄ ^a	9-10S (10-11S, agrega)	cauda hidrofóbica (subunidade P)	anfifílica, solúvel em detergentes	Tipo T
G ₂ ^a Tipo I	6S (8S, agrega)	Nenhuma	anfifílica, ligada a glicolipídeos, parcialmente solúvel sem detergentes formando agregados	Tipo H
G ₂ ^a Tipo II	6S (7S)	nenhuma? Palmitoil?	anfifílica mas facilmente solubilizada, não agrega na ausência de detergentes	Tipo T
G ₁ ^a Tipo II	4S (5S, agrega)	nenhuma? Palmitoil?	anfifílica mas facilmente solubilizada mesmo na ausência de detergentes	Tipo T

Quadro 1 - Formas moleculares de colinesterases Adaptado de Massoulié *et al.* (1982).²¹

As formas globulares do tipo G, contudo, são mais distribuídas nos diversos tecidos onde são encontradas colinesterases e estão presentes em vertebrados e invertebrados. Podem se apresentar solúveis, ancoradas à membrana por peptídeos hidrofóbicos (subunidade P), ou ligadas covalentemente a resíduos de fosfatidilinositol. A forma G4a, ancorada à membrana pela subunidade P, é predominante nas sinapses do sistema nervoso, em especial no cérebro.^{14,18}

1.3.1 *Acetilcolinesterase como biomarcador de exposição e efeito*

A inibição da enzima acetilcolinesterase é muito utilizada para avaliar a contaminação por organofosforados e carbamatos. Análises químicas com a atividade da enzima AChE têm sido muito aplicadas em programas de monitoramento ambiental, devido ao fato de que a inibição da AChE em tecidos de peixes e outros animais pode ser uma ferramenta utilizada como biomarcador de exposição aos organofosforados e carbamatos.¹⁶

O monitoramento da atividade da AChE em populações silvestres tem sido proposto como método geral para detectar contaminação ambiental por organofosforados e carbamatos, uma vez que muitas desses compostos químicos possuem uma meia-vida relativamente curta em ambientes aquáticos e são pouco solúveis em água.²²

A quantidade constitutiva de acetilcolinesterase cerebral em diferentes espécies de peixes também é um fator importante no que se refere à escolha de uma espécie sentinela para o monitoramento do impacto ambiental. O uso correto de biomarcadores enzimáticos requer um conhecimento fundamental da sua bioquímica nas espécies a serem utilizadas.^{16,23}

1.4 *Inibição de AChE pela ação dos pesticidas organofosforados*

Os agrotóxicos são muito utilizados na agricultura para controlar pragas como insetos e outras espécies que danificam o cultivo, porém, ao serem aplicados podem, eventualmente, contaminar outras matrizes ambientais. Com o processo da lixiviação são carregados para os rios e mares causando um maior impacto ambiental. Conseqüentemente, eles se tornam tóxicos não só para as espécies-alvo mas também para muitas espécies não-alvo.

Os organofosforados foram desenvolvidos como agrotóxicos com o propósito de serem menos persistentes no meio ambiente, evitando o acúmulo na cadeia alimentar, diferenciando-se assim dos organoclorados que são altamente persistentes. Os organofosforados contêm um átomo central de fósforo pentavalente ao qual está ligado um átomo de oxigênio ou enxofre mediante dupla ligação. O efeito tóxico é mais agudo para os seres humanos e outros mamíferos do que os pesticidas organoclorados.^{18,24}

A ação dos organofosforados está diretamente ligada ao sistema nervoso central pela inibição das enzimas colinesterases. Os sinais são transmitidos dentro dos neurônios por impulsos elétricos mediante íons de sódio de carga positiva. Ao chegarem aos nós sinápticos, os impulsos elétricos excitam as vesículas que repassam os sinais por mensageiros químicos para as células seguintes. Um desses mensageiros químicos é a acetilcolina, que transmite sinais entre células nervosas. Logo após o sinal químico ser transmitido, a acetilcolina é removida das sinapses pela enzima acetilcolinesterase, deixando-a pronta para um novo sinal.²⁴

Muitos desses inseticidas são fosforotionatos e, dentro dessa classe, vários exibem toxicidade diferente entre roedores e peixes.²⁵ Abbas e colaboradores (1996)²⁶ demonstraram que os peixes são mais resistentes ao paration e ao paraoxon do alguns mamíferos. As diferenças de toxicidade interespecíficas tem sido bastante investigadas, especialmente pelos aspectos bioquímicos dessas diferenças.^{27,28,29}

Todos os organofosforados terminam formando uma alquil-fosfo-enzima inativa, mas existem diferenças na cinética de cada uma destas etapas. De maneira geral, existem pelo menos duas hipóteses:¹⁸

- 1 - Todo contato entre a enzima e o inibidor resulta na formação de uma enzima inativa de forma irreversível e
- 2 - Enzima e inibidor formam um complexo intermediário reversível (EI), que em seguida é fosforilado por meio de uma reação irreversível.

Aldridge (1950)³⁰ demonstrou que a reação de inibição da AChE por um organofosforado segue uma cinética aparentemente biomolecular, governada por uma constante k_i , que inclui um termo referente a uma equação reversível, governada por uma constante de equilíbrio (K_d) e um termo referente à reação de fosforilação propriamente dita, governado por uma constante de velocidade (k_p). Main (1964)³¹ define k_i como uma “constante bimolecular de reação”, incorporando os termos de ambas as reações. A inibição da AChE pelo organofosforado metilparaoxon é um exemplo desse mecanismo. Inicialmente ocorre um passo reversível entre a enzima e o inibidor, formando um intermediário não-covalente, seguido por um passo irreversível, que transforma esse intermediário em um complexo inativo.³²

1.5 Estudos filogenéticos como ferramenta de monitoramento ambiental

Filogenética é o campo da Biologia que busca identificar e compreender as relações evolutivas entre as diferentes formas de vida na Terra. O termo “filogênese”, do grego transliterado *phylon* (significando “grupo”), e *gênesis* (significando “origem”), foi criado pelo naturalista alemão Ernst Heinrich Haeckel (1834-1919), fervoroso discípulo de Darwin, para designar as relações de origem e parentesco entre os seres atuais e seus ancestrais.³³

Filogenético significa o grupo irreduzível de organismos que pode ser distinguido de outros grupos e dentro do qual existe um padrão de parentesco do tipo ancestral e descendente. Os primeiros seres vivos eram organismos unicelulares que migraram para meio marinho, pois encontraram condições mais estáveis para a sua evolução, originando, com isso, os peixes primitivos.³⁴ Atualmente estima-se que a origem de todos os animais se deu no mar.

Segundo estudos existentes, algumas espécies de peixes apresentam diferenças significativas quanto à sensibilidade da acetilcolinesterase cerebral ao metil-paraoxon.³² Essa variação de sensibilidade pode estar relacionada a um possível critério evolutivo, podendo ser considerada de grande importância na escolha de espécies sentinelas em estudos de impacto ambiental.

A análise da evolução filogenética do sistema nervoso auxilia a compreensão da morfologia, da interação das estruturas nervosas e dos possíveis comportamentos dos animais. A principal função do sistema nervoso, desde os seres mais primitivos até os mais atuais, é propiciar a adaptação ao meio ambiente, sendo necessárias algumas propriedades importantes como: irritabilidade, condutibilidade e contratilidade.³⁴

Com isso, ao estudarmos a relação filogenética da sensibilidade da acetilcolinesterase cerebral de peixes, será possível avaliar impactos ambientais de inibidores de colinesterases tendo por base a sensibilidade típica de cada espécie, utilizando-se como critério a idade evolutiva e a filogenia das espécies de peixes presentes em um determinado ambiente. Dessa forma, estudos de filogenia da sensibilidade a xenobióticos podem ser usados em modelagem numérica que permita prever impactos sem a necessidade de determinar a sensibilidade em cada espécie individualmente.

1.6 Objetivos

1.6.1 *Objetivo geral*

Avaliar se as diferenças de sensibilidade da acetilcolinesterase (AChE) de cérebro de peixe aos compostos organofosforados é um marco filogenético.

1.6.2 *Objetivos específicos*

- 1** - Validar uma metodologia para a determinação das Constantes Cinéticas de Inibição (CCI) da AChE de cérebro pelo composto organofosforado metil-paraoxon (MP), tomado como um exemplo, para estudos filogenéticos em peixes;
 - 2** - Selecionar e coletar um grupo de espécies de peixes com as maiores informações possíveis sobre suas relações filogenéticas e sua idade evolutiva e determinar as CCI destas fontes de AChE pelo MP e
 - 3** - Correlacionar as distâncias filogenéticas e evolutivas destas espécies com a sensibilidade da AChE cerebral ao metil-paraoxon.
-

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Reagentes

Metil-paraoxon grau analítico (artigo 45606, lote 61940) e Triton X-100 foram adquiridos de Riedel de Haën AG (Hannover). Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), iodeto de acetiltiocolina(ASCho), iodeto de propioniltiocolina (PSCho), foram adquiridos de Sigma Chemical Co. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.1.2 Equipamentos

Homogeneizador (Marca ULTRATURRAX modelo IKAT18); Centrífuga refrigerada (Marca HITACHI, modelo HIMAC CR 21E Rotor 26); Espectrofotômetro (Marca Shimadzu modelo UV-VIS 160A).

2.1.3 Animais

Os peixes utilizados no presente estudo foram selecionados de acordo com informações sobre o posicionamento na escala evolutiva, ou seja, espécies menos recentes, intermediárias e mais recentes na evolução. Também foi utilizado como critério na seleção das espécies que todas pudessem ser obtidas através de pesca esportiva ou comercial. Todos os pescados foram doados por pescadores artesanais da praia de Itaipuaçu, Marica, RJ, exceto a tainha (*Mugil liza*), que foi capturada nas Lagoas de Araruama e de Saquarema como parte de outros trabalhos realizados no laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ e gentilmente cedidos pelo Dr Jayme da Cunha Bastos. Os exemplares de cérebro de galinha foram cedidos por um abatedouro comercial localizado na cidade de Niterói RJ. A preparação enzimática de cérebro de rato foi gentilmente cedida pelo Dr. Mauro Velho de Castro Faria, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Foram utilizadas, no mínimo, três exemplares de cada espécie, preparando-se uma preparação enzimática para cada exemplar. A escolha das espécies e a classificação taxonômica foram feitas de acordo com as orientações do Dr. Gustavo Wilson Numan, do Museu Nacional - UFRJ. A taxonomia foi confirmada pelas indicações de Nelson, J.S. (2006).³⁵ A distribuição e característica de cada espécie foram coletadas na literatura. A seguir estão descritas as espécies de peixes estudadas, na ordem da mais antiga para a mais recente , e fotos de exemplares típicos utilizados neste trabalho.

Nome comum: **Cação- frango**

Classe: Elasmobranchii

Ordem: Carcharhiniformes

Família: Carcharhinidae

Espécie: ***Rhizoprionodon porosus*** (Poey, 1861)

Distribuição: costa brasileira, do Amapá ao Rio Grande do Sul.

Características: Espécie costeira; que habita as águas rasas do litoral brasileiro e ao redor das ilhas. São mais comuns nos meses quentes. São relativamente robustos com focinho arredondados. Atingem um pouco mais de um metro de comprimento e 4.5kg de peso corporal. Alimentam-se principalmente de camarões e lulas. São capturados com linhas de fundo, espinhéis e rede de espera.³⁷

A seguir, fotos de um exemplar típico usado no presente trabalho.



Nome comum: **Bagre-branco**

Classe: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Ariidae

Espécie: *Genidens barbus* (Lacepède, 1803)

Distribuição: sudeste e Sul do Brasil.

Características: São animais de grande porte, podendo atingir 1.200mm de comprimento. A maioria das espécies ocorre em áreas costeiras rasas e em estuários. Espécies exclusivamente marinhas podem ser encontradas em profundidades superiores a 100 m, enquanto outras ocorrem somente em água doce. Característico dos bagres marinhos é o hábito apresentado pelos machos de incubar os ovos, que são carregados na cavidade bucal até o final de seu desenvolvimento.^{38,39}

A seguir, fotos de um exemplar típico usado no presente trabalho.



Nome comum: Tainha

Classe: Actinopterygii

Ordem: Mugiliformes

Família: Mugilidae

Espécie: ***Mugil liza*** (Valenciennes, 1836)

Distribuição: ocorre por todo o litoral brasileiro.

Características: São encontrados, normalmente, de pequenos a grandes cardumes nadando nas águas relativamente calmas. São espécies pelágicas costeiras de águas rasas, nadam perto da superfície nas áreas com fundo de areia e/ ou lama. São muito comuns nas praias, estuários, mangues e lagoas salobras. Migram em grandes cardumes na época de reprodução e desovam no mar. Alimentam-se de algas, microorganismos e detritos encontrados no lodo e na areia, que engolem juntos.⁴⁰

A foto a seguir é de um exemplar típico¹ que muito se aproxima aos exemplares utilizados nesse trabalho.



¹ <http://www.barcodinglife.org/views/taxbrowser.php?taxon=Mugil+liza>, consultado dia 2 de março de 2009, 14:53.

Nome comum: **Baiacu- arara**

Classe: Actinopterygii

Ordem: Tetraodontiformes

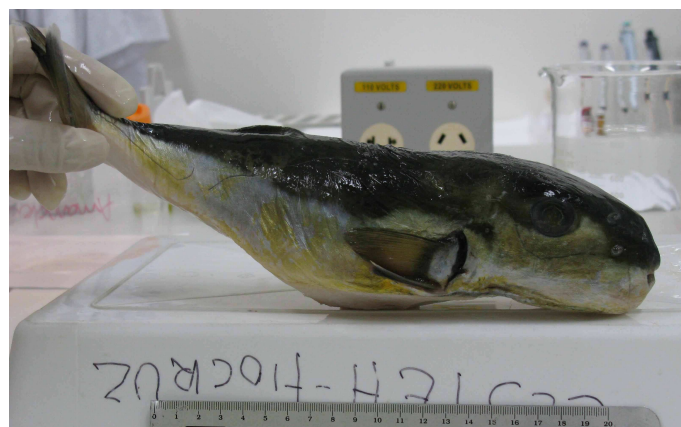
Família: Tetraodontidae

Espécie: *Lagocephalus laevigatus* (Linnaeus, 1766)

Distribuição: ocorre em todo litoral brasileiro.

Características: São encontrados solitários ou em pequenas agregações. Nadam próximo do fundo por entre as tocas e rachas. São bentopelágicos demersais costeiros de águas relativamente rasas (até 60 metros), vivem sobre os fundos arenosos e/ ou lamacentos. Costumam nadar lentamente, através da oscilação de suas nadadeiras dorsal, anal e peitoral. Só utilizam a caudal para atacar suas presas ou fugir dos predadores. Possuem a capacidade de se auto inflarem, enchendo o abdome de água ou ar, como mecanismo de defesa. Alimentam-se de peixes, crustáceos e moluscos.⁴⁰

A seguir, fotos de um exemplar típico usado no presente trabalho



2.2 Métodos

2.2.1 *Preparo da fração enzimática*

A fração enzimática rica em acetilcolinesterase foi preparada de acordo com Cunha Bastos e colaboradores.⁴¹ Os cérebros, de todos os animais, foram removidos, lavados com solução salina, secados com papel e congelados a -20°C. Para a preparação da AChE, cada cérebro foi descongelado, suspenso com tampão fosfato (10ml fosfato de sódio 0,1M pH 7,5 para cada 1g de tecido cerebral) e homogeneizado em um aparelho Ultraturrax. Cada homogeneizado foi centrifugado (5.000g/30min/5°C) e as frações solúveis resultantes foram descartadas. Os sedimentos foram ressuspensos no mesmo volume de solução 0,1g% de Triton X-100 no mesmo tampão de homogeneização e re-homogeneizado como descrito acima. Depois de uma segunda centrifugação (15.000g/90min/5°C) o sobrenadante, composto de uma fração rica em AChE insolúvel dissolvida em detergente, daqui em diante denominado AChEsol, foi coletado e congelado a -20°C.

2.2.2 *Dosagem de acetilcolinesterase*

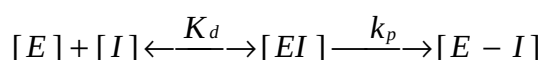
A atividade de acetilcolinesterase foi determinada espectrofotometricamente em fosfato de sódio 0,1M pH 7,5 contendo 0,1g% de Triton X-100 por uma modificação do método Ellman⁴² usando 0,32mM de DTNB e 1,875mM de substrato (acetil ou propioniltiocolina iodeto). A atividade da enzima foi registrada a 412nm por 1,5min a 25-28°C. Os controles foram ajustados para leitura em torno de 0,1 unidades de absorvância por minuto²⁹, utilizando $14.150\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ como Absortividade Específica⁴³ para a quantificação do ácido tionitrobenzeno (TNB) formado. Todas as determinações foram realizadas com apenas 1ml de volume final.

2.2.3 *Solução de metil-paraoxon*

A solução do metil-paraoxon (MP) foi preparada em metanol e aferida pela medida do para-nitrofenol (PNP) produzido por hidrólise alcalina utilizando a Absortividade Específica de $18.600\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 401nm.⁴³ A quantidade de PNP residual na solução do pesticida foi calculada pela intersecção do eixo Y da regressão linear para um plot da absorvância versus o tempo de reação para os primeiros 20 segundos da hidrólise alcalina. Para preparar diluições exatas de MP, essa análise foi executada antes do uso, a partir de uma solução estoque de concentração aproximada. O PNP residual nunca foi maior que 15%.

2.2.4 Análises cinéticas

A constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) foi avaliada pelo plot duplo recíproco da velocidade inicial versus a concentração da acetiltiocolina.⁴⁴ As Constantes Cinéticas de Inibição (CCI) foram obtidas de acordo com as equações propostas por Kitz & Wilson (1962)⁴⁵ e os métodos descritos por Kemp & Wallace (1990)²⁹ e Carr & Chambers (1996)²⁵. Esse processo requer que: (a) a enzima não seja inibida na presença de MP e acetiltiocolina 1,875mM; (b) as mais baixas concentrações de MP precisam ser muito mais altas que a concentração de enzima. A ausência da inibição da AChE na presença do substrato satisfaz o primeiro requisito. A linearidade da regressão entre $\ln(E_r/E_o)$, sendo E_r a quantidade de enzima residual depois do tempo de exposição ao inibidor e E_o a quantidade inicial de enzima, versus o tempo de incubação, o qual indica uma reação de primeira ordem entre a enzima e o inibidor, satisfaz o segundo requisito. A equação que descreve esse mecanismo de inibição, chamado de inibição progressivamente irreversível, com a formação de um complexo intermediário reversível entre E e I (EI), é (Main, 1964):



Se $[I]$ for substancialmente maior que $[E]$, $[I]$ permanece constante durante todo o curso da reação de inibição. Desse modo, a reação entre E e I segue uma cinética de primeira ordem para uma grande faixa de concentração de inibidor. Se E_r é a atividade residual depois da inibição e E_o é a atividade inicial de AChE, a equação resolvida pode ser escrita como⁴⁵:

$$\ln \frac{[E_r]}{[E_o]} = \frac{k_p \cdot t}{1 + K_d/[I]} \quad [1]$$

Uma constante aparente de fosforilação (k_{app}) pode ser calculada dividindo a Eq.1 em duas novas equações que expressam o cálculo dessa nova constante:

$$k_{app} = \ln \frac{[E_r]}{[E_o]} / t \quad [2]$$

$$k_{app} = \frac{k_p}{1 + K_d/[I]} \quad [3]$$

Com a equação 2, que expressa uma reta, a inclinação da regressão de $\ln[Er]/[E_0]$ sobre o tempo de incubação conduz a um k_{app} para cada concentração de I (Eq.4). A equação Eq.3 pode ser transformada na equação de uma reta com os recíprocos e permitir o cálculo de todas as CCI (Eq.5)

$$\ln \frac{[E_r]}{[E_0]} = k_{app} \cdot t \quad [4]$$

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1}{k_p} + \frac{K_d}{k_p} \cdot \frac{1}{[I]} \quad [5]$$

Duas regressões lineares (Eq.4, determinação de k_{app} ou plot e Eq.5, determinação das CCI, ou replot) permitem calcular todas as constantes cinéticas. Essa metodologia, para 1ml de volume final, pode ser: 0,05ml de solução de MP em metanol é misturado com 450mL de solução de AChEsol contendo de 5 a 6 mU em tampão fosfato de sódio pH 7,5 contendo 0,1g% de Triton X-100 (uma unidade internacional de AChE (U) é a quantidade de enzima que forma um micromolar de produto por minuto). Essa mistura foi incubada em cinco tempos diferentes: 1, 2, 3, 4 e 5min. A reação de inibição foi paralisada depois de cada tempo pela adição de 0,5ml de uma solução contendo 0,64mM de DTNB e 3,75 mM de acetiltiocolina (uma concentração 2X a normal) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,5 contendo 0,1g% de Triton X-100. Essa solução 2X necessita ser feita no momento do uso. Depois da paralisação da inibição, a atividade de enzima residual $[Er]$ foi determinada. A atividade inicial $[E_0]$ foi medida adicionando-se o pesticida depois do substrato. Essas regressões (plot inicial) foram repetidas para várias concentrações de MP que levem a uma inibição enzimática de 10 a 90%.^{45,31} Outra regressão linear (replot) foi executada com o inverso do k_{app} e o inverso da respectiva concentração do inibidor (Eq.5). As constantes de inibição podem ser calculadas da seguinte forma:

$$k_i = 1/\text{inclinação} \quad [6]$$

$$K_d = -1/\text{intersecção de X} \quad [7]$$

$$k_p = 1/\text{intersecção de Y.} \quad [8]$$

A quantidade inicial da enzima foi ajustada para produzir um controle com uma atividade de 0,1 Unidades de Absorvância a 412nm por minuto, ou de 5 a 6mU de AChE para 1ml de volume final.²⁹ O coeficiente de regressão (r^2) foi usado para expressar a dispersão dos dados ao redor da regressão. A linearidade da regressão para determinar kapp garante que as constantes calculadas não dependem da quantidade de inibidor, mesmo com enzimas muito sensíveis.⁴⁶ A regressão linear de $\ln([Er]/[Eo])$ versus o tempo (plot) somente foi considerada quando o r^2 foi maior que 0,95 e a regressão linear do duplo recíproco (replot) somente foi considerada quando o r^2 foi maior que 0,90. Os cálculos para determinação das CCI foram executados com o programa Excel (Microsoft Inc.). O IC50 foi calculado para cada espécie para 30 minutos de incubação utilizando-se a seguinte equação²⁸:

$$IC_{50} - 30min = \frac{-\ln(0.5)}{(k_i * 30)} \quad [9]$$

3 RESULTADOS

A homogeneidade da preparação de AChE cerebral solubilizada com o detergente Triton X-100 foi testada através da curva de inibição por excesso de substrato (Figura 1). Essa fonte de enzima semi-purificada (AChEsol) reagiu de forma semelhante a uma preparação totalmente purificada, como demonstram os resultados da Figura 1. O ajuste das curvas de substrato pela equação proposta por Radic e colaboradores (1993)⁴⁷, para a enzima de tainha e de galinha, que possuem sensibilidade ao MP bem diferentes, é uma demonstração do grau de homogeneidade dessa preparação.

Com o objetivo de usar as equações para o cálculo das Constantes Cinéticas de Inibição (CCI), dentro do modelo de inibição progressivamente irreversível (Main, 1964), o inibidor precisa ter um comportamento totalmente competitivo com o substrato. Para testar esse modelo, as duas preparações adotadas como modelo para a validação dessa metodologia, de tainha e galinha, foram inibidas por MP em condições controladas para verificar se o mecanismo de inibição envolvido é competitivo. Amostras das duas enzimas, com a mesma atividade, e uma solução de MP com a concentração necessária para obter 80% de inibição em dois minutos de incubação, foram preparadas. O teste foi realizado durante 3 minutos, conforme está descrito na Figura 2: (a) nos primeiros 60 segundos a atividade da enzima na ausência de inibidor foi acompanhada; (b) nesse momento foi adicionada a solução de MP (linhas quebradas na Figura 2); (c) a atividade da enzima foi então registrada até 180 segundos. Os resultados demonstram que a inibição de AChEsol por MP segue um mecanismo competitivo.

O cérebro do peixe tainha, exemplo de AChE menos sensível ao MP, e da galinha comercial, exemplo de animal com a AChE mais sensível a esse inibidor, foram utilizados como modelos para a avaliação de algumas variáveis: (a) garantia de que as CCI são resultado direto do genoma e não estão sujeitas a variações entre animais de uma mesma espécie; (b) reprodutibilidade da metodologia para uso por vários laboratórios; (c) garantia de que as CCI podem ser avaliadas em AChEs com qualquer sensibilidade ao MP. Os resultados estão descritos nas Figuras 3 a 7 e nas Tabelas 1 e 2 e permitem garantir as 3 variáveis mencionadas anteriormente.

Nas demais espécies estudadas foram utilizadas, no mínimo, três exemplares. Cada uma dessas três amostras foi tratada com pelo três concentrações de MP. Essas concentrações foram testadas para garantir inibição entre 10 e 90% e um

Coeficiente de Regressão (r^2) de no mínimo 0,95 para a determinação de kapp (plot). Em seguida, todos os resultados de kapp foram colocados em uma mesma regressão linear, com um r^2 de no mínimo 0,90, para o cálculo final das CCI (replot) para cada espécie, como pode ser visto nas Figuras 4 e 6 para tainha e galinha, respectivamente. As demais espécies testadas foram tratadas da mesma maneira e o resultado final está descrito na Tabela 3.

Os resultados descritos anteriormente permitem concluir que a metodologia seguida para a determinação das CCI para a inibição de AChEsol por MP tem todas as características necessárias para ser usada como um critério filogenético. Mas, o mesmo não é possível dizer em relação aos estudos evolutivos. As espécies de peixes escolhidas buscavam testar se a espécie mais recente na evolução possui maior sensibilidade ao MP, já que todos os animais terrestres têm uma AChE mais sensível ao MP do que a de peixes. No entanto, o baiacu-arara, escolhido como um representante de uma espécie recente na evolução, mostrou-se quase tão resistente como a tainha, com IC50-30min de 2118 e 2243nM, respectivamente. Uma amostra de cação-frango foi testada como exemplo de uma AChE mais antiga na evolução, com um resultado intermediário (IC50 = 1280nM). Na busca de uma espécie mais sensível, seguindo as indicações da literatura^{32,16}, foi testada uma espécie de bagre, já que esse gênero foi indicado como sendo mais sensível, o que foi confirmado (IC50 = 606nM). Desta forma, os resultados indicaram uma possível relação filogenética da sensibilidade da AChE cerebral ao MP mas a relação com a idade evolutiva ainda precisa ser mais bem estudada.

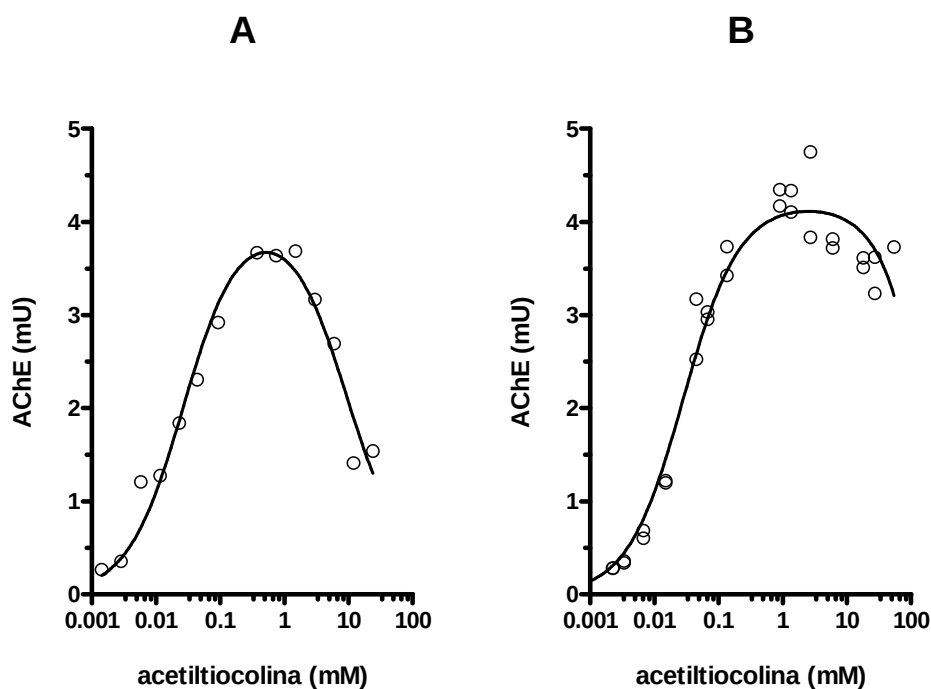


Figura 1 - Curvas de inibição pelo substrato da AChEsol de tainha (A) e de galinha (B).

Cada ponto representa uma determinação da atividade da enzima em um pool de AChEsol de pelo menos 3 indivíduos de cada espécie e a linha representa a curva ajustada (GraphPad 5.0, Prism) segundo a equação proposta por Radic e colaboradores (1993)⁴⁷ para a inibição de AChE por excesso de substrato; $r^2 = 0,9618$ para a enzima de tainha; $r^2 = 0,9699$ para a enzima de galinha.

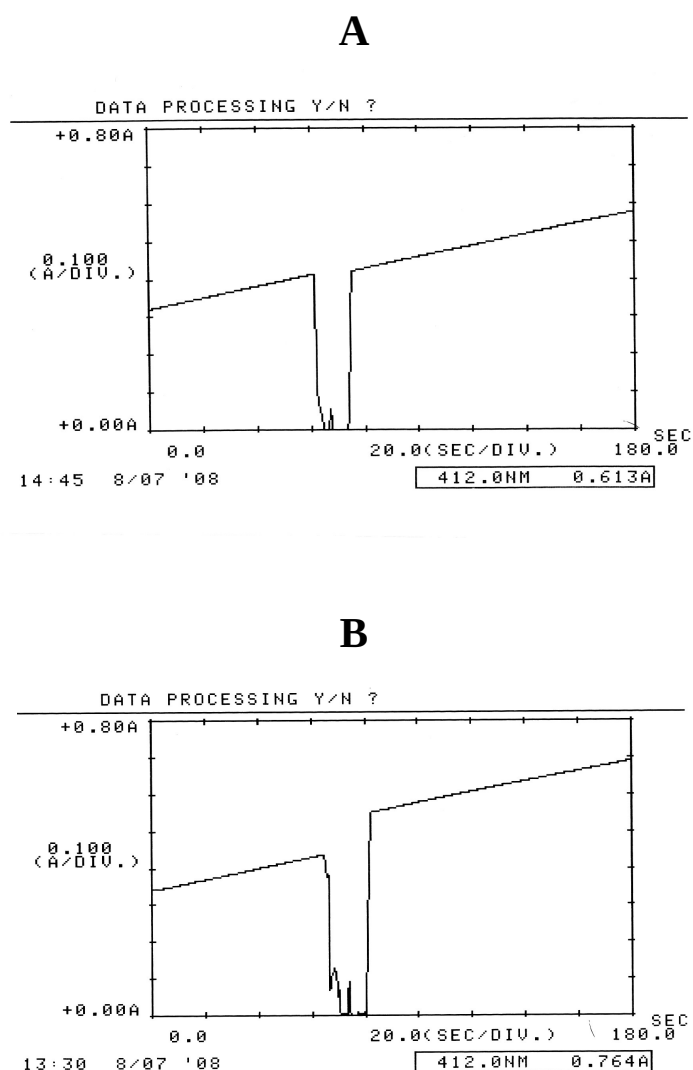


Figura 2 - Verificação do mecanismo de inibição da AChEsol pelo metil-paraoxon.

Os gráficos mostram o progresso da determinação de AChE pelo método de Ellman⁴² para a enzima de galinha (A) e de tainha (B). Depois de 60 segundos de reação, uma concentração final de $0,5\mu\text{M}$ (A) e de $50\mu\text{M}$ (B) de metil-paraoxon foi adicionada diretamente na cubeta do espectrofotômetro, acompanhando-se a reação até 180 segundos. As quantidades de enzima e inibidor foram ajustadas de modo a garantir a mesma atividade inicial e uma quantidade de inibidor que é capaz de inibir 80% da enzima com dois minutos de incubação na ausência de substrato.

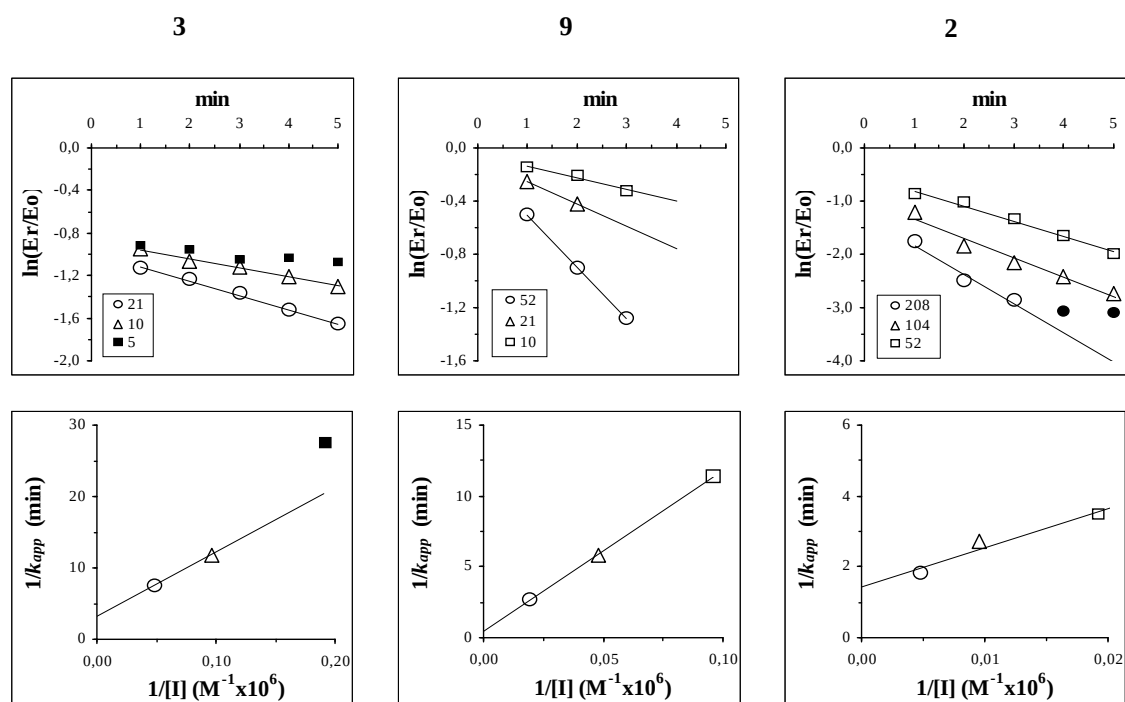


Figura 3 - Gráficos para a determinação das CCI de AChEsol de tainha inibida por MP.

Gráficos para a determinação das k_{app} (acima) e das CCI (abaixo) de AChEsol de tainha (amostras 3, 9 e 2) inibida pelo metil-paraoxon. As amostras foram coletadas na Lagoa de Saquarema em julho de 2007 e analisadas no CESTEH. As legendas localizadas dentro dos gráficos representam a concentração do metil-paraoxon em micromolar. Os símbolos cheios não foram utilizados para o cálculo porque: peixe 3 - a regressão linear para a determinação da k_{app} para a enzima do peixe 3 com a concentração de $5 \mu M$ teve r^2 menor que 0,95 (Tabela 1); peixe 2 - a quantidade de enzima residual (E_r) nos dois últimos tempos de incubação (4 e 5 minutos) da determinação de k_{app} com a concentração de $208 \mu M$ foi menor que 10% (Tabela 1). Os valores das constantes da enzima de cada amostra de peixe estão descritos na Tabela 2.

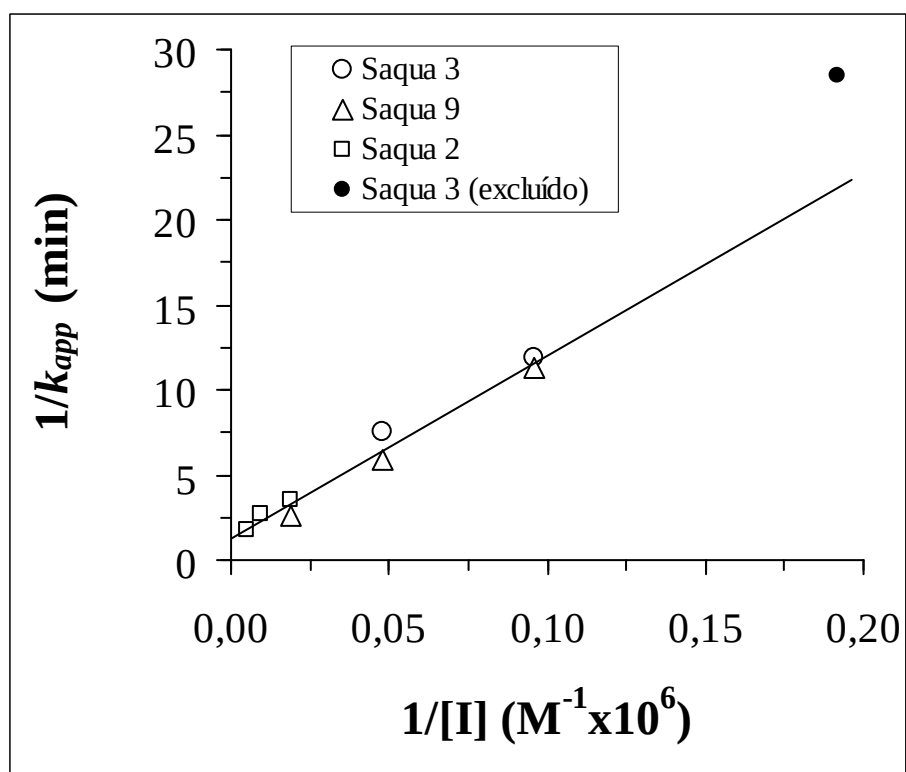


Figura 4 - Gráfico e regressão linear para a determinação das CCI de AChEsol de tainha inibida por MP com os resultados de 3 exemplares distintos na mesma regressão.

Os gráficos individuais para as determinações de k_{app} estão descritos na Figura 3 e os resultados das CCI para a enzima de cada animal na Tabela 2. Todas as determinações foram realizadas no CESTEH. O símbolo cheio não foi utilizado para o cálculo porque: peixe 3 - a regressão linear para a determinação da k_{app} para a enzima do peixe 3 com a concentração de $5\mu M$ teve r^2 menor que 0,95 (Tabela 1).

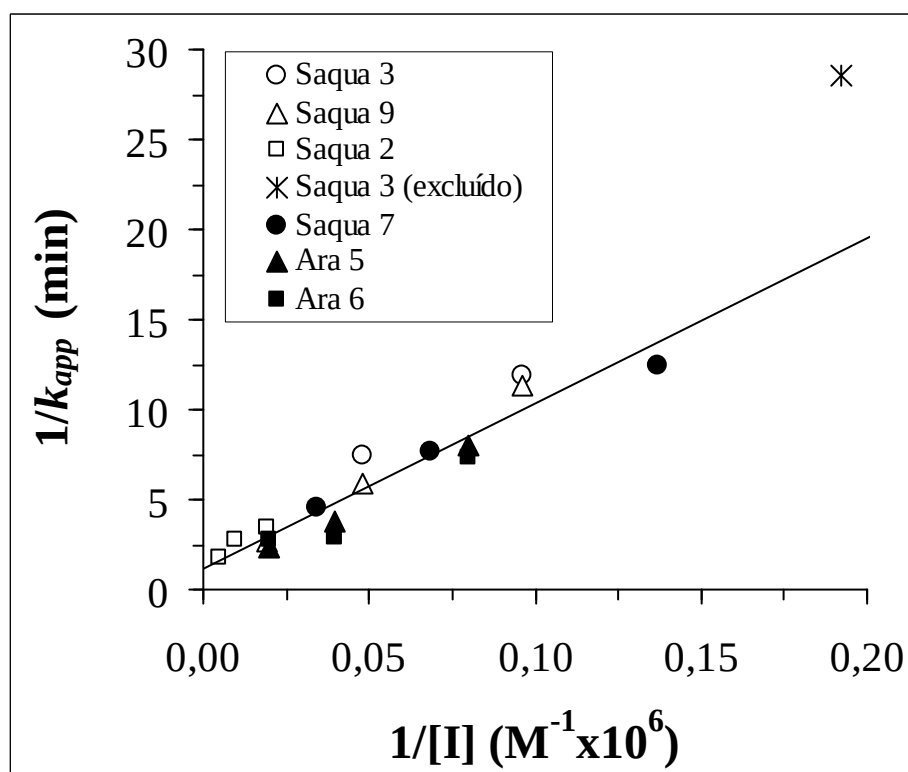


Figura 5 - Gráfico e regressão linear para a determinação das CCI de AChEsol inibida por MP para a espécie *Mugil liza*.

O gráfico expressa o resultado dos seis exemplares que foram usados neste trabalho em uma mesma regressão para determinação das CCI. Na legenda interna estão indicadas as origens de cada animal. As amostras indicadas como Saqua 3, 9, 2, 3 e 7 foram coletadas na Lagoa de Saquarema em julho de 2007 e as amostras indicadas como Ara 5 e 6 foram coletadas na Lagoa de Araruama em julho de 2005. Os símbolos vazios indicam determinações feitas no CESTEH e os símbolos cheios indicam determinações feitas na UERJ. O resultado da determinação das CCI para a enzima de cada animal em separado e da CCI resultante da regressão linear expressa nesta Figura está descrito na Tabela 2.

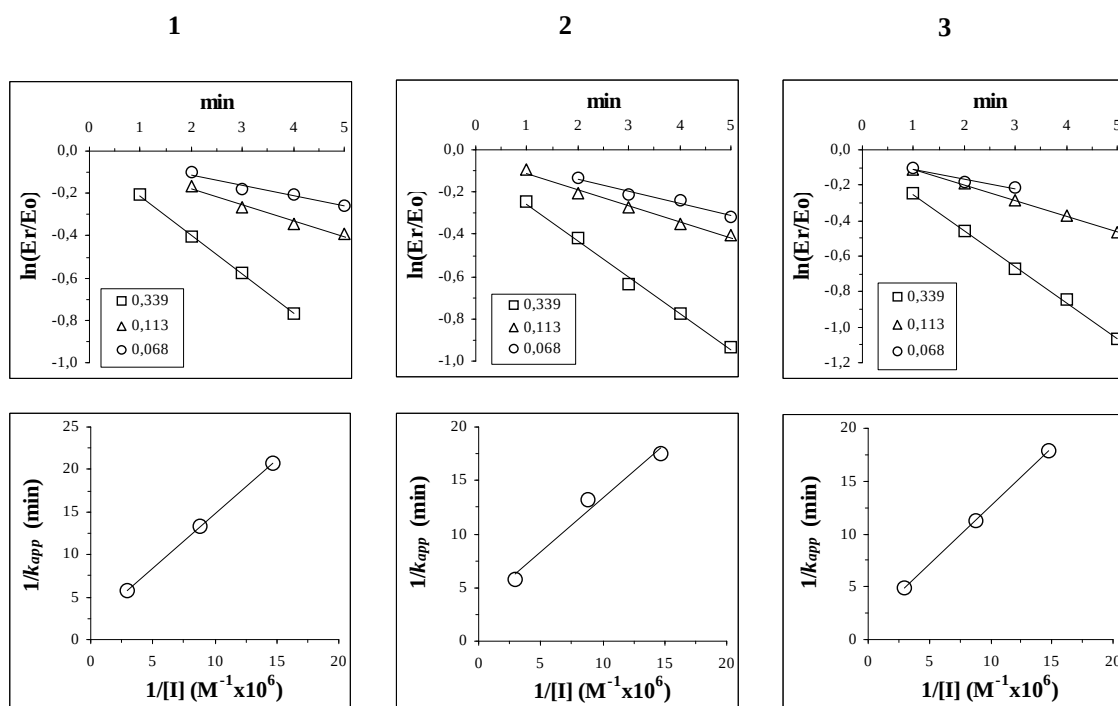


Figura 6 - Gráficos para a determinação das CCI de AChEsol de galinha inibida por MP.

Gráficos para a determinação das k_{app} (acima) e das CCI (abaixo) de AChEsol de galinha (amostras 1, 2 e 3) inibida pelo metil-paraoxon. As amostras foram cedidas por um abatedouro de Niterói. As legendas localizadas dentro dos gráficos representam a concentração do metil-paraoxon (micromolar). Os valores das constantes estão descritos na Tabela 2.

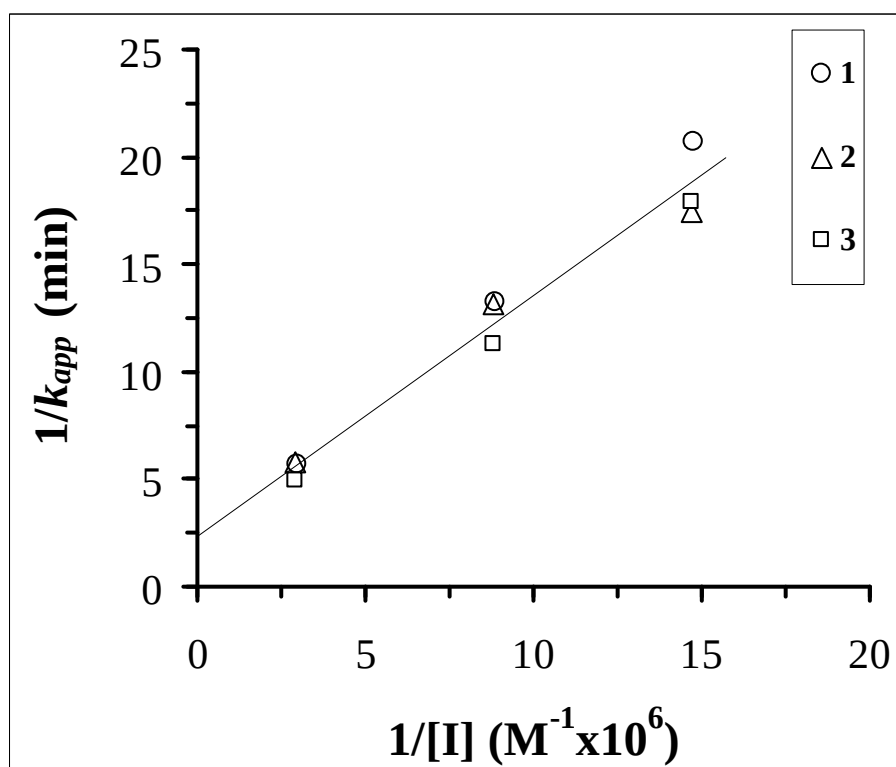


Figura 7 - Gráfico e regressão linear para a determinação das CCI de AChEsol de galinha inibida por MP de 3 exemplares distintos na mesma regressão.

Os gráficos para as determinações individuais estão descritos na Figura 6 e os resultados das constantes cinéticas na Tabela 2. Todas as determinações foram realizadas no CESTEII.

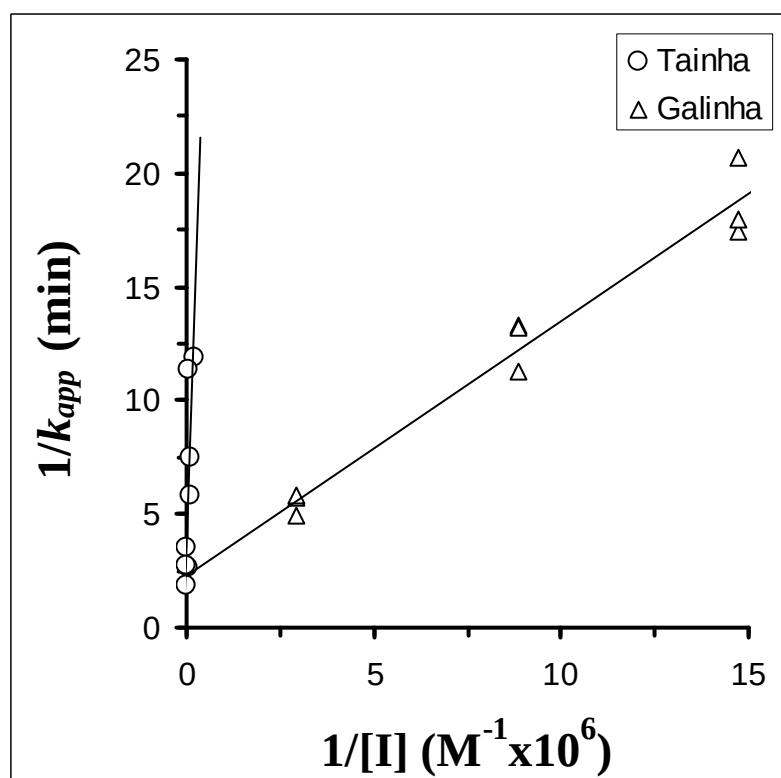


Figura 8 - Gráfico e regressão linear para as determinações das CCI das AChEsol inibidas por MP para a tainha e para a galinha com todas as determinações de k_{app} em uma mesma regressão.

Referente aos resultados expressos nas Figuras 5 e 7 e na Tabela 2.

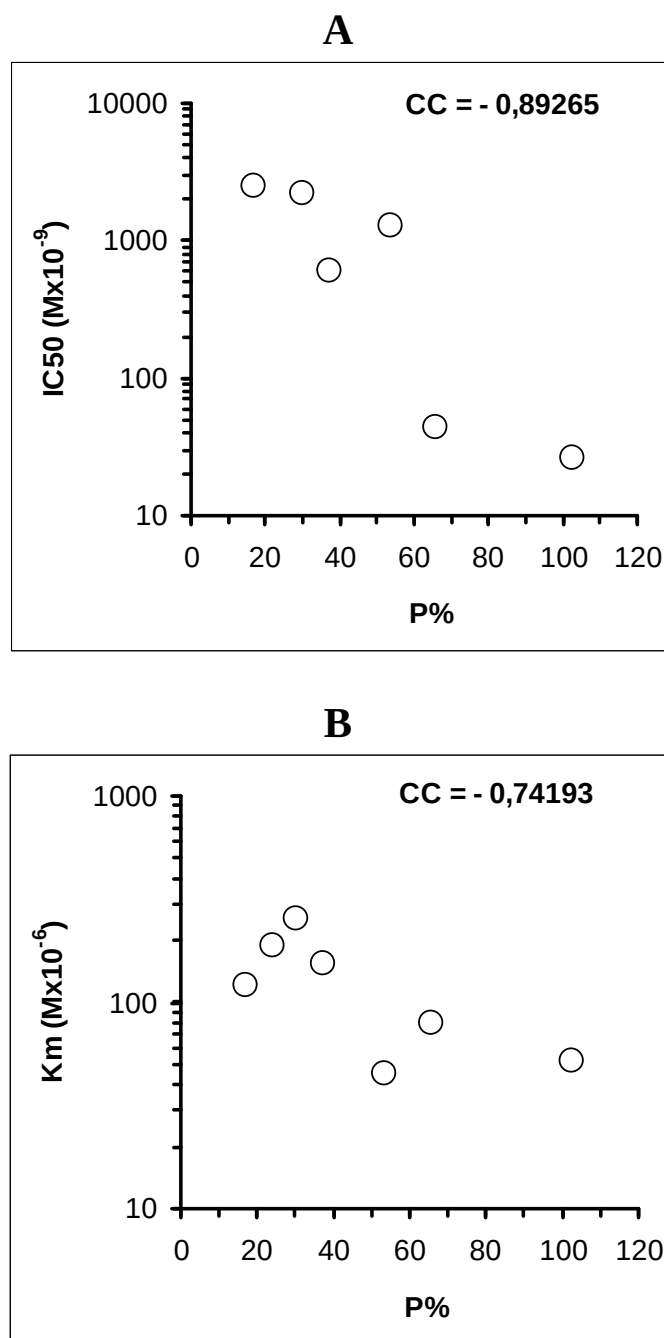


Figura 9 - Correlação entre a sensibilidade da AChEsol dos animais estudados ao MP (A) e a afinidade da AChEsol pelo substrato acetiltiocolina (B) e a especificidade da AChEsol pelo substrato (P%)

CC = Coeficiente de Correlação; IC50 = concentração de MP (nanomolar) que inibe 50% da atividade da enzima depois de 30 minutos de incubação; Km = constante de Michaelis & Menten para o substrato acetiltiocolina (micromolar); P% = Porcentagem da atividade enzimática obtida com o substrato propioniltiocolina em relação à atividade obtida com o substrato acetiltiocolina com a mesma preparação de enzima. Referente aos resultados expressos da Tabela 3.

Tabela 1 - Resultados individuais para as determinações da atividade residual de AChE no cálculo de kapp de 3 exemplares de tainha e de 3 exemplares de galinha

Todas as dosagens foram feitas no mesmo laboratório (CESTH). Os dados destacados em cinza não foram utilizados porque: animal 3 - a regressão linear para a determinação da kapp para a enzima do peixe 3 com a concentração de 5,2µM teve r^2 menor que 0,95 (Tabela 1); animal 2 - a quantidade de enzima residual (Er) nos dois últimos tempos de incubação (4 e 5 minutos) da determinação de kapp com a concentração de 208µM foi menor que 10% (Tabela 1). Os gráficos para o cálculo das kapp estão descritos nas Figuras 3 (tainha) e 6 (galinha) e os valores das constantes estão descritos na Tabela 2.

Tainha

N	Animal 3						Animal 9						Animal 2					
Mx10 ⁻⁶	5,2		10,4		20,8		10,4		20,8		52,1		52,1		104,2		208,3	
min	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er
0	2,78	100	2,78	100	2,78	100	6,51	100	6,51	100	6,70	100	5,26	100	5,26	100	5,26	100
1	2,58	93	2,53	91	2,16	78	5,63	86	5,08	78	4,06	61	2,71	52	1,95	37	1,14	22
2	2,48	89	2,23	80	1,93	69	5,27	81	4,28	66	2,71	40	2,35	45	1,04	20	0,55	10
3	2,27	82	2,13	77	1,70	61	4,72	73	nd		1,86	28	1,70	32	0,75	14	0,38	7
4	2,31	83	1,95	70	1,46	52	nd		nd		1,30	19	1,24	24	0,58	11	0,31	6
5	2,22	80	1,77	64	1,27	46	nd		nd		nd		0,89	17	0,42	8	0,30	6
r ²	0,857		0,985		0,996		0,980		1,000		0,999		0,984		0,966		0,966	

Galinha

N	Animal 1						Animal 2						Animal 3					
Mx10 ⁻⁶	0,068		0,113		0,339		0,068		0,113		0,339		0,068		0,113		0,339	
min	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er	mU	Er
0	5,77	100	5,77	100	5,77	100	6,66	100	6,66	100	6,66	100	6,30	100	6,30	100	6,30	100
1	5,45	94	5,31	92	4,69	81	6,24	94	6,06	90	5,21	78	5,68	90	5,63	89	4,94	78
2	5,21	90	4,88	85	3,84	67	5,82	87	5,43	82	4,39	66	5,24	83	5,21	83	3,98	63
3	4,81	83	4,43	77	3,24	56	5,40	81	5,09	76	3,53	53	5,08	81	4,76	76	3,23	51
4	4,70	81	4,08	71	2,68	46	5,24	79	4,70	71	3,08	46	nd		4,33	69	2,71	43
5	4,47	77	3,90	68	2,33	40	4,86	73	4,46	67	2,62	39	nd		3,96	63	2,17	34
r ²	0,953		0,976		0,997		0,976		0,985		0,994		0,938		0,999		0,999	

Tabela 2 - Constantes Cinéticas de Inibição da AChEsol de tainha e galinha usadas para a validação da metodologia usada nesse trabalho.

r^2 = coeficiente da regressão para a determinação das CCI (replots) com intersecção calculada; Kd, kp, ki = CCI para a inibição de AChEsol pelo MP; IC50 = concentração de MP em nM que inibe 50% da atividade da AChEsol depois de 30 minutos de incubação; Variação = Valor Máximo / valor mínimo para o parâmetro. As três linhas com mais de um exemplar (5+6; 3+9+2+7; todos; 1+2+3) representam as CCI obtidas com os replots feitos com os kapp juntos em uma mesma regressão linear. Origem dos animais: Tainhas 5 e 6, lagoa de Araruama, julho de 2005; Tainhas 3, 9, 2 e 7, Lagoa de Saquarema, julho de 2007; Galinhas 1, 2 e 3, abatedouro em Niterói, 2008; Local de determinação das CCI: Tainhas 5, 6 e 7 na UERJ; Tainhas 3, 9 e 2 e Galinhas 1, 2 e 3 no CESTEH-FIOCRUZ.

Animal	Constantes Cinéticas de Inibição				
	r^2	Kd	kp	ki	IC50
Tainha					
5	0,9943	398	4,14	10,39	2224
6	0,9018	155	1,90	12,24	1887
5 + 6	0,9400	232	2,60	11,24	2056
3	1,0000	29	0,32	11,02	2097
9	0,9999	261	2,30	8,83	2618
2	0,9404	77	0,69	9,05	2553
7	0,9957	37	0,48	13,07	1768
3 + 9 + 2 + 7	0,9440	51	0,57	11,07	2086
Todos	0,9078	77	0,84	10,91	2118
Variação		14	13	1,48	1,48
Galinha					
1	1,0000	0,66	0,51	784	29
2	0,9765	0,29	0,29	1010	23
3	0,9998	0,68	0,62	907	25
1 + 2 + 3	0,9643	0,48	0,43	891	26
Variação		2	2	1,29	1,29

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase cerebral dos animais que foram estudados neste trabalho

Km = Constante de Michaelis; IC50 = Concentração de metil-paraoxon que inibe 50% da AChE-sol de cérebro depois de 30 minutos de incubação a 25-28°C expresso em nanomolar; P% = Percentagem da atividade de AChE-sol sobre acetiltiocolina obtida com o uso da mesma concentração de propioniltiocolina; nd = não determinado.

Animal	Km	IC50	P%
Cação	45	1280	54
Bagre	154	606	37
Tainha	122	2118	17
Baiacu	253	2243	30
Pescadinha	187	nd	24
Rato	80	43	66
Galinha	52	26	103

4 DISCUSSÃO

A forma pela qual a enzima AChE foi preparada para os estudos apresentados no presente trabalho, solubilizando a parte insolúvel do homogeneizado com o detergente inerte Triton X-100 (AChEsol), auxiliou em um preparo mais simplificado e rápido de uma preparação de AChE, eliminando algumas etapas mais complexas utilizadas na preparação de uma enzima completamente purificada. Essa AChEsol reagiu de forma muito semelhante a uma enzima purificada quanto a ação sobre o substrato acetiltiocolina. Depois de uma determinada concentração do substrato a atividade da enzima é inibida, conforme proposto por Radic e colaboradores (1993)⁴⁷ (Figura 1). Sendo assim, ficou estabelecido a preparação de AChEsol para todas as espécies a serem estudadas nesse trabalho.

Outro fator importante é a garantia de que a inibição da atividade de AChE na preparação AChEsol segue um mecanismo completamente competitivo.⁴⁸ Na Figura 2 observamos que na presença do substrato o inibidor não interfere com o progresso da reação. O corte apresentado nas duas curvas depois de 60 segundos de reação representa o momento da adição do MP. Quando a reação volta a ser observada temos uma reta quase na mesma direção, para enzima de galinha, e uma reta paralela em um plano mais alto, para a enzima de tainha. Isso ocorreu devido ao fato de que a concentração de MP utilizada para a enzima de tainha (Figura 2B) foi cerca de 100 vezes maior que a concentração utilizada para a enzima de galinha (Figura 2A). Como a AChE de tainha é muito menos sensível que a da galinha e as concentrações do inibidor foram escolhidas para permitir 80% de inibição em dois minutos com a mesma quantidade de enzima para as duas preparações, foi necessário usar muito mais MP para a inibição da enzima de tainha. Como as soluções de MP contêm certa quantidade de para-nitrofenol, de cor amarela no pH 7,5 de dosagem da AChE, a maior concentração de MP no ensaio com a enzima de tainha provocou um aumento da absorvância inicial depois da adição do MP, sem variação na inclinação da reta que indica o progresso de formação de produto. Dessa forma, podemos concluir que, tanto para a enzima de galinha como para a enzima de tainha, o mecanismo de inibição da atividade de AChE na preparação de AChEsol é completamente competitivo não ocorrendo inibição da presença do substrato.⁴⁸

Existem diversas descrições na literatura de problemas na determinação das Constantes Cinéticas de Inibição para o mecanismo de Inibição Progressivamente

Irreversível descrito por Main (1964)³¹. Rosenfeld e colaboradores (2001)⁴⁹ demonstraram a influência do Triton X-100 nos valores de IC50 e Rosenfeld & Sultatos (2006)⁵⁰ demonstraram que as equações que descrevem essa inibição não funcionam quando a enzima é muito sensível. Então, na busca de uma forma de validação de uma metodologia para a determinação das CCI da AChE cerebral, foram escolhidas duas espécies, uma com indicações de possuir AChE muito sensível, a galinha comercial, e outra com indicações de uma grande resistência quando comparada a da galinha, o peixe neotropical tainha (*Mugil liza*).

De posse de seis cérebros de exemplares de tainha, gentilmente cedidos pelo Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto da UERJ, retirados de peixes coletados nas Lagoas de Araruama e Saquarema entre os anos de 2005 e 2007, que foram conservados a -20°C até o momento do uso, foram preparadas AChEsol de todos esses cérebros, que foram congeladas da mesma forma. As CCI para essas seis amostras de AChE foram determinadas em separado tanto na UERJ como no CESTEH. A título de exemplo, os gráficos usados na determinação dessas constantes para 3 amostras de AChEsol de tainha feitas no CESTEH são apresentadas nas Figuras 3 e 4 e os resultados de todas as inibições da enzima na Tabela 1. Analisando esses dados é possível concluir que essa metodologia, baseada na construção de retas com os dados de inibição, não precisa de uma análise estatística apurada para a busca das medidas de tendência central e de dispersão.

A construção de Regressões Lineares (RegLin) por métodos computacionais tendo o Coeficiente de Regressão (r^2) como medida da dispersão dos dados experimentais⁵¹, foi suficiente para os propósitos desse trabalho. No entanto, em certos momentos, foi necessário excluir determinados resultados que estavam completamente fora da tendência. A falta de linearidade, indicada pelo r^2 inferior a 0,95, observada para a RegLin de determinação de kapp com 5,2µM de MP para a amostra da tainha 3 Saquarema (Figura 3 e Tabela 1) levou à retirada desse ponto na construção do gráfico seguinte, com os inversos de kapp e da concentração de MP. Da mesma forma, na RegLin para a determinação de kapp com 208,3µM de MP para a amostra da tainha 2 Saquarema (Figura 3 e Tabela 1) as inibições superiores a 90% tiveram que ser eliminadas por completa falta de proporcionalidade com os demais resultados da mesma regressão. Esses resultados levaram à determinação de alguns limites para a aceitação de um resultado: (1) para as RegLin de determinação de kapp (plot) é necessário garantir um mínimo de 0,95 para o r^2 e

para a segunda RegLin (replot) um mínimo de 0,90; (2) As menores inibições precisam ser maiores que 10% e as maiores inibições precisam ser inferiores a 90% para a inclusão nos cálculos de $\ln([Er]/[Eo])$; (4) Nas determinações de k_{app} devem ser escolhidas concentrações de MP que garantam inibições próximas aos limites descritos anteriormente (mínimo de 10 e máximo de 90%) e inibições que fiquem no centro da segunda RegLin (replot). Nesse momento é importante ressaltar que a metodologia empregada nesse trabalho para a determinação das CCI é, essencialmente, um método gráfico determinístico, ou seja, um método que não está sujeito às variações do acaso, a não ser como erro metodológico e que pode usar retas ajustadas manualmente.⁵²

Além disso, o inibidor utilizado nesse estudo, o MP, foi selecionado pela facilidade de sua aferição. Esse tipo de organofosforado é um composto muito sensível à hidrólise alcalina, formando para-nitrofenol (PNP) de cor amarela como produto. O PNP é um composto razoavelmente estável, tido como padrão primário para espectrofotometria. Dessa forma, de posse de espectrofotômetros aferidos, e usando Absortividade Específica do PNP ($18600.M^{-1}.cm^{-1}$), é possível aferir facilmente as soluções de inibidor exatamente no momento do uso. A aferição dos espectrofotômetros deve ser feita com filtros especialmente construídos para esse fim. No caso do presente trabalho, os espectrofotômetros da UERJ e do CESTEH foram aferidos com filtros de óxido de hólmio, para o comprimento de onda, e de densidade neutra com 0,5 de Absorvância, para a Densidade Ótica.

Mas, o uso das CCI em estudos de filogenia também necessita da garantia de que essas medidas cinéticas são a expressão da AChE presente na espécie, sem outras influências. O gráfico da Figura 5, que expressa a RegLin para a determinação de CCI (replot) para a tainha colocando em uma mesma reta todos os resultados dos 6 exemplares testados, coletados em duas lagoas diferentes e em momentos diferentes, e com as CCI determinadas em dois laboratórios distintos, é a demonstração final de que essa é uma medida que não depende das diferenças individuais, sendo uma característica da espécie, e a metodologia está validada para ser usada em qualquer laboratório que tenha espectrofotômetros aferidos.^{32,16}

Os resultados dos gráficos para a determinação de CCI com a AChEsol de galinha estão descritos nas Figuras 6, 7 e na Tabela 1. O valor do Coeficiente de Regressão para o replot da determinação de CCI com a enzima dos 3 exemplares em um mesmo gráfico demonstra que essa metodologia pode ser empregada para

qualquer tipo de AChE, independentemente de sua sensibilidade ao MP, contrariando os resultados apresentados por Rosenfeld & Sultatos (2006)⁵⁰ que demonstraram que com enzimas muito sensíveis não existe linearidade no replot para a determinação de CCI pelo método descrito neste trabalho.

Por fim, encerrando esta etapa de validação, a Figura 8 apresenta as RegLin da determinação de CCI para as duas espécies usadas como exemplo, a tainha e a galinha. Os resultados existentes na literatura indicam que a maioria das AChEs teriam valores de k_i (inclinação do replot) que gerariam gráficos entre esses dois extremos.^{32,28,45}

A inibição da enzima AChE cerebral ao metil-paraoxon das espécies de peixes usadas no presente estudo variou de forma aleatória, como já descrito na literatura por Silva Filho (2004)¹⁸ e Oliveira e colaboradores (2007)¹⁶. Essa variação na sensibilidade da AChE cerebral de peixes marinhos ao MP, apresentada na presente pesquisa, confirma os estudos já realizados por Silva Filho e colaboradores (2004)¹⁸, onde foram estudadas diversas espécies de peixes neotropicais, com uma comparação de suas constantes cinéticas de inibição ao MP. Segundo os autores, o IC₅₀ para 30 minutos de inibição variou de 3340nM, para a espécie *Percothis brasiliensis*, a 123nM, para a espécie *Prochilodus lineatus*.

Johnson e Wallace (1987)²⁸ realizaram um estudo caracterizando as diferenças de sensibilidade da AChE cerebral de algumas espécies de animais à dois tipos de inibidores: etil-paraoxon e malaoxon. A sensibilidade variou de acordo com o inibidor, ou seja, algumas espécies menos sensíveis ao etil-paraoxon foram mais sensíveis ao malaoxon. Isso mostra a necessidade de escolha de um único inibidor para estudos que busquem usar a sensibilidade a esse inibidor como um critério filogenético. Essa variação na sensibilidade de AChE cerebral a pesticida, reportada por diversos autores^{27,28,29} indica a importância de saber como e por que existe essa variação tão significativa entre diferentes espécies de peixes ocorre e quais as suas possíveis relações filogenéticas. Ficando provado que entre peixes, de forma especial, essas diferenças de sensibilidade da AChE cerebral ao MP é uma característica de grupo filogenético, será possível indicar possíveis impactos ambientais de inibidores de AChE pelo conhecimento da biodiversidade no ambiente aquático.

Kemp & Wallace (1990)²⁹ sustentam uma tese, através de dados cinéticos, que a AChE da truta possui mais especificidade no centro catalítico do que a AChE de galinha e de rato. Essa menor tolerância à forma do centro catalítico da AChE cerebral da truta pode excluir moléculas pelo seu volume e, com isso, conferir um grau de resistência da enzima aos inibidores de cadeia mais longa. Essa menor tolerância está refletida nos valores das constantes de dissociação do complexo EI (Kd). Nossos dados corroboram essa conclusão quando podemos ver que os valores de Kd para a enzima da tainha podem ser até 150 vezes maiores do que os valores dessa constante para a enzima da galinha (Tabela 2).

É preciso ressaltar que a determinação das CCI através das equações descritas anteriormente é um método gráfico, com uma regressão linear construída com os inversos dos valores de k_{app} e das respectivas concentrações de inibidor. Esse tipo de gráfico, muito usado em cinética enzimática e conhecido como "duplo-recíproco", introduz um erro muito maior nas medidas das intersecções do que das inclinações. Isto se deve ao fato destas intersecções acontecerem perto do valor zero para ambos os eixos, região que engloba os maiores valores. Dessa forma, pequenas alterações de inclinação, que pouco afetam o k_i e, por consequência, o IC50, podem afetar sobre maneira os valores de Kd (intersecção com o eixo X) e de k_p (intersecção com o eixo Y). Isso pode ser visto em nossos resultados expressos na Tabela 2 para as medidas de Kd e IC50 para a tainha. Entre os seis animais testados foram encontradas diferenças de até 14 vezes para os valores de Kd e de somente 1,5 vezes para o valor de k_i e IC50. Essas diferenças poderiam estar expressando alguma característica da enzima que varia entre indivíduos de uma mesma espécie, ou seja, uma variação intra-específica. Mas, o mesmo não foi visto entre os 3 exemplares de galinha, cujos Kd não variaram mais do que 2 vezes. Na nossa opinião, as diferenças entre os exemplares de tainha refletem a falta de padronização nas medidas executadas para esse peixe, já que os animais foram capturados e seus tecidos conservados por um longo tempo antes das análises que, além disso, foram executadas em laboratórios diferentes. Mesmo assim, as diferenças de k_i e IC50 foram muito menores, mostrando o potencial que esta medida possui de expressar uma característica da espécie sem interferência de variações individuais.

As diferenças intra-específicas da sensibilidade da AChE cerebral ao MP que foram observadas para tainha (Tabela 2) foram consideradas desprezíveis

quando comparadas com as variações entre as espécies (inter-específica), como podemos melhor visualizar, graficamente, nas Figuras 5 e 8. De uma forma muito simplista, podemos dizer que quanto maior for a inclinação da reta obtida no replot para a determinação das CCI mais resistente ao MP será a espécie. Por consequência, uma AChE mais sensível irá render uma regressão mais próxima ao eixo de X, como acontece com a enzima de galinha (Figura 8). Como uma forma de comprovação da eficiência analítica dessa metodologia, podemos afirmar que o que estávamos buscando eram enzimas capazes de gerar retas entre as duas que estão expressas nessa Figura e correlacionar essas diferenças com a filogenia de peixes. Assim, valores de IC50 entre 26, como para a galinha, e 2118nM, como para a tainha (Tabela 3), indicam variações perto de duas ordens de grandeza e, mesmo entre os peixes estudados, temos variações de 606, como para o bagre, a 2118nM, como para a tainha.

Recentemente, através da Universidade da Califórnia, foi publicado um livro reunindo diversos trabalhos do *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry* (Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia), originalmente publicados em russo e agora reeditados em inglês. Moralev & Rosengart (2007)⁵³, editores do livro, dedicam um capítulo inteiro para "Especificidade Substrato-Inibidor e Evolução de Colinesterases" (Capítulo 6, pp. 337-373). Os autores reúnem nessa publicação perto de 40 anos de estudos com substratos e inibidores de colinesterases, em especial com insetos e polvos. A homogeneidade das preparações enzimáticas, ou seja, a presença de uma AChE verdadeira, é citada como um dos principais critérios na escolha de uma metodologia de trabalho, confirmando o uso da inibição pelo excesso de substrato como um critério mínimo de aceitação de uma preparação. Em segundo lugar, os autores indicam a especificidade pelos substratos e, por último, a sensibilidade a inibidores reversíveis e irreversíveis como instrumentos de estudos das variações inter-específicas da AChE.

Em nosso trabalho usamos somente dois substratos, acetil (AceScol) e propioniltiocolina (ProScol), e um único inibidor, o metil-paraoxon (MP). A especificidade foi traduzida na forma de uma relação percentual entre a atividade obtida com ProScol e a atividade obtida com AceScol, ou o P%, para uma mesma preparação de enzima. Além disso, buscamos expressar a afinidade por acetiltiocolina na forma do Km para esse substrato. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3. Os 4 primeiros resultados, para peixes, estão descritos pela ordem de ida-

de evolutiva, do mais antigo para o mais recente, de acordo com Nelson (2006)³⁵. Podemos ver uma correlação para os valores de Km, menores para os animais mais antigos, que não é acompanhada pelos valores de P%. Os valores obtidos para rato e galinha (80 e 52 μ M, respectivamente) são compatíveis com as descrições de Moralev & Rosengart (2001)⁵⁴ (59 e 53 μ M, respectivamente), mas não possuem qualquer correlação com os peixes. São poucas as informações sobre peixes existentes na literatura. Podemos destacar a indicação desses mesmos autores do valor de 48 μ M para o Km da AChE cerebral da raia de *Torpedo marmorata*, que também é muito próximo dos resultados que foram obtidos nesse trabalho para o cação-frango (45 μ M), peixes da classe Chondrichthyes.

Os valores obtidos para P% variaram de 17 para a tainha, animal com AChE mais resistente ao MP (IC50 = 2118nM), a 103% para a galinha, animal com a AChE mais sensível ao MP (IC50 = 26 μ M). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Kemp & Wallace (1990)²⁹ para truta (P% = 10; IC50 = 3310nM) e galinha (P% = 76; IC50 = 37nM), conforme descrito por Silva Filho e colaboradores (2004)³². Esses resultados reforçam a tese de que muitas diferenças encontradas para as afinidades de substratos e inibidores pela AChE são devidas a diferenças nos volumes dos centros catalíticos. Mas, também é importante ressaltar que essas são características das espécies e não são valores que estão sujeitos a uma variação individual por exposição a produtos tóxicos ou por estado de saúde. As constantes cinéticas de uma enzima retratam a sua seqüência de aminoácidos, que é uma determinação do genoma. As centenas de artigos descritos no livro de Moralev & Rosengart (2007)⁵³, agora em uma língua de acesso mais fácil, que descrevem essas características e buscam uma taxonomia baseada nessas medidas cinéticas para inibidores e substratos de AChE são uma prova definitiva do potencial que essas medidas possuem em estudos de filogenia.

Vale ressaltar a correlação que foi encontrada entre os valores de IC50 e Km com os respectivos valores de P% para as AChEs dos animais que foram estudados nesse trabalho, conforme descrito na Figura 9. Mais uma vez isso corrobora a teoria de que a maior sensibilidade ao MP é uma indicação de um centro catalítico menos específico. Ou seja, tanto o IC50 como o Km mostraram uma correlação negativa com o P%: quanto maior o valor de IC50, que indica menor sensibilidade, menor o valor de P%, que indica um centro catalítico mais restritivo; quanto maior o valor de Km para AceScol, que indica uma menor afinidade por esse substrato,

menor o valor de P%, que indica menor afinidade por ProScol. Para a enzima de galinha, que apresentou o menor IC50 (26nM), o valor de P% foi 103%, que indica que essa AChE não foi capaz de reconhecer a diferença entre esses substratos. Por outro lado, para a enzima de tainha, com o maior IC50, o valor de P% foi 17, o menor entre os animais testados.

No entanto, nossos resultados indicam que a idade evolutiva dos peixes não é o principal fator que influencia a sensibilidade da AChE ao MP. O valor de IC50 obtido para o baiacu-arara (2243nM) o colocam no grupo dos peixes mais resistentes sendo essa uma espécie considerada mais recente na evolução.³⁵ Nossa hipótese inicial era de que os peixes mais recentes seriam mais sensíveis tendo por base a indicação, além de nossos próprios resultados, de que os animais terrestres, com certeza mais recentes na evolução, são muito mais sensíveis ao MP.

Na Tabela 4, ao final desse capítulo, estão expressos os resultados obtidos com as espécies do presente estudo e com algumas outras espécies já descritas na literatura.¹⁶ Esta tabela está construída de forma hierárquica decrescente na escala evolutiva. Podemos observar que existe uma relação filogenética da sensibilidade da AChE ao MP quando visualizamos duas espécies do mesmo gênero, *Genidens barbus* e *Genidens genidens*, com valores de IC50 muito próximos. Também torna-se notório uma relação filogenética com as espécies *Menticirrhus americanus* e *Cynoscion striatus*, pertencentes a mesma família e apresentando valores de IC50 também muito próximos.

A escolha das espécies para esse estudo teve o propósito de selecionar uma escala evolutiva, partindo de animais mais primitivos até animais mais recentes. No caso dos peixes, sabe-se que os cartilaginosos (Chondrichthyes) surgiram há cerca de 450 milhões de anos, no período Siluriano. Com isso, a escolha do cação-frango seguiu esse princípio. As demais espécies de peixe escolhidas tiveram a finalidade de seguir mais adiante na escala evolutiva, e assim foram selecionados algumas espécies da subdivisão Teleostei, que constituem exemplares mais evoluídos que surgiram há 200 milhões de ano, no Mesozóico, na mesma época do aparecimento dos mamíferos.⁵⁵ O referido autor assegura também que, sob o ponto de vista da sistemática filogenética, a categoria Teleostei é parafilética (não possui um mesmo ancestral comum) e, talvez, o único grupo monofilético (com o mesmo ancestral) seja a classe Actinopterygii.

Moralev & Rosengart (2007, p.349)⁵³, no livro já mencionado anteriormente, tentaram uma árvore filogenética para insetos com os dados existentes para a inibição irreversível de AChE. Os dendogramas que foram obtidos não indicaram uma estreita ligação entre as ordens dos insetos e os dados de sensibilidade aos inibidores irreversíveis. Os autores indicam que essas diferenças são determinadas por uma variabilidade da estrutura de algumas regiões específicas do centro catalítico da enzima e que as mutações ocorridas entre os insetos podem ter levado tanto a convergências como a divergências filogenéticas. Os autores buscaram alinhar, através das informações dos bancos de proteínas, os aminoácidos envolvidos no centro catalítico da AChE. Cerca de setenta fontes de AChE foram alinhadas e as variáveis que indicavam as características dos 32 aminoácidos, tais como hidrofobicidade, ponto isoelétrico, polaridade e o volume molecular, foram considerados para a montagem de uma tabela de relacionamento desses fatores com a árvore filogenética das 75 espécies cujas AChEs estavam descritas no momento da publicação do trabalho. Os resultados indicaram que as AChEs e BChEs de vertebrados pertencem a um mesmo ramo. As divergências encontradas entre os agrupamentos filogenéticos obtidos pelo seqüenciamento das AChEs e aqueles agrupamentos obtidos por afinidade com substratos e inibidores levaram os autores a sugerir que: "Então, parece-nos que a classificação de colinesterases precisa ser reconsiderada e unificada" (p. 371).⁵³

Tabela 4 - Filogenia da sensibilidade ao metil-paraoxon da acetilcolinesterase cerebral de alguns peixes

A posição taxonômica das espécie foi confirmada pelas indicações de Nelson, 2006. ³⁵

Espécie	Nome vulgar	Família	Ordem	Classe	IC50	Referência
<i>Rhizoprionodon porosus</i>	cação-frango	Carcharhinidae	Carcharhiniformes	Chondrichthyes	1280	presente trabalho
<i>Genidens barbatus</i>	bagre-branco	Ariidae	Siluriformes	Actinopterygii	606	presente trabalho
<i>Genidens genidens</i>	bagre-guri	Ariidae	Siluriformes	Actinopterygii	455	Oliveira, 2007
<i>Merluccius hubbsi</i>	merluza	Merluccidae	Gadiformes	Actinopterygii	3259	Oliveira, 2007
<i>Mugil liza</i>	tainha	Mugilidae	Mugiliformes	Actinopterygii	2118	presente trabalho
<i>Pagrus pagrus</i>	pargo-róseo	Sparidae	Perciformes	Actinopterygii	1087	Oliveira, 2007
<i>Menticirrhus americanus</i>	papa-terra	Sciaenidae	Perciformes	Actinopterygii	1579	Oliveira, 2007
<i>Cynoscion striatus</i>	pescadinha	Sciaenidae	Perciformes	Actinopterygii	1595	Oliveira, 2007
<i>Percophis brasiliensis</i>	tira-vira	Percophidae	Perciformes	Actinopterygii	3339	Oliveira, 2007
<i>Lagocephalus laevigatus</i>	baiacu-arara	Tetraodontidae	Tetraodontiformes	Actinopterygii	2243	presente trabalho

4.1 Conclusões

Validação

- 1 - A “AChE particulada solubilizada”, ou AChEsol, uma preparação semi-purificada da AChE cerebral, reage de forma similar a uma enzima purificada, apresentando a inibição pelo excesso do substrato, comportamento típico da acetilcolinesterase verdadeira;
- 2 - A metodologia adotada para a medida das Constantes Cinéticas de Inibição (CCI) da AChEsol por metil-paraoxon (MP) pode ser empregada em enzimas tanto muito sensíveis, como a da galinha ($IC_{50} = 26nM$), como em AChEs mais resistentes, como a da tainha ($IC_{50} = 2118nM$), desde que sejam respeitados os limites obrigatórios de um mínimo de 10% e um máximo de 90% de inibição;

Filogenia e evolução

- 3 - Não foram encontradas diferenças significativas na sensibilidade da AChEsol de tainha ao metil-paraoxon entre animais de um mesmo cardume, confirmando a hipótese de que essa sensibilidade é uma característica da espécie;
 - 4 - Existem diferenças de sensibilidade ao metil-paraoxon entre os peixes, mas essas diferenças não estão relacionadas à idade evolutiva desses animais e
 - 5 - Os animais terrestres apresentam maior sensibilidade ao metil-paraoxon, indicando que as espécies de peixes mais sensíveis podem estar relacionadas ao seguimento da evolução do ambiente aquático para o ambiente terrestre.
-

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. Ver. Bras. Epidemiol. Vol.6, N°2, 2003.
 2. NEEDHAM, L.L, et al. Uses and issues of biomonitoring. Int. J.Hyg. Environ-Health (2006), doi: 10.1016, j. ijheh 2006.11.02.
 3. FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Textos de Epidemiologia para Vigilância Ambiental em Saúde. 132p. Brasília, Julho de 2002.
 4. OOST, R.V.D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. And Pharmacol., v.13, p.57-149, 2003.
 5. PIVETA, F., et al. Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17 (3): 545-554, mai-jun, 2001.
 7. TOTTI, A. et al. Marcadores de poluição. Química das águas QFL 3201. Instituto de Química USP.São Paulo, 11-06-2007.
 8. FONTAÍNHAS-FERNANDES,A.O uso de biomarcadores em estudo de toxicologia aquática. Revista Portuguesa de Zootecnia, Vila Real/ Portugal. Ano XII, nº 1, p67-86, 2005.
 6. OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.
 9. HYNE, R.V and MAHER, W.A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. Ecotoxicology and Environmental Safety. 54 p. 366–374, 2003
 - 10.BAPTISTA, D.F.; BUSS,D.F.;EGLER.M. Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos. Em é veneno ou remédio? Organizadores Frederico Peres e Josino Costa Moreira. Rio de Janeiro:Editora Fiocruz, 2003.
 11. SARKAR,A.,RAY,D. SHRIVASTAVA,A.N. Molecular Biomarker: Their significance and application in marine pollution monitoring. Ecotoxicology. 15. p. 333-340, 2006
 12. WHO (World Health Organization). International Programme on Chemical Safety- IPCS. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Environmental Health Criteria, 155. Geneva, 1993.
 13. LA TORRE, F.R., SALIBIÁN, A., FERRARI, L. Assessment of pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish.Chemosphere 68. p.1582-1590, 2007.
 - 14.LOPES,Renato Matos. Colinesterases de músculos e cérebro de peixes teleósteo como biomarcadores. Tese (Doutor em Ciências, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes). Universidade do Estado do Rio de Janeiro.Rio de Janeiro, 2005.
 15. STURM, A., DA SILVA DE ASSIS, H.C., HANSEN, P.D. Cholinesterase of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. Marine Environmental Research, 47 p.389-398, 1999.
-

-
16. OLIVEIRA, M.M.; SILVA FILHO, M.V.; CUNHA BASTOS, V.L.F.; FERNANDES, F.C.; CUNHA BASTOS, J. Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. *Marine Environmental Research*, 63, p.303-312, 2007.
 17. KLEMZ, C., SILVA DE ASSIS, H.C. Efeitos do Endosulfano na atividade da acetilcolinesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, fish, Teleostei). *Rev. Acad., Curitiba*, v.3, n.4, p. 51-58, out/dez. 2005.
 18. SILVA FILHO, Moacelio Veranio. Sensibilidade *in vitro* da acetilcolinesterase cerebral ao metil-paraoxon como critério de avaliação toxicológica de peixes. Tese (Doutor em Ciências, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes). Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004.
 19. ROSSI, S. Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos Pesticidas ROUNDUP® e HEXARON® em *astyanax* sp. (pisces, teleostei). Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.
 20. GRISARN, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochemical*, 264, p. 672-686, 1999.
 21. MASSOULIÉ, J.; BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annual Reviews Neuroscience*, 5, p.57-106, 1982.
 22. GNAIRE, B., GEFFARD, O., XUEREB, B., MARGOUM C., GARRIC, J. Cholinesterase activities as potencial biomarkers: Characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valva piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). *Chemosphere*, 71, p.553-560, 2008.
 23. PANG, Y.-P. Species marker for developing novel and safe pesticides. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, doi:10.1016, 2006.
 24. COUTINHO, C. F.B; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; TAKAYAMA, M.; DO AMARAL, R.B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. D. S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas: r.ecotoxicol. e meio ambiente*, v.15, p.65-72, Curitiba, jan./dez, 2005.
 25. CARR, R.L. & CHAMBERS, E.J. Kinetic analysis of in vitro inhibition, aging, and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by Paraoxon and Chlorpyrifos-oxon. *Toxicology and applied pharmacology* 139 p.365 – 373, 1996.
 26. ABBAS, R.; SCHULTZ, S. AND HAYTON, W.L. Toxicokinetics of Parathion and Paraoxon in Rainbow Trout after intravascular administration and water exposure. *Toxicology and Applied pharmacology* 136 p.194-199, 1996.
 27. WANG, C. & MURPH, S.D. Kinetic Analysis of species difference in acetylcholinesterase sensitivity to organophosphate insecticides. *Toxicology and applied pharmacology* 66 p.409-419, 1982.
 28. JOHNSON, J.A. & WALLACE, K.B. Species-related difference in inhibition of brain acetylcholinesterase by Paraoxon and Malaoxon. *Toxicology and applied pharmacology* 88 p.234-241, 1987.
-

29. KEMP, J.R.& WALLACE, K.B. Molecular determinants of the species-selective inhibition of brain acetylcholinesterase. *Toxicology and applied pharmacology*, 104, p. 246-258, 1990.
 30. ALDRIDGE, W.N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by Diethyl p-Nitrophenyl Thiophosphate (E 605) and analogues. *Biochem. J.* 46 p. 451-460, 1950.
 31. MAIN, A. R. Affinity and phosphorylation const for the inhibition of esterase by organophosphates. *Science*, v.144, p. 992-993, 1964.
 32. SILVA FIHLO, M;V.; OLIVEIRA, M. M.; SALLES, J.B.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; CASSANO, V. P. F.; CUNHA BASTOS, J. Methyl-paraoxon inhibition kinetics for acetylcholinesterase from brain of neotropical fishes. *Toxicology Letters* 153 p. 247-254, 2004.
 33. ANDRADE Jr., M.C de. Aspectos Evolutivos dos hormônios. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* volume 46, nº. 3 Junho, 2002.
 34. RIBAS, G.C. Considerações sobre a evolução filogenética do sistema nervoso, o comportamento e a emergência da consciência. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. Volume 28 (4): 326-38. Julho de 2006.
 35. NELSON, J.S. *Fishes of the world*. Fourth Edition. Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2E9 Canada, 2006.
 37. FIGUEREDO, J.L. *Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil*. Volumes I (Cações, Raias e Quimeras). Museu de Zoologia/ USP. São Paulo, 1977.
 38. MARCENIUK, A.P. Chave para identificação das espécies de bagres Marinhos (siluriformes, ariidae) da costa brasileira. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 31(2): 89 - 101, 2005.
 39. FIGUEREDO, J.L. *Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil*. Volumes II (Teleostei 1). Museu de Zoologia/ USP. São Paulo, 1978.
 40. SZPILMAN, M. *Peixes marinhos do Brasil*. Guia Prático de identificação. Rio de Janeiro. 288p, 2000.
 41. CUNHA BASTOS, VLF, J. CUNHA BASTOS, J.S. Lima, M.V. Castro Faria. Brain acetylcholinesterase as an in vitro detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. *Water Research*, Volume 25, Issue 7, July 1991, Pages 835-840. V
 42. ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JR., V & FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95, 1961.
 43. LOCKRIDGE, O.; BLONG, R.M.; MASSON, P.; FROMENT, M.T.; MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, v.36, n.4, p.786-795, 1997.
 45. KITZ, R. & WILSON, I. Ester of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, v.237, p.3245-3249, 1962.
-

46. KARDOS, S.A. & SULTATOS, L.G. Interactions of the organophosphates paraoxon and methyl Paraoxon with mouse brain acetylcholinesterase. *Toxicol. Sci.* 58: 118-126, 2000.
 44. DIXON, M. & WEEB, E.C. *Enzymes*. 3rd ed. London: Longman Group Limited, 1979.
 47. RADIC, Z.; PICKERING, VELLOM, D.C.; CAMP, S.; TAYLOR, P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32 (45), p. 12074-12084, 1993.
 48. MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S. KREJCI, E.; VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progr. in Neurobiol.*, v.41, p.31-91, 1993.
 49. ROSENFELD, C.; KOUSBA, A.; SULTATOS, L.G. Interactions of rat brain acetylcholinesterase with the detergent Triton X-100 and the organophosphate paraoxon. *Toxicological Sciences* 63, p. 208-213, 2001.
 50. ROSENFELD, C. & SULTATOS, L.G. Concentration-Dependent Kinetics of Acetylcholinesterase Inhibition by the Organophosphate Paraoxon. *Toxicological Sciences* 90 (2), p. 460-469, 2006.
 51. MOTULSKY, H. *Intuitive Biostatistics*. Oxford University Press. New York NY, 1995
 52. SPIGEL, M. R., *Estatística*. Tradução de Pedro Consentino do original "Shaum's Outline of Theory and Problems of Statistic". Editora McGraw-Hill do Brasil, Ltda. Rio de Janeiro RJ, 1971.
 53. MORALEV, S. N. & ROZENGART, E. V. Comparative enzymology of cholinesterases. *International University Line*. La Jolla CA, 2007.
 54. MORALEV, S. N. & ROZENGART, E. V. "Substrate Inhibition" Is One of the Aspects of Substrate Specificity in Vertebrate and Invertebrate Cholinesterases. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 5, p. 469-491, 2001. Translated from *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*, v. 37, n. 5, p. 358-373, 2001.
 55. PAES, E. T. Nécton Marinho. *In* Pereira, R. C. & Soares-Gomes, A (orgs) *Biologia Marinha*. Editora Interciência Ltda. Rio de Janeiro RJ, 2002.
-

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)