

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS E HISTOLÓGICAS EM *Holothuria*
grisea EXPOSTAS AO CLORETO DE ESTANHO IV.**

EDGAR ROCHA PEREIRA

VILA VELHA
MARÇO / 2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS E HISTOLÓGICAS EM *Holothuria*
grisea EXPOSTAS AO CLORETO DE ESTANHO IV.**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

EDGAR ROCHA PEREIRA

VILA VELHA
MARÇO / 2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P436a Pereira, Edgar Rocha.

Alterações enzimáticas e histológicas em *Holothuria grisea* expostas ao cloreto de estanho IV / Edgar Rocha Pereira. – 2014.

64 f.: il.

Orientador: Zilma Maria Almeida Cruz.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Compostos orgânicos de estanho - Toxicologia. 2. Animais marinhos. 3. Histopatologia. 4. Invertebrado. I. Cruz, Zilma Maria Almeida. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 592.177

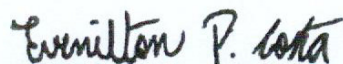
EDGAR ROCHA PEREIRA

ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS E HISTOLÓGICAS EM *Holothuria grisea* EXPOSTAS AO CLORETO DE ESTANHO IV.

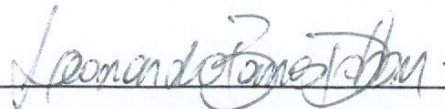
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 31 de março de 2014,

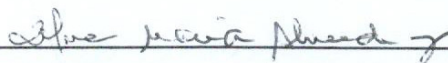
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Evenilton Pessoa Costa - UENF



Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss - UVV



Prof. Dra. Zilma Maria Almeida Cruz - UVV
Orientadora

A Rita de Cássia, Carlos Alberto, Lucas Rocha e Luna por apoiarem e acreditarem em um sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que possibilitou mais esta conquista em minha vida.

Agradeço aos meus admiráveis e incansáveis pais, Carlos Alberto Pereira e Rita de Cassia Penna Rocha Pereira, por todo carinho e amor incondicional e por sempre me incentivar a lutar e persistir para concretização de meus ideais. A meu irmão Lucas pela companhia e apoio.

A minha orientadora professora Dra Zilma Maria Almeida Cruz, agradeço de forma especial a oportunidade, confiança, apoio, orientação, dedicação e amizade.

Ao professor Dr. Rodrigo, pelo apoio em todas as análises hitológicas e por co-orientar este trabalho.

Ao professor Dr. Evenilton Pessoa Costa e Leonardo Barros Dobbss pelo apoio e pela correção do trabalho.

Agradeço a todos os professores do programa, que sempre compartilharam seus conhecimentos com todo entusiasmo.

Aos estagiários do laboratório e alunos de iniciação científica por se mostrarem sempre dispostos a ajudar nos momentos de necessidade.

A FAPES pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram de alguma forma, mas a memória falha em lembrar.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Contaminação ambiental por elementos-traço.....	15
2.2 Bioindicadores	17
2.2.1 <i>Holothuria grisea</i> como bioindicador.....	19
2.2.2 Marcadores bioquímicos.....	20
2.2.3 Superóxido dismutase	21
2.2.4 Catalase.....	22
2.2.5 Glutathione-S-transferase.....	22
2.2.6 Glutathione redutase.....	23
2.2.7 Biomarcadores histológicos.....	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Coleta dos organismos.....	26
4.2 Bioensaios.....	28
4.3 Determinação da superóxido dismutase	29
4.4 Determinação da catalase	29
4.5 Determinação da glutathione-S-transferase.....	30
4.6 Determinação da glutathione redutase	30
4.7 Determinação das proteínas totais.....	31
4.8 Histologia.....	31
4.9 Análise estatística.....	32
5 RESULTADOS	33

5.1 Superóxido dismutase.....	33
5.2 Catalase.....	35
5.3 Glutathiona-S-transferase	37
5.4 Glutathiona redutase.....	38
5.5 Histomicrografia de órgão arborescente.....	39
6 DISCUSSÃO.....	42
6.1 Superóxido dismutase.....	43
6.2 Catalase.....	46
6.3 Glutathiona-S-transferase.....	48
6.4 Glutathiona redutase.....	50
6.5 Análise histológica	50
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
8 REFERÊNCIAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Área de coleta de *H. grisea*. (A) Mapa de localização da área. (B) Área de coleta na Praia de Santa Cruz, Aracruz, ES. Fonte: Geobases (2012). Aerolevanteamento-Ortofotos, IEMA/ES. **27**
- Figura 2** Aquários utilizados no bioensaio. Cada aquário continha concentrações diferentes de SnCl₄ e cinco exemplares de *H. grisea*. **28**
- Figura 3** Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em Órgão arborescente (A) Intestino (B), Gônada (C) e músculo (D) de *H. grisea*, expostas ao tetracloreto de estanho IV (SnCl₄). **34**
- Figura 4** Atividade da Catalase (CAT) em Órgão arborescente (A), Intestino (B), gônadas (C) e músculo (D) de *H. grisea*, exposta ao tetracloreto de estanho IV(SnCl₄). **36**
- Figura 5** Atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) em órgão arborescente de *H. grisea*, expostas ao tetracloreto de estanho IV (SnCl₄). **38**
- Figura 6** Atividade da Glutathione Redutase (GR) em intestino e músculo de *H. grisea*, expostas ao tetracloreto de estanho IV (SnCl₄). **39**
- Figura 7** Histomicrografia do órgão arborescente do indivíduo controle exposto à água do mar, durante 96h. A: **D1** = Ducto em corte transversal. Coloração com HE. Fotomicrografia ao M.O. 100 X. B: Processamento de imagem para evidenciação da delimitação de componentes celulares e teciduais. **39**

- Figura 8** Órgão arborescente de *Holothuria grisea* exposta a concentração 0,3 mg L⁻¹ de SnCl₄. A: **D1** = Ducto em corte transversal; **D2** = Ducto em corte longitudinal. Coloração com HE. Fotomicrografia ao M.O. 100 X. B: Processamento de imagem para evidência da delimitação de componentes celulares e teciduais. No epitélio do órgão observar: 1) a presença de vacúolos no polo basal das células (⇨); 2) acentuada dilatação dos ductos. **40**
- Figura 9** Órgão arborescente de *Holothuria grisea* exposta a concentração 0,6 mg L⁻¹ de SnCl₄. **A: D1** = Ducto em corte transversal. **B:** Processamento de imagem para evidência da delimitação de componentes celulares e teciduais. No epitélio do órgão observar: 1) a presença de vacúolos no polo basal das células (⇨); 2) acentuada dilatação dos ductos. Coloração com HE. Fotomicrografia ao M.O. 100X. **40**
- Figura 10** Órgão arborescente de *Holothuria grisea* expostas a concentração 0,9 mg L⁻¹ de SnCl₄. **A: D1** = Ducto em corte transversal. **B:** Processamento de imagem para evidência da delimitação de componentes celulares e teciduais. No epitélio dos túbulos do órgão observar: 1) a hialinização do citoplasma das células epiteliais (⇨); 2) as formações vacuolares no polo basal celular (⇨); 3) acentuada dilatação dos ductos. Coloração com HE. Fotomicrografia ao M.O. 100 X **40**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis físico-químicas da coluna d'água coletada para o bioensaio com <i>H. grisea</i> . As determinações foram realizadas <i>in situ</i> .	33
-----------------	--	-----------

RESUMO

PEREIRA, EDGAR, Universidade Vila Velha – ES, Março de 2014. **ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS E HISTOLÓGICAS EM *Holothuria grisea* EXPOSTAS AO CLORETO DE ESTANHO IV.** Orientadora: Zilma Maria Almeida Cruz.

O estanho é um elemento-traço presente naturalmente no ambiente em baixas concentrações, porém com o desenvolvimento industrial e o uso de tintas antiincrustantes nos cascos das embarcações, promove um aumento deste composto no meio o que trás efeitos deletérios as populações e pode chegar até o ser humano. O uso indiscriminado em defensivos agrícolas, agentes conservantes e até mesmo em estabilizadores de PVC, são fontes importantes do metal para os ecossistemas. Muitos organismos estão sendo utilizados no biomonitoramento de ambientes impactados por estanho, *Holothuria grisea*, por ser um animal de pouca locomoção e grande representatividade no ambiente se torna de grande interesse para estudos ecotoxicológicos e o uso de biomarcadores é uma importante estratégia para o monitoramento ambiental. Enzimas do estresse oxidativo e alterações histopatológicas tem-se mostrado de grande valia, pois permite predizer a qualidade do ambiente onde um indivíduo está inserido. O presente estudo mostra que estas enzimas sofreram forte redução na sua atividade catalítica quando expostas ao estanho, entretanto quanto às alterações histopatológicas percebe-se que faltam estudos complementares a fim de caracterizar tais alterações como ação maléfica do metal, já que não se encontra na literatura nenhum trabalho relacionado a órgão arborescente de *Holothuria grisea*.

Palavras chaves: SOD, CAT, GST, GR, histopatologia.

ABSTRACT

PEREIRA, EDGAR, University Vila Velha – ES, March, 2014. **CHANGES IN ENZYMATIC AND HISTOLOGICAL RESPONSES OF *Holothuria grisea* EXPOSED TO CHLORIDE TIN IV.** Advisor: Zilma Maria Almeida Cruz

Tin is a trace element naturally present in the environment at low concentrations, however with industrial development and the use of anti-fouling paints on the hulls of vessels, it promotes an increase of this compound in the environment which brings deleterious effects to the species populations, may reach the humans by the food chain. The indiscriminate use in pesticides, preservatives and even PVC stabilizers are important sources of the metal for ecosystems. Many organisms are being used in biomonitoring environments impacted by tin, being the *Holothuria grisea* an animal with restricted locomotion and large representation in the environment, it becomes of great interest for ecotoxicological studies and the use of biomarkers is an important strategy for environmental monitoring. Enzymes of oxidative stress and histopathological changes has proved of great value, as it allows to predict the quality of the environment where an individual is inserted . The present study shows that these enzymes were strongly reduced its catalytic activity when exposed to tin, though the histopathologic changes as it is perceived that lack additional studies to characterize these changes as negative action of the metal, since it is not found in the literature any work related to arborescent organ of *Holothuria grisea* .

Keywords: SOD, CAT, GST, GR, histopathological.

1 INTRODUÇÃO

A concentração de elementos-traço em ambientes aquáticos tem se elevado principalmente em áreas costeiras, devido à atividade antrópica (Jonsson & Toledo, 1993). Alguns destes elementos têm a capacidade de induzir efeitos nocivos nos organismos vivos em concentrações ecológicas relevantes e por isso, são considerados importantes contaminantes ambientais.

Muitos poluentes químicos requerem especial atenção devido a elevada estabilidade e toxicidade para organismos aquáticos. Estas substâncias podem se acumular em tecido adiposo dos indivíduos expostos, continuamente, mesmo em concentrações sub-letais (Jonsson & Toledo, 1993).

O uso intensivo de pesticidas que contém estanho inorgânico em sua composição, no controle de pragas agrícolas, eleva muito a contaminação de ecossistemas aquáticos. Estas substâncias atingem o ambiente por diferentes rotas que incluem: aplicação direta, descargas urbanas e industriais e principalmente uso na agricultura. Através da lixiviação estes compostos são carregados para o leito de pequenos córregos, deságuam nos rios e chegam até o mar.

O interesse sobre a contaminação por estanho em ambientes de estuário e marinhos vem crescendo devido sua capacidade em bioacumular ou bioconcentrar nos tecidos de organismos em concentrações que causam efeitos deletérios, não somente para organismos alvos, como também seus predadores, inclusive o homem (Cunha *et al.*, 2007).

Em organismos aquáticos o estanho pode alterar alguns processos fisiológicos como osmorregulação, respiração e crescimento e comportamento (Almeida *et al.*, 2002). Várias espécies são objetos de estudo em relação a contaminação por estanho. Pelo fato deste metal induzir diversas respostas em diferentes níveis, pesquisadores têm apresentado resultados para vários organismos marinhos e lacustres.

Considerando o extenso litoral do estado do Espírito Santo, e sua exposição às atividades antrópicas, torna-se importante um estudo que visa estabelecer parâmetros cinéticos e histológicos em uma espécie de equinoderma muito comum em todo litoral e que poderá servir como bioindicador de poluição ambiental.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ELEMENTOS-TRAÇO

A contaminação aquática é um importante problema ambiental dos dias atuais, sendo o ambiente marinho, o responsável final por todo o aporte de substâncias tóxicas, advindas da atividade antrópica. Esse é considerado o principal fator de contaminação nas regiões costeiras (Chandran *et al.*, 2005; Jing *et al.*, 2006).

A quantidade de contaminantes dispersos neste ambiente é alta, e são representados principalmente por elementos-traço, pesticidas e demais compostos tóxicos que causam efeitos severos nos organismos vivos (Woo *et al.*, 2009).

A concentração de elementos-traço, na coluna d'água e no sedimento, depende das características ambientais, ocupação urbana e atividades desenvolvidas na região (Vutukuru *et al.*, 2006; Firat *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2009). A contaminação aquática por estas substâncias pode se tornar um risco público, pois são bioacumulados nos organismos e disseminados para outras populações por meio da cadeia alimentar, inclusive com a capacidade atingir o homem causando sérios efeitos deletérios (Almeida *et al.*, 2002; Firat *et al.*, 2008).

O estanho é um metal de grande importância em estudos ecotoxicológicos devido às quantidades significativas encontradas em zonas costeiras. As principais aplicações comerciais dos compostos orgânicos de estanho (oSn) são em estabilizadores de PVC, pesticidas de uso agrícola, agentes conservantes (de madeira, algodão e papel), na indústria de vidros e nos agentes antiincrustantes para uso náutico (Sarpa, 2009).

Um dos principais efeitos do uso de tais substâncias como antiincrustante em embarcações é o envenenamento do sistema biológico, originando mutações e condenando espécies à extinção (Holch, 2001).

A preocupação em relação ao impacto ambiental causado pela utilização de tintas antiincrustantes à base de organoestanhos (OTs), surgiu no início dos anos 80, quando foi observado que os organismos que se aderem nos cascos dos navios não eram os únicos alvos, mas também animais e plantas que habitam o mesmo ecossistema.

Entre os compostos a base de estanho, os orgânicos apresentam maior toxicidade ao ambiente e a biota sendo os seus efeitos deletérios potencializados pelo aumento dos grupos alquilas ligado ao estanho (Harison, 1989).

No entanto, os compostos inorgânicos de estanho (iSn) promovem sérias alterações aos organismos, mesmo quando em baixas concentrações no ambiente (Holch, 2001). Os iSn são encontrados em pequenas quantidades na crosta terrestre e utilizados como pseudo-pigmento para tintas, em pasta dental, perfume, sabão, aditivos de alimentos e tinturas (Anjos, 2005).

Em água do mar, o Sn pode ocorrer nas formas inorgânicas livres, nos estados de oxidação Sn(II) ou Sn(IV), ou nas formas organometálicas, como o TBT (tributilestanho) ou seus produtos de degradação DBT (dibutilestanho) e MBT (monobutilestanho) (Leroy *et al*, 2008). A atividade biológica e toxicidade do estanho também estão associadas ao estado de oxidação das formas inorgânicas: Sn(II) é mais tóxico que Sn(IV) (Shigun, 2003).

Grande parte do estanho detectado nas zonas costeiras tem origem nas descargas domésticas, efluentes industriais, atividades portuárias e agropecuárias (Anjos, 2005). As alterações provocadas no ambiente, pela descarga deste metal, são relatadas em diversos estudos realizados em todo o mundo (Lionetto *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2006; Bocchetti *et al.*, 2008; Firat *et al.*, 2008).

No Brasil, vários relatos expõem a poluição em regiões costeiras. Um deles foi descrito no Estado de Santa Catarina, mais especificamente em uma área de poluição doméstica e industrial, caracterizado pelo acompanhamento de alterações metabólicas em bivalves (Bainy *et al.*, 2000; Zanette *et al.*, 2008). No Rio de Janeiro, foram também monitoradas as águas das Baías de Guanabara, Sepetiba e Ilha Grande, porém por meio de peixes como bioindicador (Ventura *et al.*, 2002).

O estanho pode alterar processos fisiológicos como osmorregulação, respiração e crescimento, em organismos aquáticos (Frias, *et al.*, 2008).

Várias espécies são utilizadas em estudos de contaminação por elementos-traço, como o estanho, já que o contaminante pode induzir diferentes respostas, em diferentes níveis, em organismos marinhos e lacustres.

O estanho, quando bioacumulado no organismo, pode afetar processos enzimáticos, estrutura de membrana, funções fisiológicas, além de danos nucleares e teciduais, todos causados pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (Atli & Canli, 2007; Woo *et al.*, 2009). Contudo, independente da espécie, os elementos-traço são capazes de interagir com os organismos e, dependendo da concentração e do tempo de exposição interferir na comunidade e culminar com o desequilíbrio ecológico, chegando a afetar as características de uma população (Livingsstone, 1993; Sheehan & Power, 1999; Vutukuru *et al.*, 2006).

Desta forma, o monitoramento em zonas costeiras é de vital importância para o diagnóstico da qualidade dos ecossistemas. A presença de poluentes na água é acompanhada por meio de organismos bioindicadores, capazes de responder, prontamente, a quaisquer variações que ocorram no ambiente (Livingsstone, 1993).

Entretanto, não existe na literatura, qualquer estudo sobre atividades enzimáticas em *Holothuria grisea*, expostas a concentrações variadas de estanho inorgânico.

2.2 BIOINDICADORES

Os bioindicadores são organismos utilizados como monitores da poluição ambiental, e se caracterizam por apresentar ampla distribuição geográfica, serem abundantes e ainda serem espécies dominantes. Outra característica importante é serem organismos estacionários, de fácil captura, relatarem a realidade do local da coleta, o que é difícil em animais migratórios (Sheehan & Power, 1999), além de serem capazes de acumular contaminantes, como metais, em todos seus tecidos (Cunha *et al.*, 2007).

Entre todos os organismos utilizados, os invertebrados estão muito presentes como bioindicadores, com destaque para moluscos, representado pelos bivalves e gastrópodes. (Chandran *et al.*, 2005; Díaz-Jaramillo *et al.*, 2010). Os estudos de impacto de determinada área podem ser realizados tanto *in vitro* como *in situ* (Vieira *et al.* 2009; Woo *et al.* 2009; Zanette *et al.* 2008), além de ambas as situações, como os descritos por Moreira e colaboradores (2006).

Cajaraville *et al* (2000) demonstraram a importância da utilização de bioindicadores em programas de monitoramento ambiental, pela capacidade de responderem rapidamente a qualquer mudança no ambiente. Esta sensibilidade foi também observada por Nicholson e Lam (2005). Por isso, quaisquer alterações na

característica fisiológica, histológica, genéticas ou respostas enzimáticas do organismo são indicativas de mudanças no ambiente e resultante de alguma atividade impactante (Ventura *et al.*, 2002; Nicholson & Lam, 2005, Martín-Díaz *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2009).

Muitos estudos utilizam organismos marinhos como bioindicadores de contaminação ambiental por substâncias tóxicas (Lionetto *et al.*, 2003; Martín-Díaz *et al.*, 2005; Gravato *et al.*, 2010). Os biomarcadores celulares ou moleculares, em todos esses organismos sentinelas (Bocchetti *et al.*, 2008), permitem a análise de efeitos causados por diversas classes de contaminantes (Moreira *et al.*, 2006; Bocchetti *et al.*, 2008; Zanette *et al.*, 2008), e também para o monitoramento de poluentes específicos como os elementos-traço, em determinado ambiente (Regoli *et al.*, 1998; Jing *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2007).

Os biomarcadores podem ser utilizados como indicativos fisiológicos ou comportamentais da presença de contaminantes. Exemplo da vantagem de seu uso, em monitoramento ambiental, são as possibilidades de identificar a presença de substâncias, conhecidas ou não, além de detectar seus efeitos toxicológicos em diferentes níveis de organização biológica (molecular, populacional e de comunidade) (Livingstone, 1993).

2.2.1 *Holothuria grisea* COMO BIOINDICADOR

Holothuria grisea Selenka, 1867 (Aspidochirotida) são Echinodermatas marinhos da Classe Holothuroidea, conhecidos como pepinos-do-mar. A espécie é encontrada ao oeste do continente africano e asiático, e na América ocorre desde a Flórida até o sul do Brasil. As Holothurias são características de áreas estuarinas, regiões de constantes impactos por ação antrópica (Alves & Cerqueira, 2000; Gondim *et al.*, 2008).

As Holothurias apresentam hábito bentônico, muito deles considerados sésseis por viverem em fendas de pedras. São de fácil captura por possuírem movimentos lentos, além de serem suspensívoros, alimentando-se de partículas móveis e matéria orgânica encontradas na coluna d'água (Ruppert *et al.*, 2005), características compartilhadas por outros bioindicadores (Sheehan & Power, 1999; Moreira *et al.*, 2006). Além disso, possuem como característica peculiar a evisceração seguida da regeneração das partes perdidas. Essa habilidade é marcada pela eliminação proposital das vísceras com a finalidade de defesa contra

predadores ou de eliminar resíduos armazenados em tecidos internos, indicando a sensibilidade do organismo frente a compostos tóxicos (Ruppert *et al.*, 2005).

A Classe Holothuroidea é um dos grupos que apresentam maior importância nas comunidades bentônicas marinhas, uma vez que vivem na região mesolitoral até as grandes profundidades, e representam até 90% da biomassa bentônica (Ruzafa & Diogo, 1985; Ruppert *et al.*, 2005). Esses organismos possuem, ainda, importância econômica, já que tecidos de pepinos-do-mar são utilizados na culinária (Ruppert *et al.*, 2005) e na obtenção de extratos para o isolamento de princípios ativos com capacidades medicinais (Takashi *et al.*, 2005).

Algumas características populacionais dos Holothuroideas são descritas por pesquisadores brasileiros (Alves & Cerqueira, 2000; Gondim *et al.*, 2008), inclusive alguns específicos sobre a distribuição e densidade da população de *H.grisea* (Mendes *et al.*, 2006). Entretanto, nenhum estudo descreve a utilização desses organismos como indicadores de qualidade ambiental, mesmo com sua grande representatividade na biomassa.

2.2.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS

Pelo fato dos elementos-traço interferirem nos processos metabólicos é possível a utilização de diversos biomarcadores enzimáticos, que respondem prontamente a uma modificação ambiental. Uma alteração representativa está relacionada à formação de radicais livres no organismo (Bainy *et al.*, 1996; Bocchetti *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2009), representados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive oxygen species*), que incluem os íons superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e oxigênio livre (O_1) (Chandran *et al.*, 2005; Valavanidis *et al.*, 2006; Avilez *et al.*, 2008).

Esses compostos são formados, normalmente, no metabolismo aeróbico, porém são intensificados quando em presença de metais (Company *et al.*, 2006; Atli & Canli, 2007; Ferreira-Cravo *et al.*, 2009).

O desequilíbrio causado pelas ROS leva ao estresse oxidativo, que afeta o DNA, a expressão gênica, a regulação de enzimas antioxidantes, os lipídeos, os carboidratos e as proteínas. Estas alterações resultam na mutagênese, carcinogênese, danos membranares, peroxidação lipídica, oxidação e fragmentação protéica, o que demonstra a grande toxicidade desses compostos aos níveis moleculares (Sies, 1993; Farmen *et al.*, 2010).

O uso de biomarcadores enzimáticos foi intensificado nos últimos anos (Nicholson & Lam, 2005; Cunha *et al.*, 2007; Atli & Canli, 2007; Ivanina *et al.*, 2008; Golovanova, 2008; Vieira *et al.*, 2009), como resposta das alterações nas atividades de enzimas antioxidantes provocado pela elevação das ROS, ou ainda pela afinidade dos metais às cadeias laterais dos aminoácidos formadores da estrutura enzimática (Chandran *et al.*, 2005; Bertin & Averback, 2006; Ivanina *et al.*, 2008).

Desta forma, enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione redutase (GR), são utilizadas como biomarcadores em indivíduos expostos à contaminação aquática, por elementos-traço, como descritos por Company *et al.*, (2004); Chandran *et al.*, (2005); Jing *et al.*, (2006); Mosleh *et al.*, (2006) e Ferreira-Cravo *et al.*, (2009).

2.2.3 SUPERÓXIDO DISMUTASE

A superóxido dismutase (SOD; E.C.1.15.1.1) é uma enzima pertencente à classe das oxidoredutases que participa do mecanismo primário de defesa ao dano oxidativo das formas reativas de oxigênio (Escobar *et al.*, 1996; Jing *et al.*, 2006; Avilez *et al.*, 2008). A enzima apresenta duas formas isoméricas, uma contendo manganês, encontrada na mitocôndria e outra apresentando zinco e cobre em sua estrutura, encontrada no citoplasma. Os metais estão envolvidos em funções específicas, como o zinco que é responsável pela estabilização estrutural da enzima e pelo cobre, envolvido diretamente com a atividade catalítica (Geller & Winge, 1984; Berg *et al.*, 2004).

A enzima realiza a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. O processo ocorre em duas etapas e envolve a redução e oxidação do cobre presente no sítio ativo da enzima (Hart *et al.*, 1999). O superóxido é gerado normalmente no metabolismo aeróbico, e como qualquer produto, possui uma via específica de eliminação, no caso, representada pela atuação da superóxido dismutase (Flohé & Ötting, 1984). A enzima é ativada em presença do superóxido e inibida pelo produto final da reação, o peróxido de hidrogênio (Kono & Fridovich, 1982).

A sensibilidade da enzima aos radicais formados por agentes contaminantes, como metais pesados, tem possibilitado o uso da SOD como biomarcador em vários organismos que apresentam alterações em suas atividades enzimáticas (Vutukuruet *al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2009).

A sensibilidade da SOD aos metais pesados já foi confirmada por Huang e colaboradores (2006), ao determinarem as alterações estruturais e inibições na atividade enzimática quando exposta à elementos-traço, resultado também confirmado por Vutukuru e colaboradores (2006) ao estudarem o efeito de metais em peixes. Contudo, outros autores relatam aumento da atividade enzimática em resposta à presença de outros agentes impactantes (Bainy *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2009). A variação, que pode ocorrer na resposta da atividade catalítica da SOD, a capacita ao uso como biomarcador de contaminação ambiental (Almeida *et al.*, 2002; Jing *et al.*, 2006).

2.2.4 CATALASE

A catalase (CAT; E.C.1.11.1.6) é uma enzima também classificada como oxidoredutase e está envolvida na defesa do organismo contra o estresse oxidativo. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um produto secundário extremamente danoso aos seres vivos. A enzima desempenha importante papel na decomposição do peróxido de hidrogênio, e participa ainda dos processos oxidativos de compostos hidrogenados como metanol, etanol, ácido fórmico e fenóis (Aebi, 1984). As metodologias mais utilizadas para a determinação da atividade enzimática foram estabelecidas por Beutler (1975) e Aebi (1984).

O estresse oxidativo, provocado pelos elementos-traço, produz o H_2O_2 , uma espécie altamente reativa capaz de lesar a estrutura celular. A defesa contra o estresse oxidativo também ocorrem em organelas vesiculares, como os peroxissomos, que contêm quantidade representativa de CAT em sua estrutura e oferece ótimas condições para as reações da enzima (Lam *et al.*, 1995; Atli & Canli, 2007; Lehninger *et al.*, 2007).

A presença do H_2O_2 eleva a atividade da catalase até determinado ponto a partir do qual, o substrato torna-se inibidor enzimático (Aebi, 1984). Pelo fato da enzima responder à presença de radicais livres nos tecidos, a CAT tem sido utilizada como importante enzima biomarcadora em estudos que analisam o impacto em meio aquático, tanto por metais pesados como por outros agentes contaminantes (Avilez *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2009). Em peixes, a resposta aos metais é a elevação da atividade enzimática (Atli & Canli, 2007; Vieira *et al.*, 2009), enquanto que a redução é observada em invertebrados (Company *et al.*, 2006; Chandran *et al.*, 2005).

2.2.5 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

A glutationa-S-transferase (GST; E.C.2.5.1.18) desempenha importantes funções na célula, como o isolamento e transporte de compostos hidrofóbicos endógenos, na detoxificação e proteção dos tecidos da peroxidação lipídica, processos esses secundários na defesa do organismo (Cunha *et al.*, 2007; Blanchette *et al.*, 2007).

A enzima é responsável pela conjugação da glutationa reduzida (GSH) com substâncias xenobióticas, formando GS-xenobiótico. Esse produto é menos tóxico para a célula e, por que apresentar maior solubilidade no meio aquoso, apresenta maior mobilidade através da membrana, condição essencial para sua excreção (Blanchette *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2007; Carletti *et al.*, 2008; Huber & Almeida, 2008).

A resposta da enzima aos agentes contaminantes pode ser, em alguns organismos, a elevação da atividade catalítica (Bocchetti *et al.*, 2008; Monserrat *et al.*, 2008; Ferreira-Cravo *et al.*, 2009), enquanto que em outros, a resposta é a inibição enzimática, o que permite caracterizar comportamento diferente aos diversos xenobióticos (Ventura *et al.*, 2002; Mosleh *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2007).

A alteração observada na atividade da GST é amplamente utilizada como marcadora em organismos aquáticos, uma vez que a enzima responde, de forma sensível, a qualquer alteração anormal no ambiente em que os organismos estão expostos (Bainy *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2007; Bocchetti *et al.*, 2008).

2.2.6 GLUTATIONA REDUTASE

A glutationa redutase (EC 1.6.4.2) é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e da integridade da via das pentoses. A enzima é necessária para a manutenção da glutationa em sua forma reduzida e, possivelmente, para controlar o estado redox de NADP em tecidos onde há disponibilidade do GSSG (Pinto, 1969). A recuperação de GSH por GR é uma etapa essencial na manutenção da integridade do sistema de proteção celular, já que baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo (Schafer, 2001).

2.2.7 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS

Além dos biomarcadores enzimáticos, os dados histológicos compreendem uma fração importante do estudo da toxicidade sobre os seres vivos. A escolha dos tecidos avaliados possui grande importância para a relevância dos dados obtidos. Órgãos de contato direto com o agente tóxico como o intestino, ou órgão respiratório constituem importantes objetos de análise em ecotoxicologia (Lins, 2010).

Atualmente, biomarcadores histopatológicos são utilizados extensivamente para documentar e quantificar tanto a exposição quanto os efeitos de poluentes ambientais. Como monitores de exposição, estes biomarcadores têm a vantagem de quantificar apenas poluentes biológicos disponíveis em um ecossistema (Adams, 1990).

Portanto, a utilização de alguns parâmetros morfológicos pode ser uma ferramenta bastante útil para a avaliação dos efeitos de contaminantes presentes em determinado ambiente (Bernet *et al.*, 1999).

Atualmente, estado do Espírito Santo tem se destacado como o segundo produtor de petróleo e gás natural no país. Além disso, outras atividades são desenvolvidas em grande escala como a agrícola e industrial e, ambas, demandam cuidados com o ambiente marinho, considerando que muitas substâncias químicas acabam lixiviadas para esse ecossistema.

Para tanto, é necessário o acompanhamento da saúde do ambiente marinho, fonte de alimento, lazer, entre outros. Neste contexto, a escolha de um organismo que possa ser utilizado como bioindicador é de grande importância, pois permite o monitoramento e a tomada de decisões por parte dos órgãos gestores, como forma de estabelecer o desenvolvimento sustentável.

Para essa atividade é também necessária a escolha dos marcadores biológicos que sejam sensíveis à presença de contaminantes no ambiente. O acompanhamento da atividade enzimática e alterações histológicas nesses organismos, que responde às alterações no ambiente provocadas pelo homem, é muito importante além de se tornar objeto de interesse da saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades específicas das enzimas glutathione redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) e alterações micromorfológicas, em tecidos de *H. grisea* expostas a três concentrações de SnCl₄ (tetracloroeto de estanho IV) como fonte de informação para monitoramento em ambientes marinhos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver os bioensaios em presença de estanho, em processo semi-estático;

Isolar as enzimas de músculos, gônadas, intestinos e órgão arborescente (superfície respiratória);

Determinar a atividade específica da glutathione redutase, superóxido dismutase, catalase, glutathione-s-transferase em indivíduos controle e expostos às três concentrações de SnCl₄

Estabelecer qual concentração causa maior alteração na atividade das enzimas;

Estabelecer a enzima mais afetada pelo contaminante;

Comparar as respostas enzimáticas observadas nos vários tecidos estudados;

Determinar o tecido de *Holothuria grisea* mais sensível as concentrações de SnCl₄.

Avaliar alterações estruturais na histologia do órgão arborescente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DOS ORGANISMOS

Indivíduos de *Holothuria grisea* foram coletados na Praia de Santa Cruz, município de Aracruz, ES (19° 97' 42.4" S; 40° 13' 86.4" W), no mês de junho de 2013 e em período de maré baixa (Figura 1). A área para coleta foi escolhida como referência por apresentar baixa atividade urbana, industrial, agropecuária, portuária.

Todos os exemplares coletados apresentavam tamanho de aproximadamente 15 cm a fim de eliminar possíveis alterações causadas pela diferença etária na população amostrada. Durante o período de coleta, a temperatura da água estava entre 21,7° C e 22,0° C e a salinidade entre 38,8 mg L⁻¹ e 38,9 mg L⁻¹. Após a coleta, os espécimes foram imediatamente transportados em um recipiente contendo 20 litros de água do mar, para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental e Genotoxicidade, localizado no Complexo de Biopráticas da Universidade Vila Velha (UVV).

No laboratório, os exemplares foram transferidos para aquários, com controle de temperatura (23,0 ± 1,5° C), aeração e fotoperíodo (12 h de luz e 12 h escuro), além de trocas diárias de água (sistema semi-estático). Esse processo permite a retirada de toda a areia eliminada pelo intestino. A água utilizada nas trocas diárias foi coletada em um costão rochoso da Praia da Costa, Vila Velha, ES.

As características físico-químicas da água foram monitoradas diariamente por meio de aparelho Multiparâmetro, YSI-85 (YellowSprings), e o pH determinado com auxílio de pHmetro digital portátil Quimis Q-400h. No local das coletas, a transparência da água foi acompanhada com auxílio do disco de Sechi.

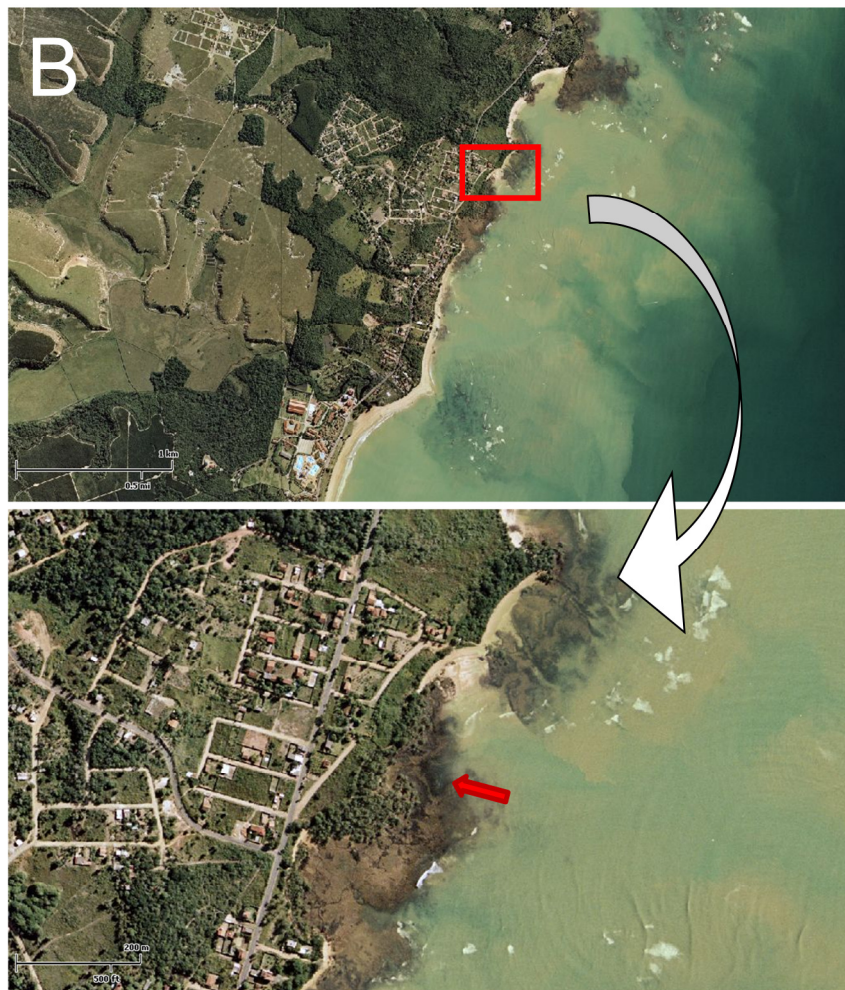
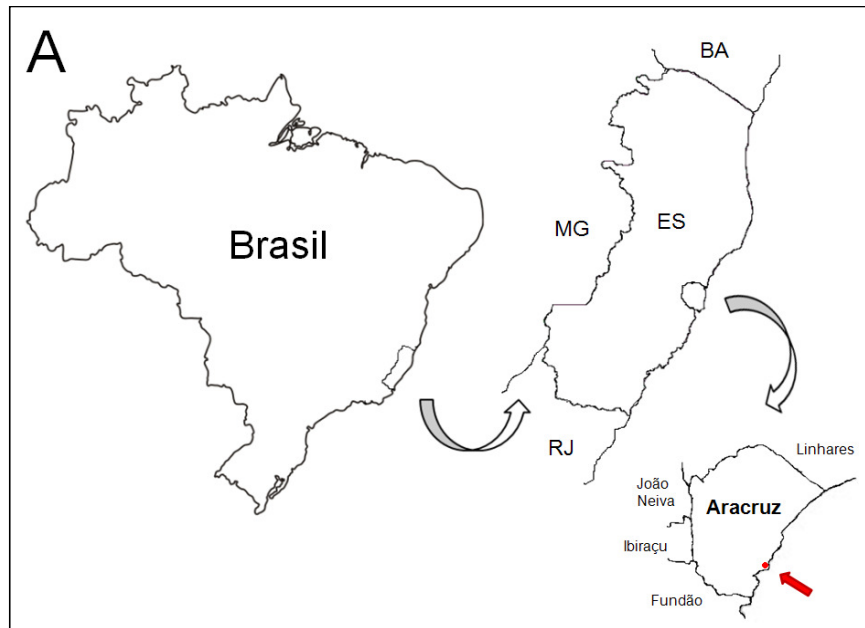


Figura 1. Área de coleta de *H. grisea*. (A) Mapa de localização da área. (B) Área de coleta na Praia de Santa Cruz, Aracruz, ES.

Fonte: Geobases (2012). Aerolevantamento - Ortofotos, IEMA/ES.

4.2 BIOENSAIOS

Após aclimação, as holothurias foram, separadas, aleatoriamente, em grupos de cinco indivíduos e transferidos para aquários com capacidade volumétrica de cinco litros (Figura 2). No primeiro aquário, denominado controle, as Holothurias foram expostas somente a água do mar. Nos outros, denominados segundo, terceiro e quarto aquários, os espécimes foram expostos às seguintes concentrações de SnCl_4 : $0,3\text{mg L}^{-1}$; $0,6\text{ mg L}^{-1}$ e $0,9\text{ mg L}^{-1}$ respectivamente.

O processo utilizado no bioensaio foi o semi-estático, no qual as soluções foram trocadas a cada 24 horas, durante o período experimental de 96 horas. Este processo mantém a concentração original do metal na coluna d'água, o que evita a precipitação, sua ligação ao sedimento, o que o torna bioindisponível.



Figura 2. Aquários utilizados no bioensaio. Cada aquário continha concentrações diferentes de SnCl_4 e cinco exemplares de *H. grisea*. Fonte: Zilma Maria Almeida Cruz

Após o período experimental, as holothurias foram anestesiadas em solução 0,01% de benzocaína, para a retirada do material biológico, representado pelo órgão arborescente (superfície respiratória, análoga as brânquias), músculos, intestino e gônadas.

Os tecidos isolados foram imediatamente pesados, em balança eletrônica Ohaus Adventurer, separados e mantidos a -20°C até o momento do uso. Para o isolamento enzimático, os tecidos foram homogeneizados em aparelho homogeneizador Glas-Col, com pistilo de teflon, em solução tampão de acordo com o ensaio enzimático, e centrifugado em centrífuga refrigerada Sorvall Biofuge Stratos. O sobrenadante obtido no processo foi utilizado como fonte de enzima. As atividades foram acompanhadas em aparelho Espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham, Biosciences).

4.3 DETERMINAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (EC 1.15.1.1)

Para a determinação da superóxido dismutase, os tecidos foram homogeneizados em 50 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,8, contendo 1 mM de Ethylene diamine tetraacetic (EDTA), e centrifugados a $15.000 \times g$, durante 15 minutos a 4°C . A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método descrito por McCord e Fridovich (1969). O extrato enzimático, 50 μL , foi incubado em 1 mL de meio de reação contendo 50 mM tampão TRIS - HCl, pH 7,2, contendo 1 mM de EDTA, 0,043 mM de xantina, 18,2 μM citocromo c e 0,2 U/mL de xantina oxidase. A reação foi iniciada pela adição de 30 μL de xantina oxidase. O íon superóxido, gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase, reduz o citocromo c, que é monitorado a 550 nm. A atividade enzimática foi expressa em unidades de SOD por mg de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo c.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CATALASE (EC 1.11.1.6)

Para a determinação da Catalase, tecidos foram homogeneizados em 50 mM tampão TRIS-HCl, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA, e centrifugados a $15.000 \times g$, durante 15 minutos a 4°C . A atividade da CAT foi determinada segundo método descrito por Beutler (1975). O meio de reação, 1 mL, continha 40 mM tampão TRIS-HCl, pH 8,0, com 5 mM de EDTA e 12 mM de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). A reação foi iniciada pela adição de 10 μL do extrato bruto. O consumo do substrato foi acompanhado, durante 30 segundos, à 240 nm. A atividade foi expressa em unidade de CAT por mg de proteína. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor $1\mu\text{mol}$ de H_2O_2 por minuto.

4.5 DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (EC 2.5.1.18)

Os tecidos foram homogeneizados em 20 mM tampão de fosfato de potássio, pH 6,5, e centrifugados a 15.000 x g, durante 15 minutos a 4° C. A atividade da GST foi determinada segundo método definido por Habig e colaboradores (1974). A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato enzimático em meio de reação contendo 20 mM tampão fosfato de potássio pH 6,5, 80 mM de glutaciona reduzida (GSH) e 20 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade enzimática foi acompanhada pela formação do produto à 340 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade foi expressa em mU/mg de proteína min⁻¹.

4.6 DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA REDUTASE (EC 1.6.4.2)

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e centrifugados a 15.000 x g por 15 minutos à 4° C. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima. A atividade foi determinada, segundo metodologia descrita por Nowakowska *et al* (2009), em meio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, NADPH 0.15 mM e 50 µL do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de GSSG 0,5 mM e acompanhada pela oxidação do NADPH à 340 nm. Mudanças na absorbância foram acompanhadas durante 3 minutos a 30 °C. As atividades foram expressas como µmol de produto formado/mg de proteína min⁻¹.

4.7 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

A proteína foi quantificada segundo metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão à 660 nm. Todas as determinações foram desenvolvidas em triplicatas.

4.8 HISTOLOGIA

Para os procedimentos histológicos, uma fração dos tecidos (músculo, órgão arborescente, gônadas e intestino) foram lavados em solução salina (NaCl 0,9%), imediatamente acondicionada em grade histológica e fixada em solução de formol a 10% tamponada, permanecendo durante 18h em geladeira. Em seguida foram

lavados em água destilada, desidratados, diafanizados e incluídos em parafina, conforme sequência abaixo:

Álcool 70%	“Overnight”
Álcool 80%	45 min
Álcool 95%	45 min
Álcool 100%	30 min
Álcool 100%	30 min
Álcool 100%	30 min
Álcool : Xilol 1:1	30 min
Xilol	30 min
Xilol : Parafina 1:1 (60°C)	30min
Parafina Pura (60°C)	3h

Secções histológicas com 3 µm de espessura foram feitas com auxílio de micrótomo Leica RM 2125RT, seguidas de secagem à 37°C, durante 24h. Os cortes foram colocados sobre lâminas histológicas, seguidos de coloração pela hematoxilina-eosina, descrita por Putt (1948).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade foi verificada pelo teste K^2 , baseado nos momentos de curtose e simetria (Zarr, 1999). Atendendo a premissa da normalidade, as atividades das enzimas dos organismos expostos aos metais foram analisadas pela regressão linear simples. A atividade enzimática foi utilizada como variável dependente e a concentração dos metais como variável independente. Diferenças entre os tratamentos foram analisados por one-way ANOVA ($p \leq 0,05$), a posteriori pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas no programa Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

5 RESULTADOS

As características físico-químicas da água utilizada não apresentaram variações significativas conforme observado na Tabela 1

Tabela 1. Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis físico-químicas da coluna d'água coletada para o bioensaio com *H. grisea*. As determinações foram realizadas *in situ*.

ias	H	C E ¹ (μ S/cm)	O D ² (mg/L)	S alinidade (ppt)	T emperatura (°C)	Tr ansparência (cm)
		5	7	3	2	72
	,19 \pm 0,08	4,6 \pm 0,15	,50 \pm 0,31	9,9 \pm 0,06	2,8 \pm 0,15	,0 \pm 3,0
		5	6	3	2	82
	,28 \pm 0,04	6,5 \pm 0,26	,44 \pm 0,15	9,9 \pm 0,12	3,4 \pm 0,20	,0 \pm 1,0
		5	6	3	2	90
	,24 \pm 0,02	6,6 \pm 0,06	,30 \pm 0,13	8,2 \pm 0,06	2,20 \pm 0,10	,7 \pm 2,1
		5	7	3	2	84
	,38 \pm 0,07	8,8 \pm 0,74	,07 \pm 0,23	8,3 \pm 0,15	3,20 \pm 0,10	,0 \pm 1,0

¹Condutividade Elétrica

²Oxigênio Dissolvido

Dia 1 - Coleta na Praia de Santa Cruz.

Dias 2, 3 e 4 - Coleta na Praia da Costa.

Durante as 96 horas do bioensaio, quando os equinodermas foram expostos a concentrações de SnCl₄, não ocorreu nenhuma evisceração ou quaisquer outras alterações comportamentais das holothurias.

5.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE

Todos os tecidos isolados dos organismos controle apresentaram atividade para a superóxido dismutase. O órgão arborescente apresentou o maior valor de atividade específica (7,2 U/mg de proteína) quando comparado aos controles do intestino, músculos e gônadas. Após exposição ao estanho, as amostras extraídas do órgão arborescente, apresentaram inibição da enzima em percentuais que variaram de 25% para a primeira amostra (0,3 mg/L⁻¹); 38% para a segunda amostra

(0,6 mg/L⁻¹) e finalmente, 46% para a exposição à maior concentração (0,9 mg/L⁻¹). Esses resultados demonstram a resposta inibitória da enzima ao aumento da concentração de exposição, o que pode ser constatado na figura 3.

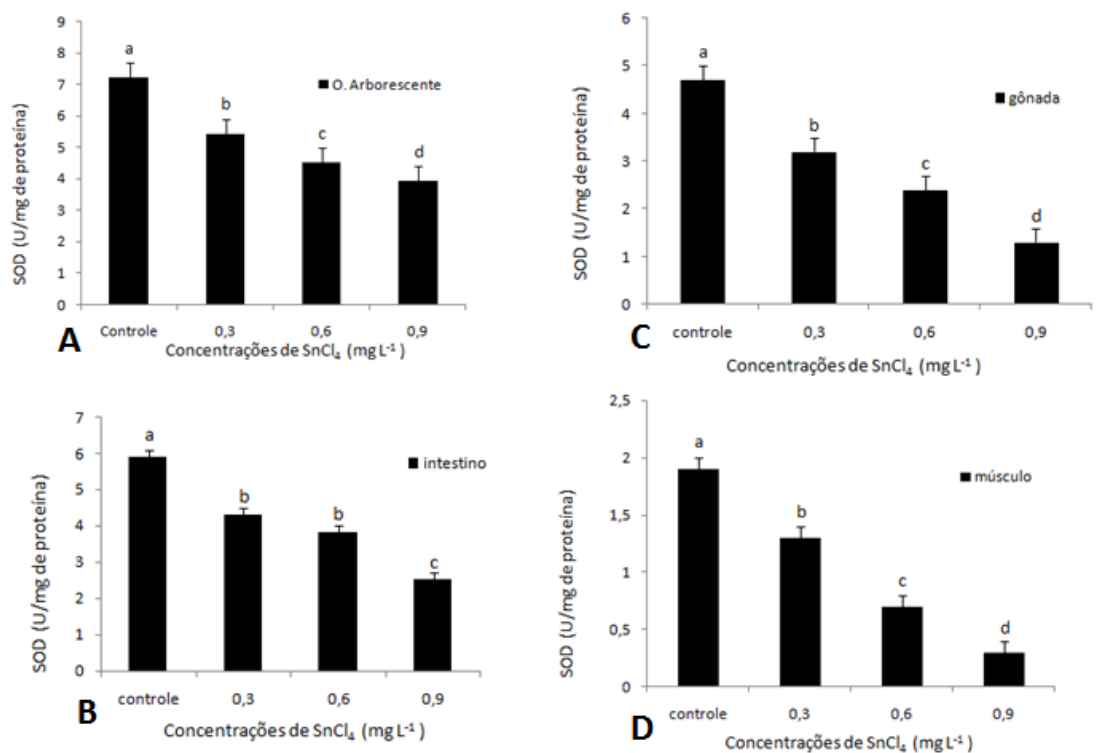


Figura 3. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em Órgão arborescente (A) Intestino (B), Gônada (C) e músculo (D) de *H. grisea*, expostas ao tetracloreto de estanho IV (SnCl₄).

Ensaio enzimático com amostras extraídas do intestino resultaram em valor de atividade específica de 5,9 U/mg de proteína. Quando as amostras da exposição ao estanho foram quantificadas, os resultados foram redução da atividade com percentuais de inibição de 27%, 38% e 58%, para as concentrações de 0,3 mg L⁻¹; 0,6 mg L⁻¹ e 0,9 mg L⁻¹, respectivamente. (Figura 3). Quando comparado aos percentuais inibitórios do órgão arborescente, é possível constatar que somente a maior concentração resultou em inibição superior àquela observada para o órgão arborescente, enquanto que nas concentrações de 0,3 mg L⁻¹ e 0,6 mg L⁻¹, os resultados foram similares.

Os ensaios desenvolvidos com as gônadas apresentaram valor de atividade específica de 4,7 U/mg de proteína para o controle. A amostra exposta à concentração 0,9 mg L⁻¹ foi bem representativa com valor inibitório de 72%, quando comparada aos valores obtidos para órgão arborescente e intestino. Por outro lado, quando determinadas as atividades das gônadas dos organismos expostos às concentrações menores, os percentuais de inibição observados foram ainda

superiores quando relacionados aos valores obtidos para órgão arborescente e intestino (32% e 49% para exposição às concentrações 0,3 mg L⁻¹ e 0,6 mg L⁻¹ respectivamente (Figura 3).

Nos músculos longitudinais foi detectada atividade específica de 1,9 U/mg de proteína para o controle (Figura 3). As inibições da SOD ocorridas no músculo foram as mais altas encontradas, 32% na primeira concentração; 63% na segunda concentração e 84% na terceira concentração do contaminante.

Os indivíduos expostos ao SnCl₄ apresentaram valores de atividade menores quando comparados ao controle, o que denota inibição nos ensaios da SOD. Entretanto, mesmo inibida, foi possível observar padrões distintos no grau de inibição quando comparados os tecidos. O músculo embora tenha apresentado uma atividade menor que o órgão arborescente, obteve inibições muito mais elevadas quando comparas a qualquer outro tecido.

As concentrações do SnCl₄ utilizadas foram capazes de promover inibições na atividade enzimática. Os valores observados, na maior concentração do metal, 0,9 mg L⁻¹, caracterizaram inibições significativas com percentuais de 84%, para o músculo e 72% para as gônadas. Os resultados observados para ambos os tecidos foram significativamente diferentes quando comparado ao controle, inclusive na menor concentração, 32% para músculo e 32% para as gônadas.

A atividade da SOD em órgão arborescente na concentração de 0,9 mg L⁻¹, apresentou redução de 46% na atividade enzimática, valor quase duas vezes superior àquele obtido no ensaio com a menor concentração do metal (0,3 mg L⁻¹). O intestino de *H. grisea*, por outro lado, apresentou inibição de 58% na atividade enzimática quando exposta a concentração de 0,9 mg L⁻¹ SnCl₄ e inibição de 27% quando expostas a menor concentração (0,3 mg L⁻¹ SnCl₄).

5.2 CATALASE

A CAT apresentou atividade catalítica em todos os tecidos. O órgão arborescente apresentou o maior valor de atividade específica com 0,06 U/mg de proteína quando comparado aos controles do intestino, gônadas e músculo. Após exposição, as amostras extraídas do órgão arborescente, apresentaram inibição da enzima em percentuais que variaram de 17% para a primeira amostra (0,3 mg L⁻¹); 37% para a segunda amostra (0,6 mg L⁻¹) e finalmente, 64% para a exposição à maior concentração (0,9 mg L⁻¹). Esses resultados demonstram a resposta inibitória

da enzima ao aumento da concentração de exposição, o que pode ser constatado na figura 4.

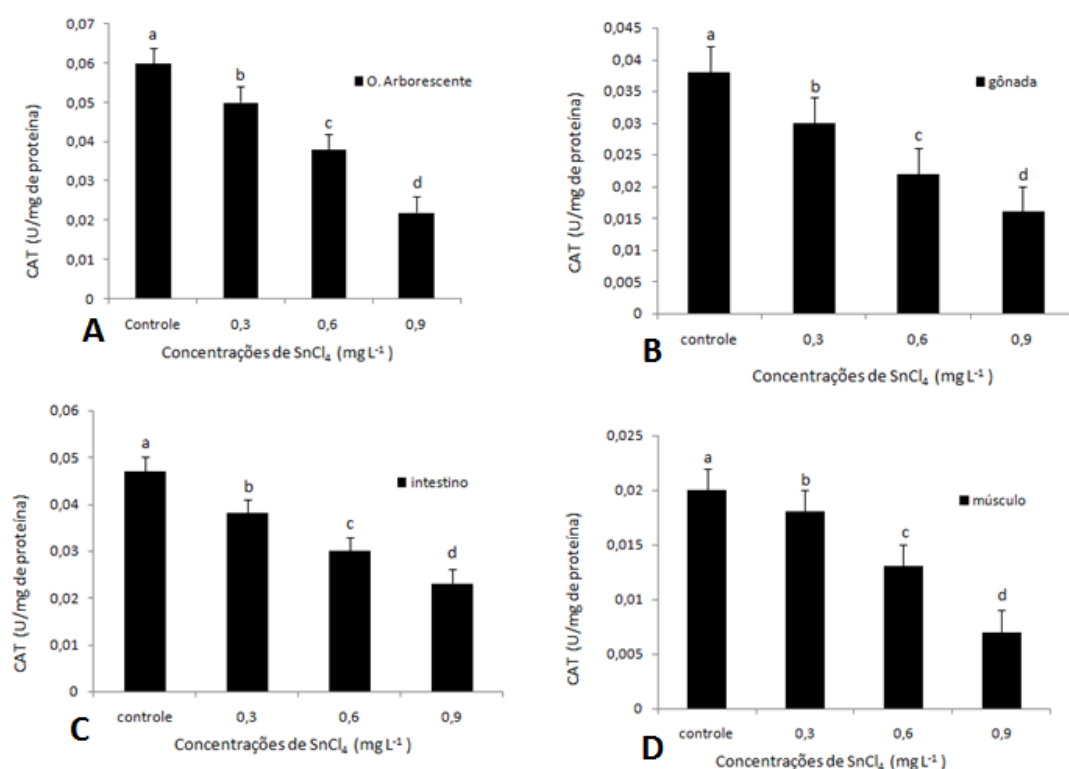


Figura 4. Atividade da Catalase (CAT) em Órgão arborescente (A), Intestino (B), gônadas (C) e músculo (D) de *H. grisea*, exposta ao tetracloreto de estanho IV(SnCl_4).

Ensaio enzimático com amostras extraídas do intestino resultaram em valor de atividade específica de 0,047 U/mg de proteína. Quando as amostras da exposição ao estanho foram quantificadas, os resultados foram redução da atividade com percentuais de inibição de 20%, 36% e 51%, para as concentrações de 0,3 mg L^{-1} ; 0,6 mg L^{-1} e 0,9 mg L^{-1} , respectivamente. (Figura 4).

Quando comparado aos percentuais inibitórios do órgão arborescente, é possível constatar que somente a maior concentração resultou em inibição inferior àquela observada para o órgão arborescente, enquanto que nas concentrações de 0,3 mg L^{-1} e 0,6 mg L^{-1} , os resultados foram similares.

Os ensaios desenvolvidos com as gônadas apresentaram valor de atividade específica de 0,038 U/mg de proteína para o controle. Quando comparado com órgão arborescente e intestino, as gônadas apresentaram maior inibição nas

concentrações de 0,3 mg L⁻¹ e 0,6 mg L⁻¹ com valores de 31% e 42% respectivamente.

A concentração de 0,3 mg L⁻¹ foi a que apresentou maior inibição nas gônadas, mostrando que mesmo em menor concentração o contaminante pode promover fortes inibições. Porém na concentração de 0,9 mg L⁻¹ os valores inibitórios foram na faixa de 58% se mantendo dentro da média percebida para o arborescente e intestino.

Os ensaios desenvolvidos com os músculos apresentaram valor de atividade específica de 0,02 U/mg de proteína para o controle. Quando comparado com o arborescente, intestino e gônadas, os músculos apresentaram as menores inibições para as concentrações de 0,3 mg L⁻¹ e 0,6 mg L⁻¹ com valores de 10% e 35%. Entretanto na concentração de 0,9 mg L⁻¹ apresentou a maior inibição para o músculo com valor de 65% (Figura 4).

O músculo embora tenha apresentado uma atividade menor que o órgão arborescente, obteve inibições muito mais elevadas quando comparas a qualquer outro tecido.

A inibição mais expressiva foi na concentração 0,9 mg L⁻¹ SnCl₄, para músculo e órgão arborescente com valores de 65% e 64% respectivamente, valor quase quatro vezes maior quando ensaiados na concentração 0,3 mg L⁻¹ com valores de 17% para órgão arborescente e quase sete vezes maior para músculo (10%)

5.3 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

A GST apresentou atividade apenas no órgão arborescente, em concentrações de mU/mg de proteína do tecido. A média de atividade específica da GST nos organismos controles foi de 120 mU/mg de proteína. A enzima se comportou de forma significativa quando expostas nas variadas concentrações do SnCl₄.

A resposta à exposição na concentração 0,9 mg L⁻¹, foi redução em 58% de sua atividade, valor coerente ao aumento da concentração, uma vez que a enzima foi inibida em 17%, quando exposto à primeira concentração, 42% na segunda e 58% na terceira (Figura 5).

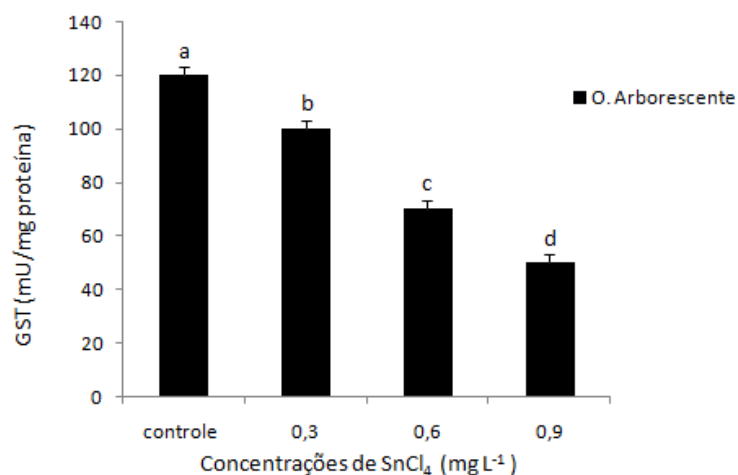


Figura 5. Atividade da Glutationa-S-Transferase (GST) em órgão arborescente de *H. grisea*, expostas ao tetracloreto de estanho IV (SnCl₄).

5.4 GLUTATIONA REDUTASE

Apenas intestino e músculo apresentaram atividade para a glutatona reduzida em concentrações de mU/mg de proteína do tecido. A média de atividade específica nos organismos controles foi de 80 mU/mg de proteína para intestino e de 72 mU/mg de proteína para o músculo (Figura 6). A enzima sofreu alterações significativas quando ensaiadas na presença de SnCl₄.

As porcentagens de inibição no intestino foram de 38% na concentração de 0,3 mg L⁻¹; 48% na concentração de 0,6 mg L⁻¹ e 64% na concentração de 0,9 mg L⁻¹

Para os músculos as inibições foram ainda maiores em todas as concentrações do SnCl₄ com valores de 40% (0,3 mg L⁻¹) ; 60% (0,6 mg L⁻¹) e 70% (0,9 mg L⁻¹).

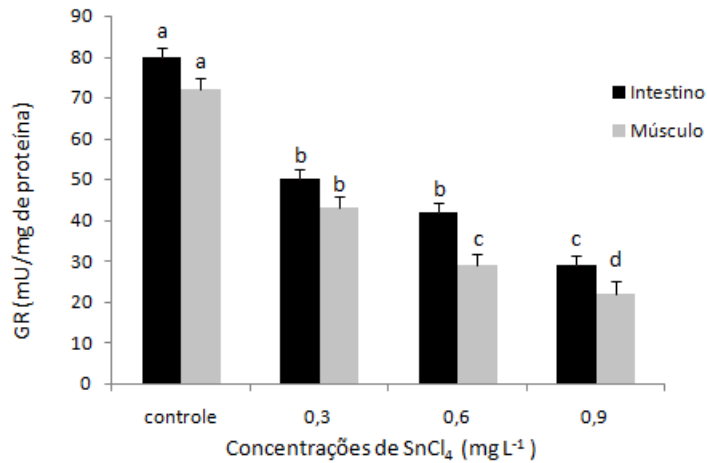


Figura 6. Atividade da Glutathione Redutase (GR) em intestino e músculo de *H. grisea*, expostas ao tetracloreto de estanho IV (SnCl₄).

5.5 HISTOMICROGRAFIA DE ÓRGÃO ARBORESCENTE

Os indivíduos controle apresentaram aspectos normais do tecido, onde pode ser observado o epitélio dos tubulos respiratórios bem estruturados e integros (Figura 7).

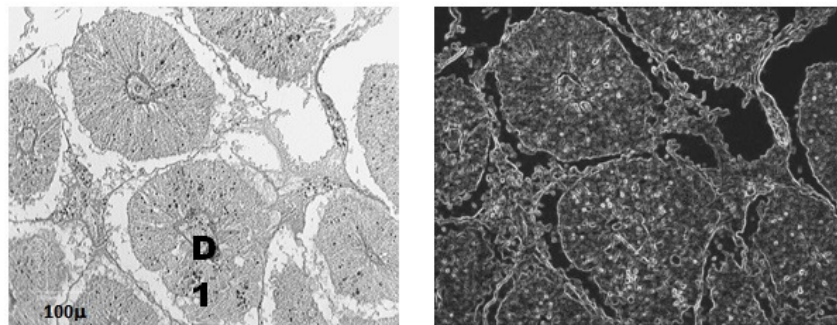


Figura 7. Histomicrografia do órgão arborescente do indivíduo controle exposto à água do mar, durante 96h. A: **D1** = Ducto em corte transversal. Coloração com HE. Fotomicrografia ao M.O. 100 X. B: Processamento de imagem para evidênciação da delimitação de componentes celulares e teciduais.

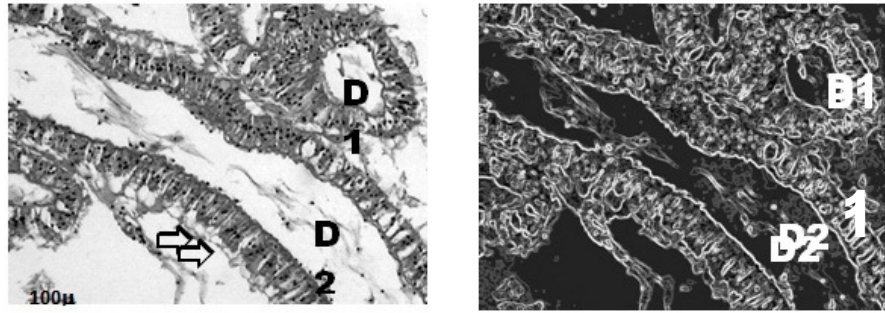


Figura 8. Órgão arborescente de *Holothuria grisea* exposta a concentração $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de SnCl_4 . A: **D1** = Ducto em corte transversal; **D2** = Ducto em corte longitudinal. Coloração com HE. Fotomicrografia ao M.O. 100 X. B: Processamento de imagem para evidênciação da delimitação de componentes celulares e teciduais. No epitélio do órgão observar: 1) a presença de vacúolos no polo basal das células (); 2) acentuada dilatação dos ductos.

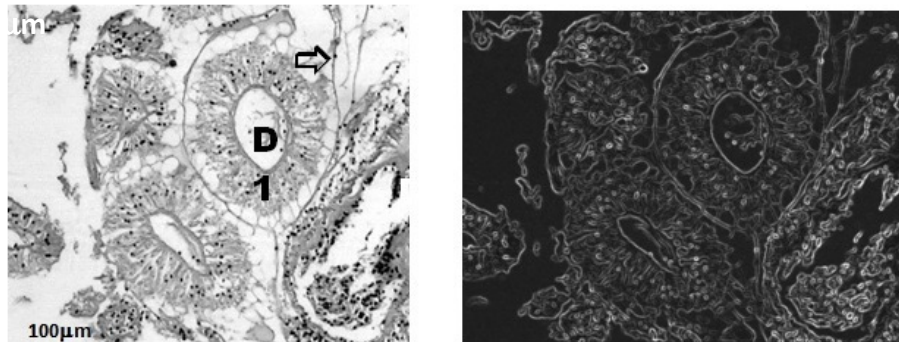


Figura 9. Órgão arborescente de *Holothuria grisea* exposta a concentração $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de SnCl_4 . A: **D1** = Ducto em corte transversal. B: Processamento de imagem para evidênciação da delimitação de componentes celulares e teciduais. No epitélio do órgão observar: 1) a presença de vacúolos no polo basal das células (); 2) acentuada dilatação dos ductos. Coloração com HE. Fotomicrografia ao M.O. 100 X.

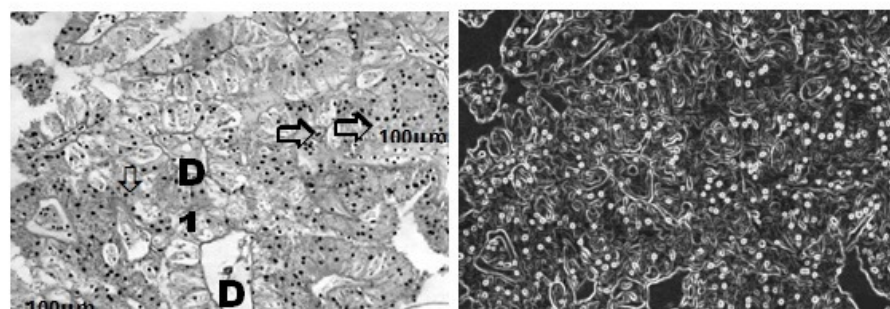


Figura 10. Órgão arborescente de *Holothuria grisea* expostas a concentração $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ de SnCl_4 . A: **D1** = Ducto em corte transversal. B: Processamento de imagem para evidênciação da delimitação de componentes celulares e teciduais. No epitélio dos túbulos do órgão observar: 1) a hialinização do citoplasma das células epiteliais (); 2) as formas vacuolares no polo basal celular (); 3) acentuada dilatação dos ductos. Coloração com HE. Fotomicrografia ao M.O. 100 X.

As holothurias expostas à solução de concentração $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de SnCl_4 , apresentaram alterações importantes em seus órgãos arborescentes, como pode ser

observado na figura 8. O tecido apresenta alterações importantes como a presença de alguns vacúolos no polo basal das células e acentuada dilatação dos ductos.

O órgão arborescente de *H. grisea* expostos a concentração de 0,6 mg L⁻¹ de SnCl₄ apresentaram perceptível deteriorização dos tecidos quando comparados a menor concentração utilizada (0,3 mg L⁻¹ de SnCl₄). Como pode ser observado na figura 9, as alterações correspondem a hidrólise em algumas regiões do órgão arborescente, formação de vacuolos nos pólos basais da célula assim como acentuada dilatação dos ductos.

Após exposição a concentração 0,9 mg L⁻¹ de SnCl₄ foi possível observar os mesmos efeitos que ocorreram nas concentrações anteriores, como vacúolos no pólo basal das células e acentuada dilatação dos ductos. Entretanto, nesta concentração é possível perceber hialinização do citoplasma das células epiteliais (Figura 10).

6 DISCUSSÃO

Ao estabelecer o equinoderma *Holothuria grisea* como bioindicador para o presente estudo, foi constatado a não existência na literatura de qualquer informação sobre ação de estanho na forma inorgânica. Nas poucas publicações onde se emprega holothurias como bioindicador de elementos-traço, a maior parte dos testes utilizam o processo estático e a solução contendo o metal, aparentemente, tem sua concentração reduzida diante da elevada quantidade de areia eliminada do intestino pelo equinodermo. No início da presente pesquisa ficou estabelecido o uso do processo semi-estático para a exposição dos organismos às soluções do ensaio, este método visa manter a concentração total do contaminante biodisponível, evitando adsorção do elemento-traço pelo sedimento. Esse processo realiza trocas a cada 24 horas, o que permite a redução dos metais associados ao sedimento, resultando em uma concentração constante em solução. Ao longo das 96 horas do bioensaio, não foram observadas nenhuma alteração nos indivíduos, como evisceração ou diferença comportamental.

O ambiente experimental foi rigorosamente controlado em relação à temperatura (25°C), fotoperíodo e aeração dos aquários. A água coletada para as trocas diárias também foi monitorada *in situ*, como pode ser observada na Tabela 1. Os dados demonstram que ao longo do tempo experimental, não houve alterações significativas nos parâmetros físico-químicos, de forma a interferir nos resultados obtidos. O mesmo procedimento para estudos *in vitro* desenvolvidos com diversos invertebrados marinhos, foram relatados por Company, *et al.*, (2006) e Molesh *et al.*, (2006).

A exposição dos exemplares de *H. grisea* ao SnCl₄ causou alterações na resposta das enzimas relacionadas às defesas antioxidantes do organismo.

Resultados semelhantes foram detectados em outros invertebrados marinhos (Chandran *et al.*, 2005; Jing *et al.*, 2006). Além disso, estudos relativos à bioacumulação de metais pesados foram reportadas para bivalves e crustáceos (Martín-Díaz *et al.*, 2005; Firat *et al.*, 2008; Templeman & Kingsford, 2010), e também para órgãos arborescente e músculo longitudinal, de pepinos-do-mar (Xing & Chia, 1997). Cabe ressaltar que estudos sobre estresse oxidativo em *H. grisea*, em resposta ao SnCl₄, não são conhecidos na literatura.

6.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE

A inibição da atividade enzimática expostas às diferentes concentrações de SnCl_4 , como ocorreu em tecidos de *H. grisea*, também é relatada em outros organismos aquáticos. Um exemplo é a exposição do bivalve *Bathymodilus azoricus* ao estanho, cobre e mercúrio, cuja resposta foi redução da atividade da SOD, tanto citoplasmática quanto mitocondrial, nas brânquias do organismo (Company *et al.*, 2004). Os autores observaram ainda inibição significativa na SOD extraída do manto de organismos após exposição ao estanho (Company *et al.*, 2006).

No presente estudo, a grande preocupação foi em relação às concentrações a serem utilizadas. A saída foi fazer uso de concentrações semelhantes aos descritos na literatura para outros organismos, além de ser considerado as exposições para outros metais desenvolvidas em nosso laboratório. Nesse caso, concentrações mais elevadas alteraram sobremaneira o tecido epitelial, sinalizando para o uso de concentrações menores. Ao ser considerado a não mortalidade, foi optado em fazer uso de concentrações menores àquelas que resultaram em lesões de pele. Mesmo assim, pode ser sugerido que em concentrações menores ocorreria uma ativação enzimática, já que a resposta para a menor concentração $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, resultou em inibição. Outro fator importante é a concentração presente no ambiente que pode chegar aos valores utilizados no presente estudo.

Apesar das diferentes respostas da enzima aos efeitos de contaminantes, os resultados em *H. grisea* não estão em desacordo com os observados em outros estudos, uma vez que grande número de invertebrados expostos a elementos-traço apresentou redução significativa na atividade da enzima (Chandran *et al.*, 2005; Company *et al.*, 2006; Vutukuru *et al.*, 2006; Jing *et al.*, 2006).

Em relação aos órgãos de *H. grisea*, as diferenças encontradas nas respostas aos metais pesados podem estar relacionadas às funções fisiológicas específicas de cada tecido, que responde de forma particular ao estresse oxidativo, como proposto por Company e colaboradores (2006) ao estudarem enzimas antioxidantes em bivalve *Bathymodilus azoricus*.

Além disso, a bioacumulação de elementos-traço pode variar em cada tipo de tecido ou ainda, em cada organismo indicador, como avaliado no trabalho de Firat e colaboradores (2008). Os autores utilizaram fígado, brânquias e músculos de caranguejo *Charybdis longicollis* e de camarão *Penaeus semisulcatus* para determinar a bioacumulação de diversos elementos-traço. Essa variação pode

também ocorrer em *H. grisea*, uma vez que concentrações de cobre e zinco foram detectadas em órgão arborescente e músculo longitudinal de *H. leucospilota* (Xing & Chia, 1997). Além disso, outros metais também foram acumulados em tecido eviscerado de *H. mexicana*, como descrito por Laboy-Nieves & Conde (2001).

A bioacumulação de estanho interfere também na característica histológica dos tecidos, como comprovado por Martín-Díaz e colaboradores (2005), que demonstraram danos histopatológicos graves em glândulas digestivas, e brandos em gônadas do bivalve *Ruditapes philippinarum*.

No presente estudo, as concentrações de SnCl₄ utilizadas provocaram reduções significantes na atividade da SOD após 96 horas de exposição, como pode ser constado nos resultados obtidos. Quando o organismo, como um todo, é analisado, observa-se diferenças entre os vários tecidos analisados.

Em relação ao intestino, os resultados permitem supor que o maior percentual inibitório observado, esteja relacionado às suas características absorptivas, considerando a concentração constante do contaminante ao longo do tempo do bioensaio.

Outra razão pode estar relacionada à total excreção do sedimento contido no intestino, o que expõe o órgão à sua maior capacidade de captação de nutrientes. Esta suposição está embasada nos dados de bioacumulação de cobre em tecido visceral de *H. mexicana*, no qual a concentração do metal foi 1.323,2 ppm (Laboy-Nieves & Conde, 2001), superior aos outros metais estudados.

No presente estudo, os resultados comprovaram a redução da atividade específica da SOD nos tecidos, o que permite supor que a concentração do SnCl₄ foi responsável pela elevada formação de radicais livres, que inviabilizou a capacidade defensiva da SOD. Esses resultados são coerentes com os descritos por Berrahal e colaboradores (2007) ao estudarem o efeito do metal em vertebrados.

As gônadas assim como o músculo, foram os tecidos que apresentaram maior capacidade inibitória em resposta ao SnCl₄, como pode ser observado na Figura 5.

Ao se considerar que a SOD é uma enzima que apresenta íons de ferro, cobre e zinco na sua estrutura, é possível supor que a ação do estanho, no processo inibitório, esteja relacionada à perda dos íons estruturais pela competição com o estanho, o que resultaria na mudança conformacional da proteína (Huang *et al.*, 2006). Outra característica da inibição poderia estar relacionada à substituição dos íons de ferro e do cobre, que por sua vez, seriam responsáveis pela geração de

radicais livres, comprometendo as defesas antioxidantes dos tecidos (Company *et al.*, 2004).

Resultados semelhantes foram detectados em manto de bivalve *Bathymodiolus azoricus* após exposição a concentrações do metal (Company *et al.*, 2006).

As diversas respostas distintas causada pela ação de cada metal podem ser justificadas pela diferença tanto no mecanismo de defesa em relação ao metal como no combate às espécies reativas de oxigênio.

A sensibilidade da enzima aos contaminantes ambientais tem sido relatada em diversos estudos, porém cabe ressaltar que a atividade da SOD, em alguns organismos, permaneceu inalterada, como a exposição do bivalve *Adamussium colbecki* ao cobre e mercúrio, cuja atividade nas glândulas digestivas permaneceu semelhante ao controle (Regoli *et al.*, 1998). Outros exemplo está descrito no estudo desenvolvido em tecido hepático e eritrócitos do peixe *Brycon amazonicus*, expostos a contaminação por fenol (Avilez *et al.*, 2008).

6.2 CATALASE

Estudos desenvolvidos em *H. grisea* demonstraram inibição da atividade da CAT, em todos os tecidos isolados, resposta semelhante ao descrito para outros invertebrados marinhos expostos a concentrações de outros elementos-traço (Regoli *et al.*, 1998; Company *et al.*, 2004).

A inibição observada no intestino foi significativa e na ordem 51% como apresentado na Figura 6. Essa redução da atividade específica pode estar associada ao estresse oxidativo, causado pelos elementos-traço, como descritos por Company e colaboradores (2006). A ação dos metais nas membranas celulares é a peroxidação dos lipídeos, formando as espécies reativas do oxigênio, e a formação de peróxido de hidrogênio, que dependendo da concentração, é capaz de inibir a atividade da catalase, tanto em invertebrados (Regoli *et al.*, 1998; Company *et al.*, 2004), como em vertebrados (Bainy *et al.*, 1996; Vutukuru *et al.*, 2006).

O presente estudo confirmou a ação do SnCl₄ sobre a catalase dos tecidos avaliados, com redução nas atividades específicas. Como descrito nos resultados, os tecidos que apresentaram maiores percentuais de inibição foram: músculo, órgão arborescente e gônadas. Quando comparado aos valores observados para a SOD, é

possível comprovar respostas semelhantes em que ambas as enzimas apresentaram elevado percentual de inibição quando comparada aos outros tecidos.

A inibição da CAT em órgão arborescente, músculos e intestino pode estar relacionado a facilidade de absorção e acumulação do metal, como descrito por Jing e colaboradores (2007) ao comprovarem a presença de metais em glândulas digestivas e brânquias do bivalve *Pinctada fucata*. Além disso, a bioacumulação do estanho é também relatado em outros organismos (Firat *et al.*, 2008), inclusive em peixes capturados na baía de Vitória (Joyeux *et al.*, 2004). Outro fator importante para a redução da atividade enzimática da CAT pode estar relacionado à resposta inibitória da SOD, considerando a existência de um sinergismo entre ambas como demonstrado por Kono e Fridovich (1982).

Apesar dos efeitos observados no presente estudo, concentração de 10 μmol do metal não foi capaz de alterar significativamente a atividade catalásica em *Oreochromis niloticus* (Atli & Canli, 2007). Concentrações menores, como 1 ppm, não resultaram em valores significativos como descrito por Dafre e colaboradores (2004) ao estudarem intestino de *Perna perna*.

A catalase isolada de outros invertebrados foi também sensível ao metal como descrito por Company *et al.*, (2004); Chandran *et al.*, (2005) e Company *et al.*, (2006). Uma possibilidade para a inibição da atividade da CAT observada em *H. grisea*, pode ser o aumento excessivo de radicais livres resultantes da peroxidação lipídica. Além disso, os radicais livres gerados pelo metal pode promover a redução no processo de transcrição do mRNA que codifica a enzima, como comprovado por Woo e colaboradores (2009). Os autores estudaram o efeito da concentração de 1000 ppb de Cd em peixes com resultado de 50% na redução da expressão gênica no fígado.

Vários autores relataram diferenças no perfil inibitório ou de ativação da enzima e caracterizaram a ativação quando o indivíduo é estudado *in situ*, como os descritos para poliquetas *Hediste diversicolor* expostos ao sedimento contaminado de áreas estuarinas (Moreira *et al.*, 2006) ou em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos aos remobilizados químicos da coluna d'água durante operações de dragagem em área portuária (Bocchetti *et al.*, 2008).

Entretanto, a resposta foi contraditória para alguns indivíduos ensaiados *in vitro*, já que a CAT apresentou elevação na atividade catalítica, como no ensaio com Oligoquetas da espécie *Tubifex tubifex* expostas ao cobre (Mosleh *et al.*, 2006), ou

ainda em peixes, expostos ao cobre e mercúrio (Vieira *et al.*, 2009) e ao cádmio e estanho (Atli & Canli, 2007).

Tanto a CAT como a SOD de *H. grisea* apresentaram respostas que caracterizaram cada tecido analisado. A inibição foi mais significativa em músculo, órgão arborescente e gônadas. As diferenças nas respostas antioxidantes permitem supor a ordem de ação e a sensibilidade de cada tecido. Ferreira-Cravo e colaboradores (2009) descreveram variações na atividade da CAT nas diferentes regiões anatômicas do poliqueta *Laeonereis acuta* exposto ao cobre. Esses resultados sugerem maior concentração dos contaminantes nos tecidos moles que, na maioria das vezes, perdem a capacidade natural de defesa resultando na inibição da atividade de enzimas, importantes na manutenção da vida.

6.3 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

A reduzida atividade enzimática detectada somente em órgão arborescente sugere diferenças no padrão de defesa do organismo, uma vez que a atividade da SOD e CAT foram superiores em todos os tecidos estudados em *H. grisea*. Além disso, esses resultados sugerem a existência de outros mecanismos de defesas na Fase II do processo de estresse oxidativo, uma vez que a detoxificação pela GST nos organismos marinhos está relacionado às diferentes formas evolutivas da enzima como descrito por Armstrong (1997), Salinas & Wong (1999) e referendado por Blanchette e colaboradores (2007). Os autores descreveram a relação evolutiva entre as formas Sigma, Alfa, Mu, Pi, das quais a forma Sigma, menos evoluída, é a presente na maioria dos invertebrados marinho.

O órgão arborescente na *H. grisea*, corresponde às brânquias e aos pulmões de outros organismos, e pelo fato do órgão ficar em contato com a água, é capaz de promover a bioacumulação de substâncias ali presentes, como descrito por Xing & Chia (1997) assim como ocorre em brânquias de bivalves *Pinctada fucata* (Jing *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos demonstraram conformidade com vários autores que relatam, *in vitro*, a redução na atividade da GST em invertebrados marinhos quando expostos a elementos-traço, como os bivalves da espécie *Adamussium colbecki*, expostos a metais (Regoli *et al.*, 1998).

A inibição causada pelo SnCl₄, em órgão arborescente de *H. grisea*, pode ser resultado da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, que interagem

com a GSH, parte integrante do mecanismo de defesa. Esta interação resulta na formação de complexos, considerando a capacidade da molécula em se ligar aos metais, ou ainda resultar na oxidação da GSH. Em ambos os casos, com a depleção do substrato, a resposta é o efeito inibitório da enzima (Regoli *et al.*, 1998). Efeitos semelhantes foram relatados em oligoquetas *Tubifex tubifex* (Mosleh *et al.*, 2006) e gastrópodes *Nucella lapillus* (Cunha *et al.*, 2007).

Entretanto, muitos autores descreveram o aumento na atividade da GST, como os relatados por Ferreira-Cravo e colaboradores (2009) em poliquetas, apesar da atividade enzimática ter retornado ao normal após 15 dias da exposição ao metal, o que demonstra o desenvolvimento de resistência do organismo à presença do cobre no ambiente do bioensaio.

A redução na atividade específica da GST, por sua vez, pode estar relacionada ao excesso de radicais livres induzidos pelo metal. Além disso, o estanho apresenta capacidade de interagir facilmente com grupamentos sulfidrilas da cadeia polipeptídica de aminoácidos formadores da proteína, o que promove a desconformação da enzima e, por conseguinte, a redução em sua atividade (Company *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006).

Esta inibição também pode estar relacionada aos transtornos resultantes da acumulação do metal no tecido, o que desencadeia o processo oxidativo da GSH (Iscan *et al.*, 1995; Cunha *et al.*, 2007). Outro aspecto da inibição a ser focado, é a capacidade de ligação do estanho às cadeias laterais dos aminoácidos formadores da proteína enzimática (Company *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006).

Em termos gerais, um conjunto de fatores pode contribuir para as diferenças nas respostas enzimáticas observada quando os organismos são expostos aos agentes contaminantes, como proposto por Vieira e colaboradores (2009). Entre os fatores estão: a espécie estudada, as propriedades da enzima isolada de cada tecido, o tipo de estudo, as condições experimentais, o tempo e a intensidade de exposição, a estrutura química dos compostos, dentre outros. Por esse motivo, a variação da resposta da enzima é característica de cada espécie, como sugerido por Jing e colaboradores (2006).

A redução na atividade da enzima induzida pelo SnCl_4 , como observado no presente estudo, pode estar relacionada aos vários danos provocados pelo metal. Quando o excesso de radicais livres nos tecidos ultrapassa a capacidade natural de defesa dos organismos vivos, o efeito é a redução na atividade das enzimas antioxidantes (Almeida *et al.*, 2002; Chandran *et al.*, 2005; Vutukuru *et al.*, 2006).

6.4 GLUTATIONA REDUTASE

A principal característica da GR é a capacidade de resposta ao agente impactante, na forma de adaptação ao stress induzido por poluentes (Di Giulio *et al.* 1989). A resposta do organismo a esta exposição, é determinada pelo equilíbrio dinâmico que envolve o processo de captação e sua depuração (Alvarez *et al.* 2008).

No presente estudo, a redução da atividade da GR após exposição ao estanho corrobora com resultados de outros autores que descrevem alterações no metabolismo da glutatona e inativação de enzimas que apresentam grupos tiol em suas estruturas, como é o caso da glutatona redutase (Huang *et al.*, 2006).

Outro fator importante é a indução da síntese de fitoquelatinas pelo estanho. Como o GSH é o precursor das fitoquelatinas, o seu nível celular tende a diminuir após exposição do organismo ao contaminante (Gallego *et al.*, 1996).

Segundo Jemec, A., *et al.*, (2007) alterações na atividade específica da GR após exposição do organismo a concentrações de Sn, esta relacionada a capacidade do metal em substituir o co-fator da enzima, o que a torna incapaz de se ligar ao substrato gerando uma inibição significativa.

Vários autores descreveram respostas similares para a GR, com expressivos percentuais de inibição quando exposta a diversas substâncias como Cd, Pb, Cu e Fe (Regoli *et al.*, 1988; Huang, 2005).

6.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Nos últimos anos, a utilização de marcadores histológicos tem sido intensificada devido aos resultados obtidos após exposição de organismos aos ambientes impactados (Bernet *et al.*, 1999; Costa, 2009).

Esses biomarcadores apresentam como vantagens, a utilização de órgãos específicos, como brânquias, rins e fígado, responsáveis por funções vitais de respiração, excreção e detoxificação. Além disso, todas as alterações estruturais, encontradas nesses órgãos, são de fácil identificação (Camargo e Martinez, 2007).

O órgão arborescente, responsável pelo processo respiratório do organismo, é o que apresenta maior contato com o meio externo e sofre toda a ação de contaminantes presentes na água (Wong e Wong, 2000).

Segundo Mallatt (1985), uma das principais alterações estruturais em órgão de superfície respiratória, causadas pela exposição aos diferentes metais, é o

aparecimento de edema nos epitélios lamelar e filamentar. No presente estudo foi observado danos na estrutura morfológica do órgão arborescente como dilatação dos ductos e vacuolização nas células. Estes danos podem ser causados por acúmulo de secreções celular ou água. No entanto, a vacuolização é uma resposta inespecífica e comum a diversos compostos químicos como descrito por Lião *et al*, (2006).

A dilatação do eixo vascular das lamelas conduziu, por vezes, à ruptura das células pilares com perda da sua capacidade de suporte, levando ao aparecimento dos aneurismas lamelares. Resultados similares foram observados por Thophon *et al*. (2003) em *L. calcarifer* expostos ao cádmio. Por outro lado, quando se descreve efeito de metais em brânquias de vários organismos, autores consideram que estas modificações estejam relacionadas a resposta do organismo, como meio de reduzir a ação dos poluentes. Um comportamento descrito é a formação de vacúolos, dilatação dos filamentos branquiais, atrofia e hipertrofia desses tecidos (Laurent e Perry, 1991). Pelo fato de não existir nenhuma pesquisa da ação de metais em *Holothuria grisea*, é necessário estudos complementares a fim de caracterizar esses efeitos como ação maléfica dos metais ou como resposta de defesa do organismo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os indivíduos de *H. grisea* apresentaram boa resistência quando ensaiadas em presença de SnCl_4 *in vitro*, apesar da inibição na atividade de enzimas de defesa nos tecidos estudados os indivíduos não evisceraram. O órgão arborescente foi o tecido que apresentou a maior atividade da SOD e CAT, além de ser o único tecido em *H. grisea* que apresenta atividade da glutathiona-S-transferase. Dentre as concentrações utilizadas, a de $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ promoveu maiores percentuais de inibição na atividade da SOD, CAT, GST e GR em todos os tecidos.

O maior percentual de inibição para todas as enzimas ocorreu no músculo com 65% para CAT, 84% para SOD, 58% para GST e 70% para GR.

Entretanto, A SOD foi a enzima que apresentou maiores inibições mesmo na menor concentração do poluente com 25% para o. arborescente, 27% para intestino e 32 % tanto para gônadas quanto para músculo.

Dentre os marcadores estudados a SOD foi a que apresentou maiores valores de inibição mesmo em baixas concentrações, mostrando ser um marcador de poluição por Sn de grande sensibilidade.

As análises histológicas demonstraram alterações quando ensaiadas na presença do Sn, entretanto como não existe na literatura qualquer pesquisa que relate efeitos de poluentes em órgão arborescente de *Holothuria grisea*, se faz necessário mais estudos a fim de melhor compreender se estas alterações são efeitos deletérios da exposição ou uma resposta defensiva do organismo.

Com os dados obtidos no estudo, pode-se concluir que o equinoderma *H. grisea* pode ser utilizado como bioindicador de poluição por Sn em programas de monitoramento ambiental, uma vez que os marcadores bioquímicos utilizados apresentaram sensibilidade às exposição ao SnCl_4 .

8 REFERÊNCIAS

Adams, S.M. 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 333-353.

Aebi, H., .1984. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology** 105:121-126.

Alves SRC, Severino PC, Ibbotson DP, Silva AZ, Lopes FRAS, Sáenz LA & Bainy ACD. 2002. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marine Environmental Research** 54:241-245.

Armstrong, R N. 1997. Gluthatione tranferases. In guengerich F. P. *Comprehensive Toxicology Biotrasnformation*. **Elsevier science**, Oxford. P. 307-327

Atli G & Canli M. 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 145:282-287.

Avilez IM, Hori TSF, Almeida LC, Hackbarth A, Bastos Neto JC, Bastos VLFC & Moraes G . 2008. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and physiology Part C** 148:136-142.

Bainy, A.C.D.; Saito, E.; Carvalho, P.S.M.; Junqueira, V.B.C. 2000. Cholinesterase activity in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, 34: 151-162.

Bainy ACD, Saito E, Carvalho PSM & Junqueira VBC. 1996. Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology** 34:151-162.

Berrahal, A.A.; Nehdi, A.; Hajjaji, N.; Gharbi, N.; El-Fazâa, S. 2007. Fosfatase activities and in adult rat treated with lead. **Comptes Rendus Biologies**, 330: 581-588.

Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J Fish Dis** 22:24-35

Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L. 2004. Bioquímica. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Hart I, Vincent A, Willison H. Neuromyotonia and antiganglioside-associated neuropathies. In: Engel AG, editor. Myasthenia gravis and myasthenic disorders. New York: **Oxford University Press**; 1999. p. 229–50.

Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J Fish Dis** 22:24-35

Bertin G & Averbeck D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie** 88:1549-1559

Beutler, E. 1975. **A manual of biochemical methods**, Grune & Straton, New York.

Blanchette, B., Feng, X., Singh, B.R., 2007. Marine glutathioneS-transferases. **Mar. Biotechnol.**23, 513–542.

Bocchetti, R.; Fattorini, D.; Pisanelli, B.; Macchia, S.; Oliviero, L.; Pilato, F.; Pellegrini, D.; Regoli, F. 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. **Aquatic Toxicology**, 89: 257-266.

Cajaraville, M.P., Babianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coast environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci. Total Environment**, 247: 295-311.

Camargo, M.M.P.; Martinez, C.B.R. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v.5, n.3, p.327-336.

Carletti E, Sulpizio M, Bocciarelli T, Boccio PD, Federici L & Di Ilio C. 2008. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology** 90:48-57.

Chandran R, Sivakumar AA, Mohandass S & Aruchami M. 2005. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology Part C** 140:422-426.

Company, R., Serafim, A., Cosson, R., Camus, L., Shillito, B., Fiala-Medioni, A., Babianno, M.J., 2006. The effect of cadmium on antioxidant responses and the susceptibility to oxidative stress in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. **Mar. Biol.** 148, 817–825.

Cunha, I.; Mangas-Ramirez, E.; Guilhermino, L. 2007. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 145: 648-657.

Dafre, A.L., Medeiros, I.D., Müller, I.C., Ventura, E.C., Bainy, A.C.D., 2004. Antioxidant enzymes and status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. **Chem. Biol. Interact.** 149, 97–105.

Di Julio, Stephen, A P. Yi-pin, L. MacLean, E. 1989. Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to tert-butyl hydroperoxide. **Aquatic toxicology.** V. 46 p. 231-240.

Farmen, E., Olsvik, P.A., Berntssen, M.H.G., Hylland, K., Tollefsen, K.E., 2010. Oxidative stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes exposed to pro-oxidants and a complex environmental sample. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** 151, 431–438.

Ferreira-Cravo, M., Reinhardt Piedras, F., Moraes, T.B., Ferreira, J.L.R., Salomão, D.P.F., Dornelles Machado, M., Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., 2007. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). **Chemosphere** 66, 1367–1374.

Ferreira-Cravo M., Ventura
Lima J., Sandrini J.Z., Amado L.L., Geracitano L.A., Rebelo M., Bianchini A., Monserrat J.M. 2009. Antioxidant responses in different body regions of the polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae) exposed to copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety** ;72:388-393

Firat, Ö.; Gök, G., Çogun, H.Y.; Yuzeroglu, T.A.; Kargin, F., 2008. Concentrations of Cr, Cd, Cu, Zn and Fe in crab *Charybdis longicollis* and shrimp *Penaeus semisulcatus* from the Iskenderun Bay, Turkey. **Environmental Monitoring Assess**, 147: 117-123.

Firat Y, Kizilay A, Ozturan O and Ekici N. 2008. Experimental otoacoustic emission and auditory brainstem response changes by stellate ganglion blockage in rat. Am. **J. Otolaryngol.**, 29: 339-345

Frias, I.; Caldeira, M.T.; Perez, C.J.R.; Navarro, A.J.P.;Culianez, M.F.A.; Kuppinger, O.; Stransky, H.;Pages, M.; Hager, A. & Serrano, R. 1996. A major isoform of the maize plasma membrane H⁺ -ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. **Plant Cell**, 8:1533-1544.

Flohé L & Ötting F. 1884. Superoxide Dismutase Assays. Methods in **Enzymology** 105:93-94.

Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. 1999. Effect of cadmium ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. **Biol. Plant.** 42:49–55.

Geller, B. L. & Winge, D. R. 1984. Subcellular distribution of superoxide dismutases in rat liver. **Methods in Enzymology** 105,105–114.

Golovanova IL. 2008. Effects of heavy metals on the physiological and biochemical status of fishes and aquatic invertebrates. **Inland Water Biol**;1:93-101.

Gondim, A.I., Lacouth, P., Alonso, C. & Manso, C.L.C. 2008. Echinodermata da Praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil. Biota Neotrop.(2): <http://www.biotaneotropica.org.br/v8n2/pt/abstract?inventory+bn02408022008> (último acesso em 19/12/2012)

Gravato C., Guimarães L., Santos J., Faria M., Alves A. and Guilhermino L. 2010. Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow cels

(*Anguilla Anguilla*) from the estuaries of Minho, Lima and Douro Rivers (NW Portugal) **Ecotox. Environ. Safe.** 73, 524-533.

Habig, W. pabsl, N. J. & Jacoby, W. B. 1974. **Jornaul of Biological Chemistry.** 249. 7130-7139.

Hansen BH, Romma S, Garmo A, Olsvik PA & Andersen RA. 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 143:263-274.

Huang, G.F.; Wu, Q.T.; Wong, J.W.C. & Nagar, B.B. 2006. Transformation of organic matter during co-composting of pig manure with sawdust. **Biores. Technol.**, 97:1834-1842.

Huang Z, Wen Y, Shandilya R, Marks JR, Berchuck A, Murphy SK. 2006. High throughput detection of M6P/IGF2R intronic hypermethylation and LOH in ovarian cancer. **Nucleic Acids Res** 34: 555

Huber PC & Almeida WP. 2008. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova** 31:1170-1179

Iscan M, Coban T, Eke BC, Iscan N. 1995. Differential responses of hepatic monooxygenases and glutathione S-transferases of mice to a combination of cadmium and nickel. **Comp Biochem Physiol**

Ivanina AV, Habinck E & Sokolova IM. 2008. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*

Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:72-79.

Jing, G.; Li, Y.; Xie, L.; Zhang, R. 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**.

Joyeux J-C, Pereira BB, Almeida HG. 2004. The flood-tide ichthyoplanktonic community at the entrance into a Brazilian tropical estuary. **J. Plankton Res.**, 26: 1277-1287.

Kono, Y. & I. Fridovich. 1982. Superoxide radical inhibits catalase. **J.Biol. Chem.** 257, 5751–5755.

Laboy-Nieves, E.N.; Conde, J.E. 2001. Metal levels in eviscerated tissue of shallow-water deposit-feeding holothurians. **Hydrobiologia**, 459: 19-26.

Langenbach, T. & Sarpa, M. 1985. Teor de cádmio e estanho nos fertilizantes fosfatados brasileiros. **R. Bras. Ci. Solo**, 9:179-181.

Laurent, P.; Perry, S.F. 1991. Environmental effects on fish gill morphology. **Physiol. Zool.**, Chicago, v.64, p. 4-25.

Lehninger AL, Nelson DL & Cox MM. 1995. Princípios de Bioquímica. 2.ed. São Paulo: **Savier**.

Leroy C, Delbarre C, Ghillebaert F, Compere C, Combes D. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium.

Biofouling. 2008.. Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. **Planta** 1997;203:213–21.

Livingstone, D. R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, 57: 195-211.

Lowry, O.H.; Rosembrough, N.J.; Farr, A.L. 1951. Protein measurement with pholin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193: 265-275.

Mallat, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and others irritants: a statistical review. Can. **J.Fish.Aquat.Sci.**, v. 42, p. 630-684.

Martín-Díaz, L.M., Villena-Lincoln, A., Lamber, S., Blasco, J., Delvalls, T.A., 2005. An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. **Chemosphere** 58, 615–626.

Martín-Díaz, M.L.; Blasco, J.; Canales, M.G.; Sales, D.; DelValls, T.A., 2005. Bioaccumulation and Toxicity of Dissolved Heavy Metals from the Guadalquivir Estuary After the Aznalcólar Mining Spill Using *Ruditapes philippinarum*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 48: 233-241.

McCord JM & Fridovich I. 1969. Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry** 244:6049-6055.

Mendes, F. Marenzi, A W. Domenico, M D. 2006. Population patterns and seasonal observations on density and distribution of *Holothuria grisea* on the Santa Catarina coast, Brazil. **Beche-de-mer iformation Bulletin** 23- February.

Montserrat JM, Lima JV, Ferreira JLR, Acosta D, Garcia ML, Ramos PB, Moraes TB, Santos LC & Amado LL. 2008. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:287-292.

Moreira, M. S. et al. 2006. Resistência De Buva (*Conyza Canadensis*) Ao Herbicida Glyphosate Em Pomares De Citros No Estado De São Paulo.. Brasília. Resumos... Londrina: **Sociedade Brasileira Da Ciência Das Plantas Daninhas**, P. 554-555.

Mosleh, Y.Y.; Paris-Palacios, S.; Biagianti-Risbourg, S. 2006. Metallothioneins induction and enzymatic activity response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. **Chemosphere**, 64: 121-128.

Nicholson S & Lam PKS. 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarker in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). **Environment International** 31:121-132.

Nowakowska, A., Swiderska-Kolacz, G., Rogalska, J., Caputa, M., 2009. Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation. **Comp. Biochem. Physiol., Part C** 150, 481–486.

Pinto, R.E. & Bartley, W. 1969. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. **Biochem. J.**, 112,109.

Putt, F. A. 1948. **Manual of histopathological staining method**. New York: John Wiley.

Regoli,F., Nigro,M., Orlando,E., 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the antartic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquatic Toxicology**. 40, 375-392.

Ruppert, E. E.; Fox, R. S.; Barnes, R. 2005. Zoologia dos invertebrados :uma abordagem funcional-evolutiva. 7. ed. **São Paulo**: Roca.

Salinas, A.E. & Wong, M.G. 1999. Glutathione S-transferases a review. **Current Medicinal Chemistry**, 6, 279-309

Schäfer, G.; Gen, N.V.P.; Sartori, I.A.; Schwarz, S.F.; Koller, O.C. 2001. Produção e desenvolvimento da tangerineira-‘montenegrina’ propagada por enxertia e estaquia, no rio grande do sul. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP**, v. 23, p. 668-672.

Sheehan, D., & Power, A. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusks. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 123, 193–199.

Sies, H., Stahl, W. 1995. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62,n.6, p.1315-1321.

Takashi, M. et al. 2005. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, 436: 793-800

Thophon, S.; Kruatrachue, M.; Upatham, E.S. et al. 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environ. Pollut.**, v.121, p.307-320.

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M & Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 64:178-189.

Ventura EC, Gaelzer LR, Zanette J, Marques MRF & Bainy ACD. 2002. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted Pig fish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. Marine **Environmental Research** 54:775-779.

Vieira, L.R.; Gravato, C.; Soares, A.M.V.M.; Morgado, F.; Guilhermino, L. 2009. Acute effects of copper and cadmium on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior. **Chemosphere**, 76: 1416-1427.

Vutukuru, S.S.; Chintada, K.R.M.; Rao, J.V.; Anjaneyulu, Y. 2006. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase, cholinesterase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 32: 221-229.

Wepener; J.H.J. van Vuren; F.P. Chatiza; Z. Mbizi; L. Slabbert; B. Masola. 2005. Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**. V30: 751–761.

Woo, S.; Yum, S.; Park, H.S.; Lee, T.K.; Ryu, J.C. 2009. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 149: 289-299.

Wong, C.K.; Wong, M.H. 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicol.**, v.48, p.517-527.

Xing, J & F.S. Chia. 1997. Heavy metal accumulation in tissue/organs of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota*. **Hydrobiologia**, 352: 17–23.

Zanette J, Nunes FF, Medeiros ID, Siebert MN, Mattos JJ, Lüchmann KH, Melo CMR & Bainy ACD. 2008. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Researc** 66:196-198.