



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Eduardo dos Santos Silva

**Carboxilesterase na adaptação do metabolismo de lipídios do pacu à  
hipoxia**

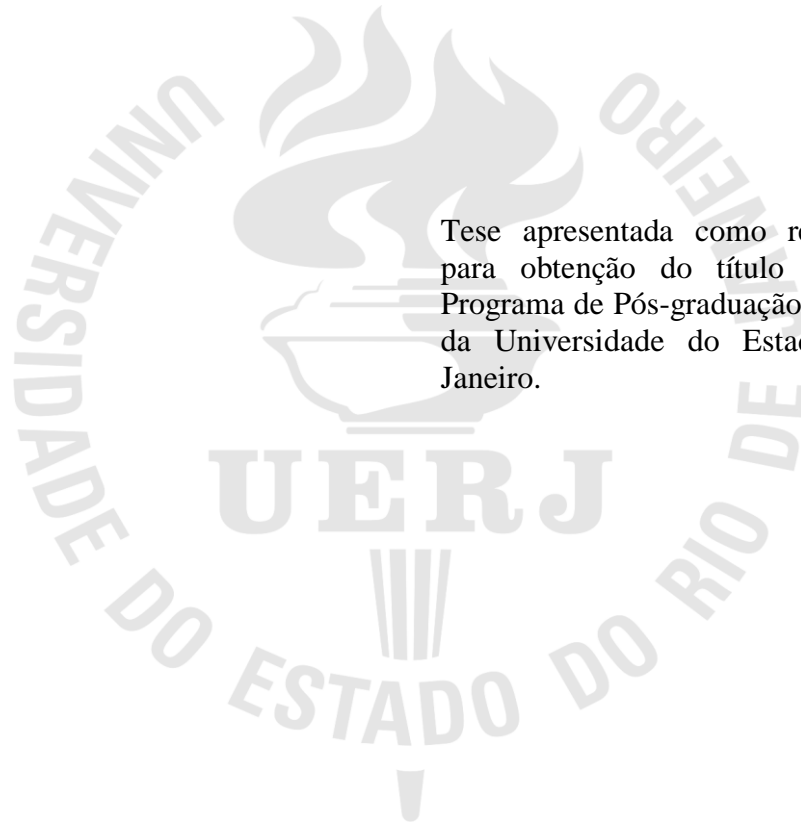
Rio de Janeiro

2013

Eduardo dos Santos Silva

**Carboxilesterase na adaptação do metabolismo de lipídios do pacu à hipoxia**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.



Orientador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Eduardo dos Santos.  
Carboxilesterase na adaptação do metabolismo de lipídios do pacu à hipóxia. / Eduardo dos Santos Silva. – 2013.  
74 f.

Orientador: Jayme da Cunha Bastos Neto.  
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Pacu (Peixe) – Teses. 2. Carboxilesterase – Teses. 3. Lipídios – Metabolismo – Teses. 4. Hipóxia Celular. I. Bastos Neto, Jayme da Cunha. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III Título.

CDU 597.554.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Eduardo dos Santos Silva

**Carboxilesterase na adaptação do metabolismo de lipídios do pacu à hipoxia**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 01 de março de 2013.

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Jacyara Maria Brito Macedo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Georgia Correa Atella

Universidade Federal do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wagner Seixas da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de concluir mais uma importante etapa em minha vida.

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e acreditando nas minhas escolhas como educador e pesquisador. Amo vocês!

A Tayanne e sua família por todo o apoio e carinho.

Ao Prof. Jayme por me ensinar não apenas uma profissão, mas sim por mostrar-me como ser alguém melhor. Muito obrigado por ser um exemplo para mim.

A Prof.<sup>a</sup> Vera pelos conselhos sinceros e por todo apoio.

Ao meu pai Paulinho pelo apoio, pelos conselhos, pela preocupação, pela companhia e pelas intermináveis horas de engarrafamento na ponte Rio-Niterói.

Aos amigos Lin e Roosevelt pelo apoio, companheirismo, e indispensável ajuda com reagentes, matemática, artigos...

Aos meus amigos Aline e Rafael por todo apoio, dedicação e companheirismo. Foi uma experiência única aprender tanto com vocês.

As amigas Laís e Bruna pelo laço de amizade, pela alegria, apoio e companheirismo nas viagens e trabalhos.

Ao amigos Fred e Santiago pela alegria, música, viagem, apoio e discussões calorosas.

A todos os meus amigos de laboratório Artur, Bárbara, Carlucio, Isabela, Lauro, Manildo, Marta e Rojane pelos bons momentos, pelas indispensáveis ajudas e por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre.

Ao Beto, Gustavo, João Roberto, professores e alunos do Departamento de Bioquímica.

A tia Luci pelos biscoitos, bolos e preocupação.

Aos pescadores e ao senhor Luiz por ter disponibilizado o espaço e os peixes para a realização deste trabalho.

Começar é bom, continuar é ótimo e terminar é tudo.

*Madre Maria Helena Cavalcanti*

## RESUMO

SILVA, Eduardo dos Santos. *Carboxilesterase na adaptação do metabolismo de lipídios do pacu à hipoxia*. 2013. 74f. Tese Doutorado (Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Os peixes são vertebrados que vivem em vários habitats. Adaptações de sua fisiologia e de sua bioquímica são estudadas para entender como conseguem sobreviver aos desafios presentes em cada ambiente. A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água é um fenômeno natural cíclico em águas do Pantanal e da Amazônia. A crescente poluição antrópica dos rios da Amazônia e do Pantanal pode, somada à hipoxia, oferecer ameaça à permanência de muitas espécies de peixes. Ao estudarmos a carboxilesterase (CarbE), enzima importante para a biotransformação de xenobióticos, observamos que sua atividade diminuía em plasma de pacu, um peixe típico do Pantanal, mantido em hipoxia durante 42 horas. As carboxilesterases participam de inúmeras reações químicas no organismo, incluindo uma transesterificação capaz de produzir ésteres etílicos tóxicos de ácido graxo (FAEE, fatty acid ethyl esters) a partir de etanol e ésteres de ácidos graxos. Já que a diminuição da atividade de CarbE poderia ser uma vantagem, pois que o etanol (um produto da glicólise em peixes sob hipoxia) seria menos esterificado, resolvemos saber mais sobre a bioquímica da CarbE do plasma e do fígado de pacus. Os pacus foram submetidos à hipoxia por diminuição da concentração até 0,5 mg O<sub>2</sub>/L por meio de borbulhamento de nitrogênio na água. Os animais ficaram nessas condições por 42 horas, quando então coletamos sangue e retiramos seus fígados. A atividade de CarbE ensaiada foi 50% menor no soro e 25% menor nos microsomos de fígado se comparada com a de peixes sob 6 mg O<sub>2</sub>/L. A CarbE isolada do soro dos pacus em normoxia possui massa molecular relativa de 56.000. A eletroforese em gel desnaturante com a fração purificada rendeu três bandas, mas o gel nativo apresentou só duas bandas com atividades sobre  $\alpha$ -naftil acetato. Inferimos que mais do que uma isoforma da enzima está no plasma dos pacus. A CarbE isolada do soro não possui atividade de lipase sobre o Tween<sup>®</sup> 20, mas os microsomos dos fígados dos animais em normoxia e hipoxia possuem. No entanto, a CarbE possui atividade sobre acil-CoA assim como o microsomo de fígado. A enzima pura apresenta V<sub>máx</sub> três vezes maior e uma K<sub>M</sub> quatro vezes maior do que a atividade presente nos microsomos. Além disso, os microsomos do fígado dos pacus em normoxia podem hidrolisar acil-CoA com o dobro da velocidade daqueles em hipoxia. A atividade clássica de CarbE do soro foi inibida por 4-HNE a 4 mM. A atividade de acil-CoA dos microsomos de fígado também foi sensível a 4-HNE a 4 mM, enquanto 2 mM de 4-HNE inibiu metade desta atividade do soro.

Palavras-chave: Carboxilesterase. Pacu. Hipoxia.

## ABSTRACT

SILVA, Eduardo dos Santos. *Carboxylesterase in the adaptation of the metabolism of lipids in pacu under hypoxia*. 2013. 74f. Tese Doutorado (Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Fish are vertebrates that dwell in many habitats. Physiological and biochemical adaptations of fish are studied to understand how these animals endure the challenges present in each environment. Decrease in dissolved oxygen concentrations in water is a natural cyclic phenomenon in the Pantanal and Amazon watersheds. The growing anthropic pollution of rivers in Pantanal and Amazon can, added to hypoxia, threaten the permanence of several fish species. Studying carboxylesterase (CarbE), an important enzyme for xenobiotics biotransformation, we found that its activity drops in pacu, a typical fish of Pantanal, kept in hypoxia for 42 hours. Carboxylesterases take part in several chemical reactions in the organism, including a transesterification capable of producing toxic fatty acid ethyl esters (FAEE) from ethanol and fatty acid esters. As the decrease of CarbE activity could be beneficial, since ethanol — a product from glycolysis in fish under hypoxia — would be less esterified, we decided to know more about the biochemistry of CarbE from plasma and liver of pacu. Pacus were submitted to hypoxia by decreasing the concentration of oxygen up to 0.5 mg/mL by bubbling nitrogen in the water. Once these animals reached hypoxia they were maintained at 0.5 mg/mL of oxygen for 42 hours. After this time, blood was withdrawn and their liver excised. The classical activity of CarbE dropped over 50% in serum and 25% in liver microsomes compared to that from fish under 6 mg O<sub>2</sub> for 42 h. The CarbE was isolated from the serum of pacus in normoxia has a molecular relative mass of 56,000. The denaturing gel electrophoresis yielded three bands, but the native gel showed only two bands with activity upon  $\alpha$ -naphthyl acetate. We inferred that more than one isoform of the enzyme exist in pacu plasma. The isolated CarbE from serum shows no lipase activity with Tween<sup>®</sup> 20, but liver microsomes from pacu in normoxia or hypoxia do. However, purified CarbE from serum as much as the activity present in liver microsomes can hydrolyze acyl-CoA. The enzyme purified from serum has a three-fold  $V_{max}$  and a four-fold  $K_M$  compared to the activity present in liver microsomes. Furthermore, liver microsomes from pacu under normoxia can hydrolyze acyl-CoA twice as faster as do the microsomes from animals in hypoxia. Activity of serum CarbE with p-nitrophenylacetate was inhibited by 4 mM 4-HNE. Hydrolysis of acyl CoA by liver microsomes was also inhibited by 4 mM 4-HNE, while 2 mM 4-HNE inhibited half of this activity in serum.

Keywords: Carboxylesterase. Pacu. Hypoxia.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Interação CarbE-UGT no lúmen da membrana do RE e interação CarbE-transportador na célula.....	25
Figura 2 –	Mecanismo catalítico da carboxilesterase de mamíferos.....	26
Figura 3 –	Monômero da CarbE 1 humana.....	29
Figura 4 –	Ilustração de um indivíduo da espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887), conhecido popularmente como pacu, pacu-caranha ou caranha.....	35
Figura 5 –	Esquema de normoxia e hipoxia em peixes.....	40
Figura 6 –	Esquema da purificação das carboxilesterases dos soros de pacu.....	43
Figura 7 –	Cromatograma do fracionamento do soro de pacu pela coluna HiTrap Blue.....	48
Figura 8 –	Cromatograma dos picos proteicos obtidos do fracionamento da amostra sérica sem albumina e enriquecida com atividade carboxilesterásica.....	49
Figura 9 –	Purificação parcial da CarbE de soro de pacu.....	50
Figura 10 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições não desnaturantes revelado por atividade sobre $\alpha$ -naftilacetato.....	51
Figura 11 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes revelada por prata.....	52
Figura 12 –	Efeito do Tween 20 <sup>®</sup> sobre a atividade de carboxilesterase de microsossomos de fígado de pacu em normoxia e hipoxia.....	53
Figura 13 –	Curva velocidade versus concentração de p-nitrofenilpalmitato da atividade de carboxilesterase em microsossoma de fígado de pacu em normoxia (●) e microsossoma de fígado de pacu em hipoxia (▲).....	54
Figura 14 –	Curva velocidade versus concentração de p-nitrofenilpalmitato fração purificada de CarbE do soro de pacu em normoxia (■).....	55

Figura 15 – Atividade de carboxilesterase sobre p-NPA em soro (A) e microsomas de fígado (B) de pacus mantidos a 6,0 ou 0,5 mg de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (hipoxia) por 42 horas durante os períodos primavera/verão e outono/inverno.....

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Atividade de carboxilesterase sobre p-NPA em soro e microsomo de fígado de pacus mantidos em 0,5 mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> por 42 horas.....	47
Tabela 2 –	Purificação de uma esterase de soro de pacu.....	50
Tabela 3 –	Atividade de carboxilesterase sobre p-NPP em microsomo de fígado de pacus mantidos em 0,5 mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> por 42 horas .....	55
Tabela 4 –	Atividade de carboxilesterase sobre p-NPA em soro após 24 h de exposição ao 4-HNE.....	56
Tabela 5 –	Atividade de carboxilesterase sobre p-NPP em soro após 24 h de exposição ao 4-HNE.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	Acil-Coenzima A:colesterol-aciltransferase
ADH	Alcool desidrogenase
Apo B	Apoproteína B
ASCho	Acetilcolina
Asp	Ácido aspártico
ASR	Respiração na superfície aquática
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
BSCho	Butirilcolina
CarbE	Carboxilesterase
CAUXIN	Carboxylesterase-like urinary excreted protein
CES 1	Carboxilesterase 1
CES 2	Carboxilesterase 2
CES 3	Carboxilesterase 3
CES 4	Carboxilesterase 4
CES 5	Carboxilesterase 5
CPT11	Irinotecan
CTC	Carbonato de sódio a 10%, tartarato duplo de sódio e potássio a 0,2% e sulfato de cobre a 0,1%
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAEE	Fatty acids ethyl-ester (ésteres etílicos de ácido graxo)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLUT-1	Transportador de Glicose tipo 1
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
h-CE-1	Carboxilesterase hepática humana 1
h-CE-2	Carboxilesterase hepática humana 2
HDL	Lipoproteína de alta densidade
His	Histidina

4-HNE	4-hidroxinonenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
KDEL	Lisil-aspartil-glutamil-leucina
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
Leu	Leucina
Lis	Lisina
<i>Mr</i>	Massa molecular relativa
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PEG	Polietilenoglicol
p-NPA	p-nitrofenilacetato
p-NPP	p-nitrofenil palmitato
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
TGH-2	Triacilglicerol hidrolase de fígado de camundongo
Tris	Hidroximetil aminometano
Tween 20 <sup>®</sup>	Polioxietileno-(20)-monolaurato de sorbitana
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
L	Litro
mg	Miligrama
O <sub>2</sub>	Molécula de oxigênio
%	Porcentagem
pH	Potencial de hidrogênio
h	Hora
min	Minuto
kDa	Kilodalton
α	Alfa
β	Beta
μM	Micromolar
cm	Centímetro
Kg	Kilograma
mL	Mililitro
®	Marca registrada
ppm	Partes por milhão
g	Gravidade
nm	Nanômetro
μg	Micrograma
mM	Milimolar
U	Unidade
mm	Milímetro
V	Volts
mA	Miliampér
mmHg	Milímetro de mercúrio
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
mV	Mili Volts
mU	Miliunidade

$V_{\max}$	Velocidade máxima
$K_M$	Constante Michaelis-Menten
$\eta\text{mol}$	Nanomol
g	Gramas
$O_2$	Molécula de oxigênio
$N_2$	Molécula de nitrogênio
NaOH	Molécula de hidróxido de sódio
HCl	Molécula de ácido clorídrico
$CaCl_2$	Molécula de cloreto de cálcio
KCl	Molécula de cloreto de potássio
NaCl	Molécula de cloreto de sódio
&	Ampersand
#	Cerquilha
*	Asterisco

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
1.1	<b>Hipoxia</b> .....	18
1.2	<b>Esterases</b> .....	23
1.2.1	<u>Carboxilesterases</u> .....	24
1.3	<b>Animais</b> .....	32
1.3.1	<u>Pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)</u> .....	34
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	36
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	36
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
3.1	<b>Animais</b> .....	37
3.2	<b>Material</b> .....	37
3.2.1	<u>Reagentes</u> .....	37
3.2.2	<u>Equipamentos</u> .....	37
3.3	<b>Método e cronograma</b> .....	38
3.3.1	<u>Experimento de hipoxia</u> .....	39
3.3.2	<u>Análise gasométrica</u> .....	40
3.3.3	<u>Preparo do soro</u> .....	40
3.3.4	<u>Homogeneização dos tecidos e preparo da fração microsomal</u> .....	41
3.3.5	<u>Quantificação das proteínas totais</u> .....	41
3.3.6	<u>Ensaio enzimáticos</u> .....	42
3.3.7	<u>Purificação das carboxilesterases dos soros de pacu</u> .....	43
3.3.7.1	Preparo da amostra.....	44
3.3.7.2	Cromatografia de afinidade HiTrap Blue.....	44
3.3.7.3	Cromatografia de afinidade procaínamida-Sepharose 4B.....	45
3.3.7.4	Gel filtração em HPLC.....	45
3.3.8	<u>Eletroforese</u> .....	45
3.3.8.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes.....	46
3.3.8.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE.....	46
3.3.9	<u>Análise dos resultados</u> .....	46



4	<b>RESULTADOS.....</b>	47
4.1	<b>Experimento de hipoxia.....</b>	47
4.2	<b>Purificação da carboxilesterase do soro de pacu mantido em normoxia.....</b>	48
4.3	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida.....</b>	50
4.4	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE.....</b>	51
4.5	<b>Atividade de lipase da CarbE de soro e de microsossomos de fígado.....</b>	52
4.6	<b>Atividade de hidrólise de CarbE sobre acil-CoA em soro e fígado de pacus em normoxia e hipoxia.....</b>	53
4.7	<b>Efeito do 4-hidroxinonenal (4-HNE) sobre a atividade de carboxilesterase nos animais em normoxia.....</b>	56
4.8	<b>Comparação da atividade de carboxilesterase em soro e microsossomos de fígado de pacus mantidos em hipoxia durante 42 horas nas estações primavera/verão e outono/inverno.....</b>	57
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	59
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	65
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	66

## INTRODUÇÃO

Há algumas espécies de animais capazes de suportar mudança da quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido em seu sangue por meses. Em seus órgãos acontecem adaptações fisiológicas compassadas com a hipoxia (Hermes-Lima *et al.*, 2001; Lushchak e Bagnyukova, 2006; Willmore e Storey, 1997; Constanzo, 1989).

Ao longo de sua evolução os peixes dulcícolas dos trópicos adaptaram-se às concentrações de oxigênio caracteristicamente baixas de águas cujas temperaturas variam entre 22 °C e 34 °C. Além disto, em lagos rasos dos trópicos ocorre variação extensa da quantidade de oxigênio dissolvido no intervalo de algumas horas. Tipicamente, na Amazônia e no Pantanal acontecem as cheias e vazantes, o chamado pulso de inundação anual (Bleich *et al.*, 2009; Val *et al.*, 1998), que dá origem nas cheias aos lagos rasos das planícies alagadas, nos quais um dos fenômenos característicos é a alteração da concentração de oxigênio.

O oxigênio é muito importante para vários processos fisiológicos dos peixes (Nikinmaa, 2002), mas águas excessivamente empobrecidas ou enriquecidas em oxigênio podem sobrecarregar suas células e provocar um estresse oxidante por aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO). Alguns autores reportaram que carpas (Lushchak *et al.*, 2005) e o peixe-japonês (Lushchak *et al.*, 2001) desenvolveram processos que os capacitam a superar hipoxia severa.

Um dos mais importantes mecanismos bioquímicos que dá suporte à sobrevivência de certas espécies de peixes durante longos períodos sob baixa disponibilidade de oxigênio é a depressão da taxa metabólica (Hochachka *et al.*, 1996; Storey, 1987; Storey e Storey, 1990, 2004; van Wavesveld *et al.*, 1989). Tais peixes sobrevivem mobilizando reservas de carboidratos para gerar moléculas de ATP por glicólise anaeróbia. Tecidos de carpas, por exemplo, contêm grandes reservas de glicogênio e mostram também algumas adaptações metabólicas adicionais importantes quanto à sua utilização (Hochachka e Somero, 1984). No peixe-japonês, por exemplo, foi encontrado processo bastante efetivo; suas brânquias excretam o etanol produzido em seus músculos a partir de lactato originado de glicose, o que evita a desvantajosa acidose que resultaria se o lactato fosse acumulado em hipoxia (Shoubridge e Hochachka, 1980).

A carboxilesterase (CarbE) foi purificada de hepatócitos de rato, de onde é secretada pelo retículo endoplasmático para o plasma (Cygler *et al.*, 1993, Redinbo *et al.*, 2005; Satoh *et al.*, 2006). Na verdade, existem isoenzimas de CarbE compondo uma superfamília

localizada no retículo endoplasmático (Sato *et al.*, 2006). Elas hidrolisam ligações dos tipos éster e amida, produzindo os correspondentes ácidos, álcoois livres e aminas. As funções fisiológicas apontadas para CarbE no fígado de mamíferos incluem a transesterificação geradora de etil-ésteres de ácidos graxos a partir de acil-graxo-Coenzima A e etanol (Bora *et al.*, 1996; Diczfalusy *et al.*, 2001).

Um intrigante evento de adaptação de carpas e tilápias à hipoxia é a redução dos seus níveis de ácidos graxos livres. François *et al.* (1997) mostraram que junto com um aumento transitório na produção de glicose hepática, a hipoxia causou um progressivo decréscimo do turnover de ácidos graxos livres no soro de trutas. Vianen *et al.* (2002) aventaram que o acúmulo de compostos anfifílicos, caso dos ácidos graxos livres, pode ser danoso para a estrutura e a função das membranas, e que a redução dos níveis séricos de ácidos graxos livres deveria fazer parte de um mecanismo geral de adaptação às condições de hipoxia que carpas e tilápias sempre encontraram em seus habitats.

Convém usar animais que possuem órgãos adaptados a variações da disponibilidade de O<sub>2</sub> como modelos de experimentos para aumentar nossos conhecimentos sobre tolerância às ERO. Já que quaisquer eventos fisiológicos só são possíveis graças às reações bioquímicas, fica claro que quanto mais soubermos sobre as alterações da atividade das enzimas que permitam a estes seres resistirem à carência cíclica de oxigênio, mais aprenderemos a minimizar os efeitos deletérios das ERO. Por isto, no Departamento de Bioquímica do IBRAG da UERJ existe uma linha de pesquisa sobre enzimas do metabolismo de peixes expostos ao estresse oxidante. Os experimentos principais são realizados com o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), que é bom modelo para estudar as adaptações bioquímicas ao estresse oxidante por ter evoluído no Pantanal, cujo bioma depende do pulso de inundação anual, que dá origem, nas cheias, aos lagos rasos das planícies alagadas, nos quais, por fotossíntese das algas e plantas, ocorre variação circadiana da concentração de oxigênio. Um dos achados recentes desta linha, descrito na minha dissertação de mestrado, foi a diminuição da atividade de carboxilesterase no soro de pacus mantidos em água com concentração muito baixa de O<sub>2</sub> (0,5 mg L<sup>-1</sup>).

Consideradas em conjunto, todas estas informações levaram-nos a formular a hipótese de que a queda dos níveis da atividade de carboxilesterase é uma alteração do metabolismo de lipídios favorável à resistência do pacu à hipoxia porque diminuiria a formação dos etil-ésteres de ácidos graxos que lesam as mitocôndrias. Desenvolvemos esta tese para tentar provar tal hipótese.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Hipoxia

Baixa concentração de oxigênio pode ser encontrada em várias situações como câncer, exposição a altas temperaturas, inflamação e desenvolvimento embrionário (Hockel e Vaupel, 2001; Rodway *et al.*, 2003; Murdoch *et al.*, 2005). A hipoxia também ocorre naturalmente em sistemas aquáticos, entretanto, com a atividade antrópica, os organismos marinhos e aquáticos de muitas regiões passaram a ficar expostos a longos períodos de hipoxia ou anoxia devido ao acúmulo de matéria orgânica como nutrientes na água, o que aumenta o consumo do oxigênio dissolvido. Com o uso frequente de fertilizantes industriais nos últimos 30 anos, sistemas costeiros e lagos tornaram-se mais afetados por condições de hipoxia. Sistemas que não eram relatados como hipóxicos atualmente sofrem variações na disponibilidade de oxigênio (Diaz e Breitburg, 2009).

O oxigênio é necessário para a vida de peixes e animais invertebrados que habitam o meio aquático. No entanto, quando a disponibilidade desse gás é cortada ou o consumo excede a demanda, a concentração de oxigênio pode chegar a níveis bem abaixo do que os animais precisam para a vida. Esta condição de baixa de oxigênio é chamada de hipoxia, mas, quando o ambiente está totalmente desprovido de oxigênio, ocorre o fenômeno de anoxia (Diaz e Breitburg, 2009).

Muitos autores definem que a hipoxia aquática ocorre quando a concentração de oxigênio dissolvido na água está abaixo de 2-3 mg O<sub>2</sub>/L em ambientes marinhos e estuarinos e abaixo de 5-6 mg O<sub>2</sub>/L em ambientes de água doce. Além disso, a literatura atual define a hipoxia como concentrações de oxigênio entre 0,2 até 4,0 mg O<sub>2</sub>/L, com uma média de 2,1 mgO<sub>2</sub>/L, o que pode ser insuficiente para proteger animais sensíveis ao fenômeno. Entretanto, existem autores que sugerem a concentração de 4,6 mg O<sub>2</sub>/L como a mais apropriada para proteger cerca de 90% desses animais (Farrell e Richards, 2009).

Dependendo da salinidade e da temperatura a água contém 20-40 vezes menos oxigênio por volume difundido do que no ar e nela a taxa de difusão do oxigênio é 10.000 vezes mais lenta (Graham, 1990; Nikinmaa e Ress, 2005). A solubilidade relativamente baixa e a difusão de oxigênio aliados a estratificação da coluna d'água com a decomposição de matéria orgânica promovem o desenvolvimento da hipoxia ou anoxia. Em lagos, fatores que

afetam a mistura vertical das águas, como o vento e a temperatura, proporcionam mudanças da difusão do oxigênio, podendo diminuir a sua concentração na água. Gelo e neve que cobrem lagos e córregos também podem impedir a fotossíntese de plantas e algas e a reoxigenação das águas, levando o ambiente para a hipoxia. Em águas doces tropicais, a oxigenação é mais elevada no verão por ser o período mais chuvoso do ano, mas, no inverno, a tendência é que as águas fiquem mais pobres em oxigênio por conta da estiagem e estagnação do fluxo (Diaz e Breitburg, 2009). O Pantanal, por exemplo, é uma grande planície que apresenta períodos de seca e chuvas bem definidos. Devido às características do solo e declividade baixa a consequência é o alagamento de áreas maiores que 30.000 km<sup>2</sup> na época das chuvas (Calcagnotto e DeSalle, 2009). O fluxo lento das águas dos rios do Pantanal é um fator determinante para a perda de sedimentos que ficam em suspensão fazendo com que os organismos se alimentem dessa matéria orgânica contribuindo para a queda nos níveis de oxigênio dissolvido (Gonçalves *et al.*, 2011). Bleich *et al.* (2009) coletaram água de nove rios que percorrem o Pantanal mostrando uma concentração média oxigênio dissolvido de 1,70 mg.L<sup>-1</sup> durante o período de cheia.

A hipoxia também é uma importante força evolutiva. Dentro dos ambientes aquáticos, os peixes desenvolveram inúmeras formas de adaptação às carências de oxigênio. Isto originou um grande número de espécies aquáticas tolerantes a hipoxia com uma variedade de adaptações anatômicas, fisiológicas e comportamentais indicando que, mesmo com a grande oxigenação da atmosfera que ocorreu por volta de 2,3 bilhões de anos atrás, a hipoxia pode ter tido um importante papel na evolução e nas estratégias de adaptação dos animais no planeta (Diaz e Breitburg, 2009). A falta de oxigênio também é considerada uma das principais causas do surgimento de peixes que respiram ar atmosférico, mas esta habilidade não está necessariamente relacionada com o desenvolvimento da tolerância à hipoxia. Além disso, muitos grupos que não respiram ar atmosférico toleram a hipoxia e são capazes de se manter em ambientes hipóxicos ou anóxicos (Almeida-Val, 2000).

Os efeitos da hipoxia e as adaptações dos peixes as baixas de oxigênio são estudados desde 1913. A partir das décadas de 1970 e 1980 foi relatada a mortalidade em massa de invertebrados e peixes em grandes áreas com pouco oxigênio dissolvido na água. Os peixes respondem a hipoxia através de diversas adaptações. Fisiologicamente as adaptações críticas incluem redução do metabolismo e aumento da tolerância a distúrbios iônicos e de pH. A hipoxia também pode provocar uma lentidão do fluxo de elétrons dos complexos da mitocôndria podendo ocorrer um escape de elétrons, o que causa redução parcial de átomos de O<sub>2</sub> e, assim, um aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (ERO). ERO acima

das concentrações normalmente reduzidas por antioxidantes celulares podem desencadear um processo conhecido como peroxidação lipídica, gerando aldeídos tóxicos como, por exemplo, o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (4-HNE) (Lushchak e Bagnyukova, 2006; Taylor e Moncada, 2009; Jacobs e Marnett, 2009). Adaptações anatômicas podem fazer com que ocorra o remodelamento das lamelas branquiais de peixes para melhorar a captação de oxigênio, fenômeno observado em *Carassius auratus auratus* quando mantidos em hipoxia por sete dias (Nikinmaa e Ress, 2005). Na tentativa de captar mais oxigênio os teleósteos vão para águas superficiais, onde há sempre mais oxigênio dissolvido (Wu, 2002). Os peixes também respondem à hipoxia com hiperventilação imediata, aumento dos eritrócitos, lançamento destes no sangue e mudança no volume de plasma, que são mecanismos de compensação para manter a concentração de oxigênio em níveis normais (Nikinmaa, 2001; Nikinmaa e Ress, 2005). Muitas espécies de insetos, moluscos, anfíbios e répteis são capazes de sobreviver em condições mínimas de oxigênio por algumas horas, e até por meses, pelo fato de se adaptarem a esse ambiente hipóxico. Algumas espécies de tartarugas são capazes de hibernar em águas frias anóxicas por meses em um estado inativo para poupar ATP suficiente para sobreviver, pois gastam o mínimo de energia possível. As tartarugas do gênero *Trachemys* e *Chrysemys* podem viver por até quatro meses em ausência total de oxigênio (anoxia) quando submergidas em águas frias de 3 °C (Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002). Estudos realizados em laboratório observaram que a hibernação das tartarugas inicia após 30-60 minutos de anoxia e é controlada por estímulos cerebrais (Lutz e Nilsson, 1997). Este mecanismo também é usado por outras espécies, como o sapo leopardo *Rana pipiens* e a cobra jarreteira *Thamnophis sirtalis parietalis*, quando submetidas a temperaturas muito baixas (Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002).

Dois mecanismos de defesa mais significantes encontrados no reino animal contra a hipoxia são a diminuição do taxa metabólica e a regulação eficiente das vias produtoras de ATP (Hochachka e Lutz, 2001). Quando os animais estão ativos durante a hipoxia ou anoxia eles produzem ATP por vias metabólicas independentes de oxigênio. Isto só é possível se a via de respiração aeróbia for alternada para a via anaeróbia. Entretanto, o rendimento energético gerado pela via anaeróbia é inferior ao obtido na presença de oxigênio e insuficiente para manter a vida por longos períodos em animais superiores. Alguns peixes diminuem seu metabolismo e aumentam o fluxo glicolítico para aliviar esse quadro. A expressão das enzimas da via glicolítica, como a fosfofrutocinase, é intensificada para melhorar a produção de energia (Wu, 2002). Isto já foi observado em estudos feitos com cérebro de carpa que mostraram um aumento de 2,4 vezes da taxa glicolítica durante a anoxia

e, após 24 h de anoxia, os níveis de frutose 2,6-bifosfato, um ativador da fosfofrutocinase, foram aumentados de 3,5 vezes (Lutz e Nilsson, 1997). Em cérebro do peixe escorpião do mar (*Scorpaena porcus*) a atividade da fosfofrutocinase aumentou em 56% durante 90 min de hipoxia, mas sofreu queda no músculo (Lushchak *et al.*, 1998). Em músculo de carpas (*Cyprinus carpio*) mantidas em hipoxia por sete dias, a atividade de fosfofrutocinase muscular foi diminuída (Zhou *et al.*, 2000). Assim, a atividade das enzimas glicolíticas pode diminuir, aumentar, ou até mesmo permanecer inalterada dependendo do tecido e da espécie. A hipoxia também interfere na expressão de isoenzimas de lactato desidrogenase (LDH), a enzima da fase terminal do metabolismo anaeróbico. Em ciclídeos (*Cichlasoma amazonarum*) que vivem em habitats hipóxicos a LDH-A é mais expressa no coração, enquanto naqueles que vivem em ambientes em normoxia a predominância é da isoenzima LDH-B. Entretanto, este efeito varia de acordo com o tecido, uma vez que experimentos feitos em laboratório com a mesma espécie mostraram maior expressão da LDH-B no músculo e no cérebro e menor expressão no fígado (Nikinmaa e Ress, 2005). A hipoxia também pode regular o transporte de glicose em vertebrados tolerantes como na carpa capim, que apresenta níveis mais elevados de mRNA do transportador de glicose tipo 1 (GLUT-1) quando mantida em hipoxia por até sete dias, fato também observado em algumas células de mamíferos (Lutz e Nilsson, 1997; Nikinmaa e Ress, 2005).

A organela que sintetiza o ATP necessário para suprir a demanda por energia é a mitocôndria. Durante a normoxia, a ATPase sintetiza ATP nas células dos animais. Entretanto, na ausência de oxigênio, a enzima reversa, chamada ATP sintase, inicia o bombeamento de prótons para a matriz da mitocôndria, o que pode manter o potencial da membrana mitocondrial. Sapos e tartarugas tendem a inibir a ATPase de suas mitocôndrias durante anoxia (Hochachka e Lutz, 2001).

Mesmo que o metabolismo energético dos animais mantidos em hipoxia seja alterado para a via anaeróbica, existem dois fatores limitantes para produzir energia: a reserva de glicogênio e o excesso de ácido láctico. Entretanto, alguns peixes possuem adaptações que revertem esse quadro. O fígado desses animais pode chegar a ter 15% da massa corpórea e 30% dessa massa é composta de glicogênio. Os *Carassius* podem excretar etanol pelas brânquias produzido a partir do ácido láctico, o que impede que o animal sofra acidose metabólica. Essa habilidade de produzir etanol, em combinação com o grande estoque de glicogênio, permite aos *Carassius* manterem altas taxas glicolíticas por longos períodos sem sofrerem muitos danos com o aumento dos níveis de lactato, algo que não ocorre com tartarugas, por exemplo (Lutz e Nilsson, 1997).

Embora a energia produzida pela via anaeróbica seja suficiente para manter as funções básicas dos animais, ela é insuficiente para manter o animal em plena atividade. A redução da locomoção é uma forma dos animais conservarem energia. O bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) reduz sua locomoção em até 60% quando está em ambiente hipóxico (Wu, 2002). Alguns anfíbios e répteis que vivem em ambientes frios congelam seus tecidos como uma estratégia de hibernação, porém essa estratégia pode ser fatal se o gelo atingir o interior das células (Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002). No entanto, alguns peixes como tilápias e apaiaris mantidos em hipoxia não apresentam mudanças na atividade locomotora (Xu *et al.*, 2006; Silva, 2009).

A síntese de proteínas é um processo que requer energia em que consome cinco moléculas de ATP por ligação peptídica formada. Como os animais tendem a diminuir a formação de ATP durante a hipoxia, a síntese de proteínas é suprimida para que mantenham suas funções basais (Storey e Storey, 2004). Alguns estudos confirmam essa hipótese. Embriões de camarões marinhos (*A. franciscana*) podem reduzir em 77% a síntese de proteínas mitocondriais *in vitro* durante anoxia e os *Carassius* a podem reduzir de 50 a 95% em órgãos como músculo e fígado (Wu, 2002; Nilsson e Renshaw, 2004). Em cérebro de mamíferos, a anoxia produz grande lançamento do neurotransmissor excitatório glutamato. Entretanto, animais tolerantes a anoxia liberam o neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) ao invés do neurotransmissor excitatório glutamato, diminuindo a atividade cerebral e evitando efeitos adversos causados pela liberação excessiva do glutamato (Lutz e Nilsson, 1997).

Além das mudanças bioquímicas no metabolismo energético de peixes, estudos feitos em hepatócitos humanos, mantidos em 1% de oxigênio por 24 horas, mostram alterações na expressão de genes relacionados a várias funções. Dentre estes genes, estão incluídos os da carboxilesterase, enzima importante na desintoxicação do organismo, cuja expressão diminui (Sonna *et al.*, 2002). Além disso, estudos feitos por Borazjani *et al.* (2011) mostraram que a carboxilesterase de macrófagos/monócitos humanos é inibida pelo aldeído 4-hidroxi-2-trans-nonenal (4-HNE).



## 1.2 Esterases

As carboxilesterases, as colinesterases e as paraoxonases pertencem a um grupo amplo de enzimas conhecidas como esterases. Esterases quebram moléculas com ligação éster produzindo um ácido carboxílico e um álcool. Estas enzimas são encontradas em vários tipos de celulares em distintas localizações dentro da célula. Algumas esterases são para exportação para o plasma, outras estão na membrana celular, com função catalítica para o meio extracelular. Além disso, também existem esterases retidas em organelas dentro da célula, como o retículo endoplasmático, enquanto outras são encontradas no citoplasma (Satoh, 2005; Chahinian *et al.*, 2002).

Aldridge (1953) classificou as esterases de acordo com o grau de afinidade com os organofosforados. Dessa forma, as esterases podem ser classificadas em três categorias: A-esterases, B-esterases e C-esterases. As esterases do tipo A, como as paraoxonases, preferem ésteres com grupamentos aromáticos presos ao carbono da carbonila e, ao interagirem com organofosforados, os hidrolisam, sem ficarem fosfatadas. As do tipo B, como a acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e carboxilesterase, preferem grupamentos alifáticos ligados a carbonila e são inibidas por ésteres de organofosforados. As do tipo C preferem ésteres de acetato, ou seja, um grupo metila ligado ao carbono da carbonila do éster, não sendo capazes de interagir com organofosforados (Jokanović, 2009; Mackness *et al.*, 1998).

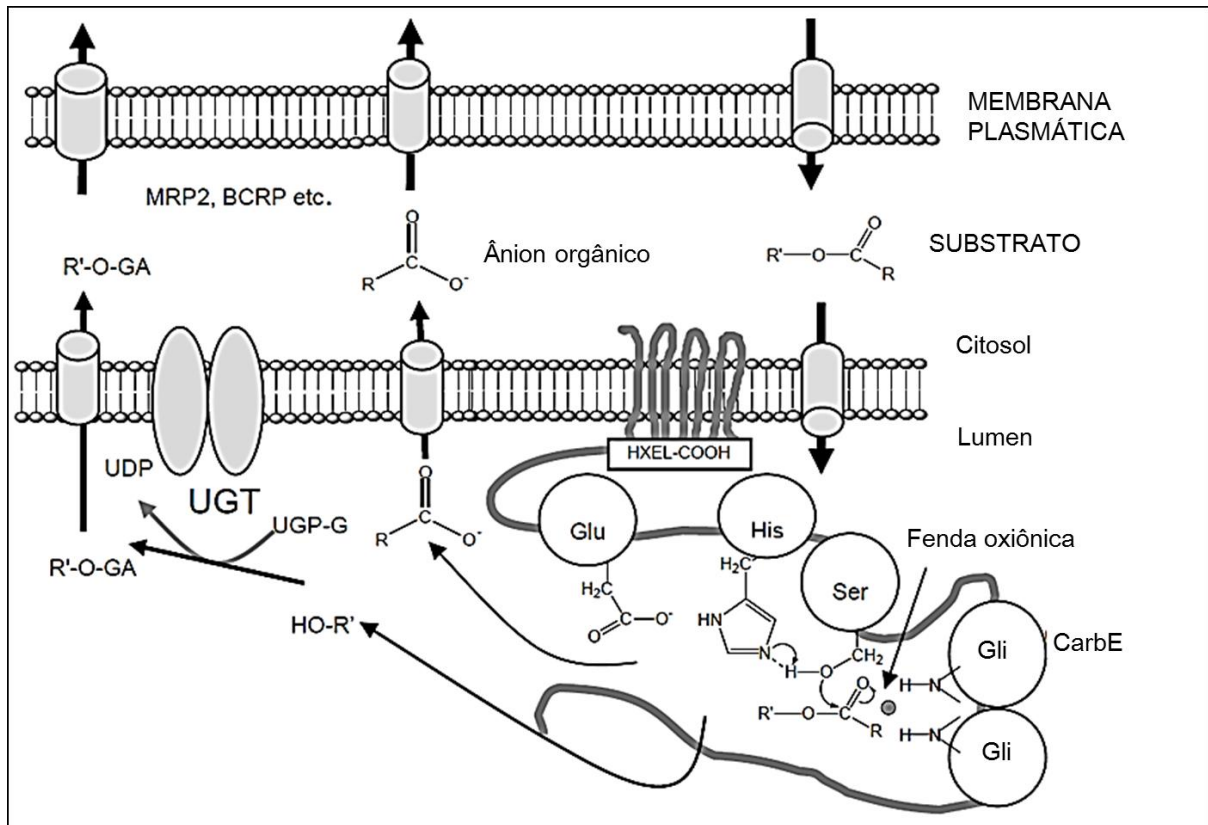
As colinesterases e carboxilesterases são conhecidas comumente como serino-esterases devido apresentarem em seu sítio catalítico a tríade de aminoácidos glutamato, serina e histidina. Durante a hidrólise, o grupo OH do resíduo de serina faz um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila, o que quebra a ligação do substrato éster e gera como produtos, pela adição de uma molécula de água, um ácido carboxílico e um álcool (Satoh, 2005). Os compostos organofosforados podem inibir as serino-esterases quando o grupamento serina do sítio ativo da enzima ataca o grupo fosfato do xenobiótico, o que impede que a molécula de água participe da reação (Eto, 1990). Por outro lado, as paraoxonases possuem alta afinidade por organofosforados, como o paraoxon, hidrolisando-os e assim exercendo uma função desintoxicante do organismo (Mackness *et al.*, 1998).

### 1.2.1 Carboxilesterases

As carboxilesterases (CarbE) (E.C 3.1.1.1) pertencem, assim com as colinesterases, à família das serino-hidrolases. Seu sítio catalítico é composto da tríade de aminoácidos serina, histidina e glutamato (Redinbo e Potter, 2005; Hosokawa, 2008).

As CarbE são amplamente distribuídas em animais (Bornscheuer, 2002; Li *et al.*, 2005; Redinbo e Potter, 2005; Gershater e Edward, 2007; Hosokawa, 2008), plantas (Gershater e Edward, 2007) e microorganismos (Bornscheuer, 2002; Atomi e Imanaka, 2004). Estudos recentes mostram que ratos, camundongos, coelhos, tigre, gato e cavalo, possuem CarbE no plasma, enquanto macaco, galinha, vaca, cabra, ovelha, porco e o homem não possuem CarbE plasmática (Li *et al.*, 2005). No entanto, os maiores níveis de atividade de CarbE estão presentes no microsoma hepático de muitos mamíferos porque a enzima está ancorada nas membranas (Hosokawa, 2008) do retículo endoplasmático (RE). As CarbE ficam aderidas ao RE das células hepáticas através de uma sequência de aminoácidos Lis-Asp-Glu-Leu presente na porção C-terminal que é reconhecida pelo receptor KDEL das membranas, o que sinaliza a sua permanência na célula (Figura 1). Em alguns animais a sequência de aminoácidos pode ser clivada permitindo a liberação e secreção da enzima para o citosol ou o exterior da célula (Redinbo e Potter, 2005; Satoh e Hosokawa, 2006). Além disso, as CarbE podem interagir com algumas enzimas de segunda fase do metabolismo de drogas como a uridina difosfo-glucuronosiltransferase (UGT). Como estas duas enzimas estão localizadas no lúmen do RE, Hosokawa (2008) especula que a interação CarbE-UGT é importante para o metabolismo de drogas, pois os produtos hidrolizados pelas CarbE são substratos para a UGT. A figura 1 mostra a hidrólise de um éster, pela CarbE, formando um produto álcool ou fenol, que é substrato para a UGT, e ânions orgânicos que são substratos para transportadores de ânions orgânicos como as proteínas de resistência associadas a multidroga 2 (MRP2) ou proteínas de resistência ao câncer de mama (BCRP).

Figura 1: Interação CarbE-UGT no lúmen da membrana do RE e interação CarbE-transportador na célula

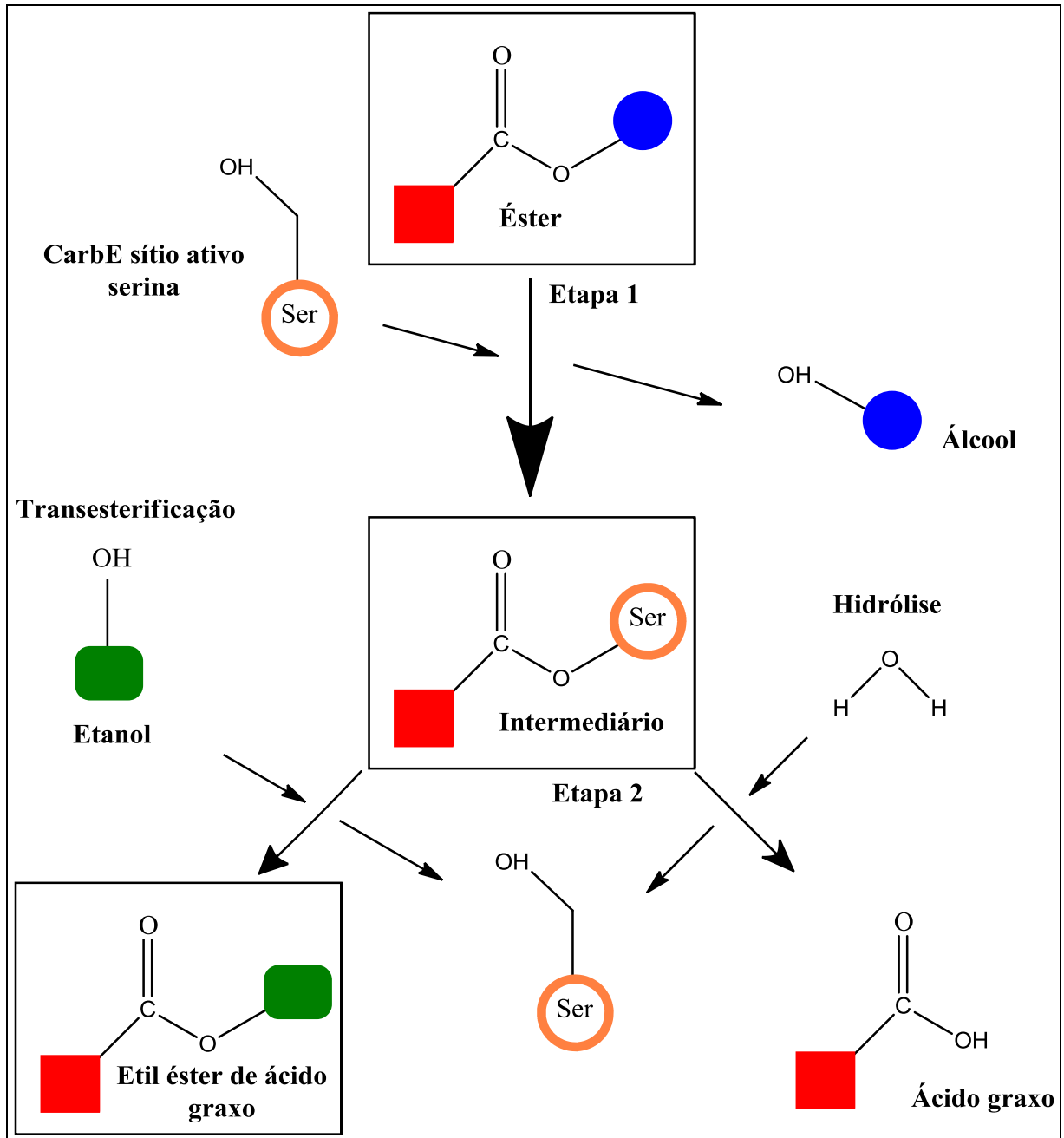


Legenda: Dois produtos da hidrólise de substratos ésteres formados pela CarbE; álcool ou fenol, são substratos para a UGT e ânions orgânicos são substratos para transportadores de ânions orgânicos como proteínas de resistência associadas a multidrogas 2 (MRP2) ou proteínas de resistência ao câncer de mama (BCRP).

Fonte: Adaptado de Hosokawa 2008, p. 414.

A clivagem de ésteres pelas CarbE é realizada pela tríade de aminoácidos Ser, His e Glu em pH neutro e na presença de água ou álcool. A reação ocorre em duas etapas (figura 2), sendo que na primeira a serina do sítio ativo da enzima se liga a um substrato éster formando álcool e um intermediário éster da serina. Na segunda etapa pode ocorrer uma transesterificação quando a porção éster do intermediário formado se liga a um álcool do meio, ou a entrada de uma molécula de água, formando um ácido orgânico (Redinbo e Potter, 2005).

Figura 2: Mecanismo catalítico da carboxilesterase de mamíferos



Fonte: Adaptado de Redinbo e Potter 2005, p. 315.

As enzimas são classificadas de acordo com sua especificidade frente a um substrato, localização dentro de algum órgão em particular, ou pelo seu ponto isoelétrico e peso molecular. Estudos recentes mostram que as CarbE, assim como as outras esterases, existem em múltiplas formas podendo hidrolisar uma variedade de substratos, o que torna ambígua a sua classificação. Muitas hidrolases exibem propriedades de CarbE, lipase ou de ambas, atuando em substratos ésteres ou lipídicos. Atualmente as CarbE são classificadas de acordo

com sua sequência de aminoácidos e sua homologia com outras CarbE já descritas (Redinbo e Potter, 2005; Hosokawa, 2008).

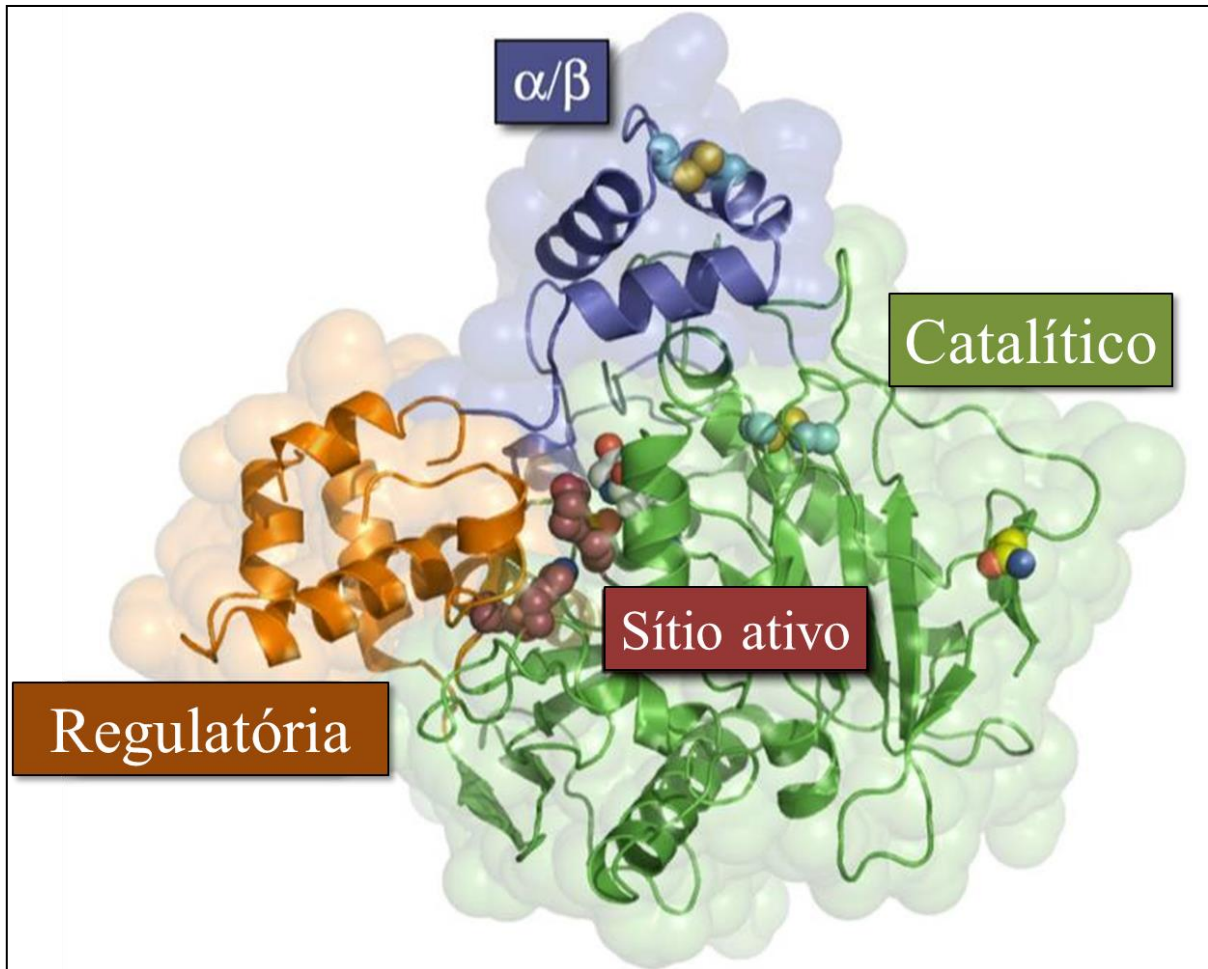
A classificação das carboxilesterases de mamíferos proposta por Satoh e Hosokawa (2008) divide as isoformas em cinco famílias. A família CES 1 inclui a maioria das CarbE e estão divididas em oito subfamílias: 1A até 1H. A subfamília 1A inclui a maioria das isoformas de CarbE em humanos, macaco e coelho, a subfamília 1B inclui as isoformas em rato, camundongo e hamster, enquanto as isoformas da subfamília 1C são mais encontradas em cachorro, gato e porco. A subfamília 1H inclui as CarbE RL1, ES 4 de camundongo e as hidrolases B e C que catalisam a hidrólise de acil-CoA de cadeia longa. Os membros da subfamília 1G não ficam retidos no RE, são secretados do fígado para o sangue. Um fato interessante é que as isoenzimas da subfamília 1G são encontradas em sangue de ratos e camundongos, mas não em sangue humano. A família CES 2 inclui as CarbE do intestino humano (CES2A1), a de rato (rCES2), a forma 2 de coelho (mCES2) e a de hamster (AT51), que são expressas principalmente no intestino delgado. A família CES3 inclui a CarbE humana hCE3 cuja sequência de aminoácidos é cerca de 40% similar a das isoformas CEA1A1 e CES2A1 e é expressa no fígado e no trato gastrointestinal, porém possui menores níveis de atividade do que as CEA1A1 e CESA1. A família CES4 inclui uma CarbE urinária denominada CAUXIN (CES4A2) do inglês “carboxylesterase-like urinary excreted protein”, que é a principal proteína excretada na urina de gatos. A família 5 (CES5) inclui formas de 46,5 kDa que possuem uma diferença estrutural em relação as outras famílias das CarbE. A família 5 inclui as formas de 46,5 kDa de fígado camundongo (ES) e de fígado de macaco. A diversidade de famílias influencia na especificidade de substrato, distribuição no tecido, propriedades imunológicas e regulação gênica. Por exemplo, a família CES1A1 é capaz de esterificar álcoois de pequena cadeia, enquanto que a família CES2A1 é capaz de esterificar álcoois de cadeia longa (Hosokawa, 2008).

A estrutura da CarbE consiste de uma folha beta pregueada central rodeada por um número variável de hélices alfa acomodando a tríade catalítica serina, histidina e ácido glutâmico. Esse tipo de dobramento tridimensional alfa e beta é uma característica presente em todas as lipases. Além disso, a tríade catalítica (Glu, Ser, His) das CarbE, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e colesterol esterase são bem conservadas. Isto é comum nas famílias com  $\alpha,\beta$ -hidrolases. Estes elementos são bem conservados nas CarbE do rato, coelho, macaco e humano. O sítio catalítico está localizado no fundo de uma fissura com aproximadamente 25 Å no centro da molécula e compreende um bolso grande e flexível do lado da serina e, do lado oposto, há outro bolso pequeno e rígido. A localização e orientação

do sítio ativo fornece um ambiente hidrofóbico ideal para a hidrólise de uma variedade de compostos hidrofóbicos. O bolso pequeno é adjacente ao buraco oxiânico formado pela Gly 123-124 e é recoberto por resíduos hidrofóbicos. Substratos de cadeia curta devem ser facilmente acomodados dentro do bolso pequeno e rígido. O bolso grande e flexível é recoberto por vários resíduos não polares e pode acomodar moléculas grandes ou policíclicas como o colesterol. O bolso grande é adjacente a um poro secundário que permite moléculas pequenas (substratos e produtos de reação) entrarem e saírem do sítio ativo. Como as CarbE são conhecidas por hidrolisar vários substratos, o bolso grande e flexível da enzima confere a habilidade de hidrolisar vários compostos estruturalmente distintos enquanto o bolso rígido é muito mais seletivo ao substrato que pode ser acomodado. Um fato interessante é que a maioria das isoenzimas de CarbE são glicoproteínas cuja cadeia de carboidratos é necessária para realizar suas atividades. A CES2A1 humana contém um local de glicosilação em duas posições diferentes (Asn103 e Asn267), enquanto a CES1A1 contém apenas um local de glicosilação em Asn79. Este sítio de glicosilação é modificado por uma cadeia de carboidratos com a primeira N-acetilglicosamina e o ácido siálico terminal e parece estar envolvida na estabilização do trímero CES1A1 pelo bolso no monômero adjacente da sua estrutura cristalina. De acordo com a estrutura de cristal de raios-X da CarbE 1 humana, estas linhas de resíduos no bolso flexível é adjacentes à porta lateral. Dada a diversidade de substratos hidrolisados pela CarbE, o bolso grande e flexível confere a capacidade para hidrolisar muitos compostos estruturalmente distintos, enquanto o bolso rígido é muito mais seletivo no que diz respeito à acomodação dos substratos (Hosokawa, 2008).

Hemmert *et al.* (2010) descreveram a estrutura cristalina da CarbE 1 humana complexada ao organofosforado sarin (figura 3). Cada monômero é sustentado por duas ligações dissulfeto contendo dois sítios de ligação com três domínios: catalítico,  $\alpha/\beta$  e regulatório. O primeiro sítio de ligação, sítio ativo, está localizado na interface dos três domínios de cada monômero sendo composto da tríade catalítica Ser221, His468 e Glu354. O segundo sítio de ligação (sítio Z) está na superfície da enzima, entre a interface dos domínios regulatório e catalítico. Além disso, o domínio catalítico contém um local de glicosilação de manose em Asn79.

Figura 3: Monômero da CarbE 1 humana



Legenda: Cada monômero da proteína possui três domínios: o domínio  $\alpha/\beta$  (azul) forma a interface trimérica do sítio ativo, a região regulatória (laranja), contém a superfície secundária de ligação ao sítio (sítio Z) e Glu354 da tríade catalítica, e o domínio catalítico (verde) que contém folhas de serina hidrolase conservadas no centro e dois resíduos catalíticos His468 e Ser221. Existem duas pontes dissulfeto (ciano), uma no domínio  $\alpha/\beta$  e outra no domínio catalítico e uma no local de glicosilação em Asn<sub>79</sub> (amarelo).

Fonte: Adaptado de Hemmert *et al.*, 2010, p. 511.

A organização gênica das CarbE em ratos e humanos são evolutivamente conservadas abrangendo cerca de 30 kb e 14 éxons pequenos. No entanto, as famílias possuem pequenas diferenças genéticas. A mCES2, pertencente a família 2, é expressa em vários tecidos com níveis mais elevados de expressão no fígado, rim e intestino delgado. Esta enzima possui três fatores de transcrição, a proteína de especificidade (SP) 1, SP 3 e fator de estimulação 1, que podem ligar na região promotora do gene mCES2 levando a uma transativação sinérgica do promotor. Estudos recentes mostram que o fator nuclear alfa 4 de hepatócitos (HNF-4 $\alpha$ ) pode melhorar a transcriçãodo gene mCES2 que está relacionado com as altas expressões da enzima no fígado. O HNF-4 $\alpha$  também está envolvido em várias funções hepáticas como o

metabolismo de glicose, colesterol e de drogas. Além disso, ácidos biliares podem reprimir a transcrição do gene mCES2 reprimindo a transativação mediada por HNF-4 $\alpha$ .

As CarbE são categorizadas como enzimas de primeira fase do metabolismo de drogas e xenobióticos. Elas podem hidrolisar e transesterificar compostos ésteres como organofosfatos, carbamatos e inseticidas, protegendo os organismos contra intoxicação. Como enzimas de biotransformação de drogas e pró-drogas, as CarbE também podem hidrolisar drogas antitumorais (CPT11 e Capecitapina) e narcóticos (cocaína, heroína e meperidina). Assim, acredita-se que as CarbE são umas das principais enzimas para a determinação da farmacocinética e farmacodinâmica de drogas e pró-drogas que contenham ésteres. As CarbE também atuam no metabolismo de ácidos graxos e colesterol e podem estar associadas as lipoproteínas de baixa densidade (VLDL). Além disso, essas enzimas podem ser usadas na indústria alimentícia junto com álcool oxidase para determinar níveis de aspartame (Odaci *et al.*, 2004; Redinbo e Potter, 2005; Holmes *et al.*, 2008; Hosokawa, 2008).

Estudos mostram que as CarbE podem ser usadas como biomarcadoras de exposição a organofosforados. Uma isoenzima da CarbE chamada egasina está associada à  $\beta$ -glicuronidase em microsomos de fígado de rato. Quando os organofosforados são incorporados ao retículo endoplasmático das células do fígado, ligam-se fortemente à egasina, dissociando o complexo e liberando a  $\beta$ -glicuronidase, que é lançada no sangue. Conseqüentemente, o aumento da atividade da  $\beta$ -glicuronidase no plasma é um bom biomarcador de exposição a organofosforados e é muito mais sensível do que a inibição da AChE em ratos. Entretanto, compostos como carbamatos e piretroides não são sensíveis a esta biomarcação pelo fato de serem rapidamente hidrolisados pelas CarbE humana e de outros mamíferos (Satoh e Hosokawa, 2006).

Além de ser o órgão responsável pela síntese das enzimas que realizam o metabolismo de drogas e xenobióticos, o fígado é capaz de transformar ácidos graxos e monoacilgliceróis em triacilgliceróis para posterior secreção quando estes lipídeos associam-se a apoproteína B (apo B) formando lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). As VLDL são então convertidas em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), que são clivadas em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Ao circularem as LDL voltam para o fígado ou se distribuem para tecidos periféricos. A enzima triacilglicerol hidrolase isolada do microsomo de fígado de vários mamíferos e localizada no lúmen do retículo endoplasmático pertence à família das CarbE. Possivelmente é uma das responsáveis pela lipólise de triacilgliceróis de reserva e sua re-esterificação no fígado. As triacilglicerol hidrolases são as principais lípases do tecido adiposo contribuindo para a homeostase energética e massa dos adipócitos



(Dolinsky *et al.*, 2004; Soni *et al.*, 2004; Okazaki *et al.*, 2006; Aboujaili *et al.*, 2010; Quiroga e Lehner, 2011).

Outro papel importante atribuído as CarbE é o de influenciar o controle das concentrações de colesterol. Níveis elevados de colesterol circulante podem ser danosos para a saúde. Ácidos graxos são adicionados ao colesterol formando ésteres de colesterol que são associados com LDL, IDL e HDL. Depois de entrar em células, a partícula lipoproteica é digerida por enzimas lisossômicas e o colesterol liberado é esterificado pela acil-CoA:colesterol-aciltransferase (ACAT), sendo armazenado nesta forma éster. Os macrófagos e monócitos usam outras enzimas com atividade de ACAT para remover os ácidos graxos das moléculas de colesterol. Estas enzimas também são encontradas no fígado, intestino e outros tecidos e estudos revelam que são carboxilesterases. Além disso, os macrófagos podem ser acionados como mecanismo de defesa ao excesso de LDL nas células endoteliais e, ao fagocitarem as moléculas de LDL, as transformam em ésteres de colesterol pela atividade da ACAT. Este processo dá origem às “foam cells” (células espumosas) como processo inicial da aterosclerose. Estudos sugerem que CarbE fornecem suporte adicional aos macrófagos e monócitos esterificando ou liberando as moléculas de colesterol. Esta mesma forma de CarbE também possui função de colesterol hidrolase, que pode auxiliar na eliminação do excesso de éster de colesterol durante a formação de HDL (Redinbo e Potter, 2005). Estudos feitos em fígado de camundongos mostraram que o aumento da expressão da colesterol hidrolase mediada por adenovírus aumenta a eliminação de colesterol na bile (Zhao *et al.*, 2008).

O consumo crônico de álcool, além de produzir níveis elevados de acetaldeído e acetato, pode induzir a formação de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE, fatty acids ethyl-ester) por ação da FAEE sintases ou através de outras enzimas, dentre elas, as CarbE e outras lipases, principalmente no fígado e pâncreas, tecido adiposo, cérebro e coração. Estes FAEE podem ser transportados para o plasma ligado a lipoproteínas ou albuminas. Esses compostos são metabólitos do metabolismo não oxidante do etanol. Os FAEE causar efeitos diversos nas células como diminuição da síntese de proteínas e aumento da fragilização de lisossomos. FAEE acumulados na mitocôndria causam desacoplamento da fosforilação oxidativa na membrana interna, inibindo a síntese de energia, gerando dano e morte celular e, conseqüentemente, falência do órgão. Os ácidos graxos presentes no citosol reagem com o etanol por reações de transesterificação. As CarbE também podem catalisar a reação inversa dentro da mitocôndria, liberando ácidos graxos das FAEE. É interessante ressaltar que já foi publicado que ácidos graxos livres em concentrações baixas como 5  $\mu\text{M}$  também são

desacopladores da fosforilação oxidativa (Beckemeier e Bora, 1998; Salem e Laposata, 2004; Redinbo e Potter, 2005; Satoh e Hosokawa, 2006).

Mesmo que as CarbE sejam estudadas principalmente em mamíferos, muitos trabalhos utilizam suas atividades como biomarcadoras de xenobióticos em animais aquáticos, como os peixes. Em salmões *Oncorhynchus tshawytscha* a CarbE é mais sensível ao organofosfato clorpirifós do que a AChE, ao contrário do que ocorre em ratos (Chanda *et al.*, 1997), sugerindo que as CarbE possam ser usadas como enzimas biomarcadoras de exposição de peixes a substâncias agroquímicas (Wheelock *et al.*, 2005). Embriões de peixe zebra (*Danio rerio*) também tiveram a atividade de CarbE inibida quando expostos ao metilparaoxon, apesar de a CarbE não ter atuado necessariamente como uma enzima protetora da acetilcolinesterase neste caso (Küster, 2005). Ferrari *et al.* (2007) mostraram que trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), quando expostas ao organofosforado metilazinfós e ao carbamato carbaril, têm a atividade da CarbE inibida e, como ocorreu nos embriões de peixe zebra, a atividade de CarbE não evitou que moléculas do organofosforado pudessem chegar ao cérebro e inibir as colinesterases ali presentes. Além disso, as CarbE também parecem importantes para o mecanismo de desintoxicação em plantas (Gershater e Edwards, 2007), minhocas (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2009), moluscos (Bonacci *et al.*, 2004), crustáceos (Voique-Fernández *et al.*, 2007) e ácaros (Baffi *et al.*, 2008). No entanto, até o momento, não existem relatos sobre a ação das CarbE no metabolismo de lipídios ou na síntese de FAEE em peixes ou em outros vertebrados que não sejam mamíferos.

### 1.3 Animais

Dentre os grupos de peixes existentes, os peixes ósseos são o grupo que alcançou o maior sucesso evolutivo. Os primeiros fósseis datam do Siluriano superior (cerca de 426 milhões de anos) e estavam em plena expansão no médio Devoniano (cerca de 393 milhões de anos). As progressivas especializações dos mecanismos alimentares foram um dos pontos chave na evolução do maior grupo de vertebrados. Um aumento progressivo da mobilidade entre os ossos maxilares e os cranianos permitiu que os peixes ósseos de nadadeiras raiadas explorassem uma maior diversidade de presas. As especializações relativas à locomoção, aos habitats, ao comportamento e a biologia acompanharam os mecanismos alimentares fazendo

com que este grupo fosse o mais diverso entre todos os vertebrados atuais (Pough *et al.*, 1999).

Os dois maiores grupos de Osteichthyes (*osteo* = osso, *ichthys* = peixe) possuíram caracteres locomotores e alimentares que os tornaram os peixes dominantes durante o Devoniano. Algumas especializações desenvolveram patas para os vertebrados terrestres, mas a maioria das linhagens mantiveram as características dos peixes que originaram os peixes ósseos modernos. Com o passar do tempo os grupos de peixes primitivos apresentaram um aumento do grau de ossificação do esqueleto como uma tendência evolutiva. Os peixes da classe Chondrostei (peixes cartilagosos), por exemplo, deram origem a uma irradiação denominada Holostei (peixes totalmente ósseos), que culminaram nos Teleostei (peixes ósseos definitivos) (Pough *et al.*, 1999).

Os Osteichthyes possuem o corpo de forma variável, brânquias cobertas por opérculo e, frequentemente, bexiga-natatória. Atualmente são agrupados em quatro subclasses: Actinopterygii, Crosopterygii, Dipneusti e Sarcopterygii. A subclasse Actinopterygii tem como característica principal nadadeiras suportadas por raios e foi dividida em quatro grupos: Polypteriformes, Chondrostei, Neopterygii e Teleostei (ou teleósteos). A maioria dos peixes atuais são teleóstei e são divididos em quatro clados: Osteoglossophormia, Elopomorpha, Clupeomorpha e o Euteleostei. A grande maioria dos teleósteos viventes pertence ao clado Euteleostei representado atualmente por Ostariophysii e Salmoniformes (Pough *et al.*, 1999).

Otophysi (= Ostariophysii *sensu stricto*) é a segunda maior superordem de teleósteos. Na América do Sul e particularmente no Pantanal, existem três grupos de Otophysi bem distintos entre si: Characiformes, Gymnotiformes e Siluriformes. Uma característica peculiar desse grupo de peixes é o fato de apresentarem um conjunto de ossículos muito especiais, derivados das vértebras cervicais, que comunica a bexiga natatória (neste caso, funcionando como amplificador de sons) com o ouvido externo. Tais ossículos compõem o aparelho de Weber, que constitui uma particularidade única dos Otophysi (Britski *et al.*, 2007).

Os Characiformes incluem uma grande variedade de peixes que vivem em rios e lagos da África e Américas. Adaptações morfológicas e fisiológicas permitiram que alguns grupos pudessem sobreviver em extrema condição de baixa de oxigênio. Os Characiformes apresentam o corpo coberto por escamas, nadadeiras pélvicas (ventrais), possuem nadadeira adiposa quase sempre bem desenvolvida e os raios das nadadeiras são moles. Esse grupo também apresenta diversas formas de alimentação podendo ser herbívoros, onívoros, iliófagos e carnívoros. Pacu, curimatá e o piavussu são algumas das espécies neotropicals que fazem parte dos Characiformes (Britski *et al.*, 2007; Ortí e Vari, 1999).

Os projetos de pesquisa em nosso laboratório envolvem enzimas da primeira e segunda fase da biotransformação de xenobióticos e enzimas que protegem os seres vivos do estresse oxidante que ocorre quando o ambiente está em hipoxia, anoxia ou hiperoxia. O modelo de estudo dessas linhas de pesquisa é o *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) pacu, típico Pantanal Mato-Grossense. No Pantanal ocorre ampla variação nas concentrações de oxigênio ao longo do dia, além do aumento de agentes poluentes por conta da agroindústria. Como o pacu vive neste ambiente, ele possui adaptações bioquímicas e fisiológicas que o permite sobreviver a demanda de oxigênio diariamente e sazonalmente. No entanto, essas adaptações são pouco entendidas. Desse modo, é importante utilizar animais Neotropicais para enriquecer o conhecimento bioquímico e entender as diversas adaptações encontradas nos diversos seres vivos.

### 1.3.1 Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

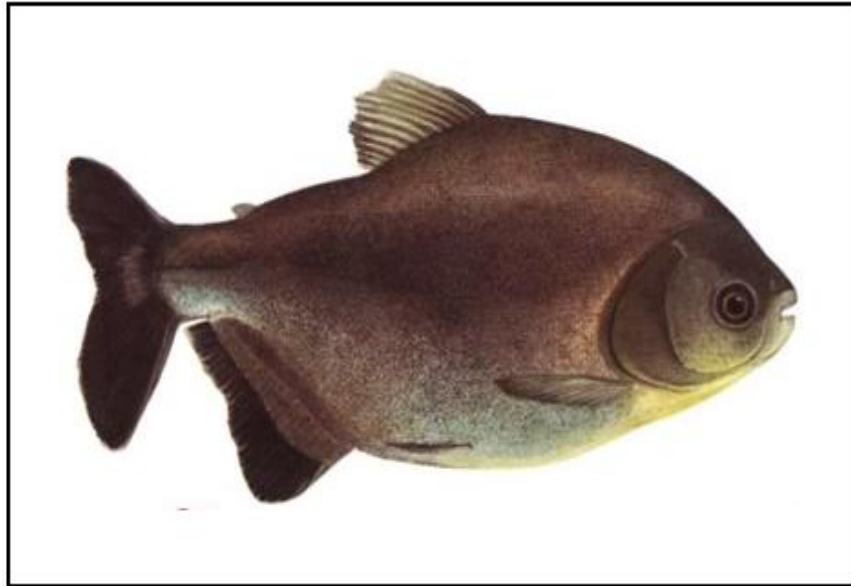
A espécie *Piaractus mesopotamicus*, também conhecida por pacu, pacu-caranha ou caranha, pertence à família Characidae. É uma espécie típica do pantanal sul-mato-grossense, dos rios amazônicos e da bacia do Prata em geral. Vivem nos alagados, lagoas e corixos (canais que ligam as águas de alagados com os rios próximos) na época de cheia e, durante a seca, também são encontrados em leitos de rios maiores. Esses animais podem viver em cardumes atingindo até mil indivíduos, principalmente em corpos de águas volumosos. São animais com hábitos diurno e noturno alimentando-se de frutas, sementes, caranguejos, moluscos, detritos orgânicos encontrados na água e até, ocasionalmente, de peixes. Estudos baseados no conteúdo estomacal desses animais confirmaram que são onívoros (Machado, 2003; Calil, 2005).

Esta espécie até recentemente era conhecida como *Colossoma mitrei* (Berg, 1955). Machado Allison (1982) revalidou e redefiniu o gênero *Piaractus*, e Géry (1986) mostrou que a mesma espécie já havia sido descoberta por Holmberg em 1887 (Britski *et al.*, 2007).

*P. mesopotamicus* tem comprimento aproximado de 50 cm, pode pesar até 18 kg e possui pré-maxilar com seis a oito dentes na série externa e dois na interna. O maxilar pode ter um ou dois dentes. A nadadeira anal possui raios anteriores mais longos que os da porção mediana, com 24 a 27 raios. Linha lateral presente com 108 a 128 escamas. O flanco é castanho ou cinza-escuro, o ventre mais claro; os indivíduos jovens (cerca de 15 cm) possuem

máculas escuras no flanco. Em vida o ventre é amarelo-dourado (Cali, 2005; Britski *et al.*, 2007).

Figura 4: Ilustração de um indivíduo da espécie *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), conhecido popularmente como pacu, pacu-caranha ou caranha



Fonte: Britski *et al.*, 2007.

A hipótese deste trabalho é a de que a queda dos níveis da atividade de carboxilesterase seja uma alteração do metabolismo de lipídios favorável à resistência do pacu à hipoxia porque diminui a formação dos ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE) que lesam as mitocôndrias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar se a hipoxia provocará alteração nos níveis de atividade de carboxilesterase do fígado e do soro de pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).

### 2.2 Objetivos específicos

- 1 - Verificar se a atividade de CarbE é alterada em fígado e soro de pacus submetidos à hipoxia;
- 2 – Purificar a CarbE de soro de pacu;
- 3 – Determinar se a enzima purificada hidrolisa ésteres acila de coenzima-A (acil-CoA esterase) e triacilgliceróis (triacilglicerol esterase);
- 4 – Verificar quais atividades estão presentes em microsossomos (retículo endoplasmático) de fígado de pacu.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Sessenta e dois espécimes de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) foram comprados da Piscicultura São João, localizada no município de Itaocara, RJ. Dentre as espécimes, vinte e quatro tinham tamanhos entre 25 e 35 cm com peso aproximado de 1 kg e quarenta tinham tamanhos entre 15 e 22 cm e pesavam 500 gramas.

#### 3.2 Material

##### 3.2.1 Reagentes

Albumina de soro de boi (BSA),  $\alpha$ -naftil acetato, ditioneitol (DTT), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), Fast Blue B salt, p-nitrofenilacetato (p-NPA), p-nitrofenil palmitato (p-NPP), Reativo de Folin e Ciocalteu e azul de bromofenol foram comprados da Sigma. 4-hidroxinonenal foi comprado da Cayman Chemical Company. A coluna HiTrap Blue de 5 mL foi adquirida da Amersham Pharmacia Biotech. Padrões de massa molecular relativa ( $M_r$ ) variando de 1.350 a 670.000 foram obtidos da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). A resina de afinidade de procainamida-sepharose 4B foi doada pela Dr.<sup>a</sup> Oksana Lockridge do Instituto Eppley do Centro Médico da Universidade de Nebraska, Omaha, USA. Os outros reagentes foram de grau analítico.

##### 3.2.2 Equipamentos

Agitador tipo Vortex Phoenix AP 56; balança analítica Micronal B 200; balança de precisão Mettler AJ 150; bomba submersa Boyu para aquário SP-2500 de vazão 2.000 L/h;

caixas d'água Eternit de capacidade 250 L e 1.000 L preparadas para manutenção de peixes; centrífuga Hermle Z323 K; cilindro de N<sub>2</sub> (gás inerte) Air Liquid Brasil Ltda; Espectrofotômetro Beckman Du<sup>®</sup> 590; espectrofotômetro Shimadzu UV-160 A; homogeneizador tipo Potter-Elvehjem; medidor portátil de oxigênio dissolvido HI 9141E-HI 91410 da Hanna Instruments; potenciômetro Analyser pH 300; Silent Aquarium pump Grundfors Type up 15-42; ultracentrífuga refrigerada Himac CP 70 Hitachi equipada com o rotor P 50S (ângulo fixo); HPLC Shimadzu e coluna de gel filtração em HPLC Shim-pack Diol-150-Shimadzu.

### 3.3 Método e cronograma

Para realizar o objetivo proposto, desenvolveu-se trabalho experimental de laboratório dividido em três etapas. A primeira etapa foi a realização de três experimentos de hipoxia utilizando oito pacus em cada. Ao final do experimento coletou-se fígado para a obtenção de microsomas e sangue para obtenção de soro. Foi então ensaiada nos microsomas e no soro a atividade de carboxilesterase frente aos substratos p-nitrofenilacetato (pNPA), p-nitrofenilpalmitato (pNPP) e Tween 20<sup>®</sup> (polioxietileno-(20)-monolaurato de sorbitana). Na segunda etapa isolou-se a carboxilesterase do soro dos pacus em normoxia para analisar suas características cinéticas frente ao pNPA, pNPP e Tween 20<sup>®</sup>. Na terceira etapa as amostras purificadas foram usadas para eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes e em condições desnaturantes (com dodecil sulfato de sódio, SDS) para serem caracterizadas.

Além disso, em paralelo ao desenvolvimento do projeto, foram realizados quatro experimentos de hipoxia sazonalmente utilizando um total de quarenta animais. Dois desses experimentos foram agrupados no período de primavera/verão e os outros dois no outono/inverno. Em cada experimento foram colocados cinco animais em tanques chamados de controle e cinco nos tanques em hipoxia.



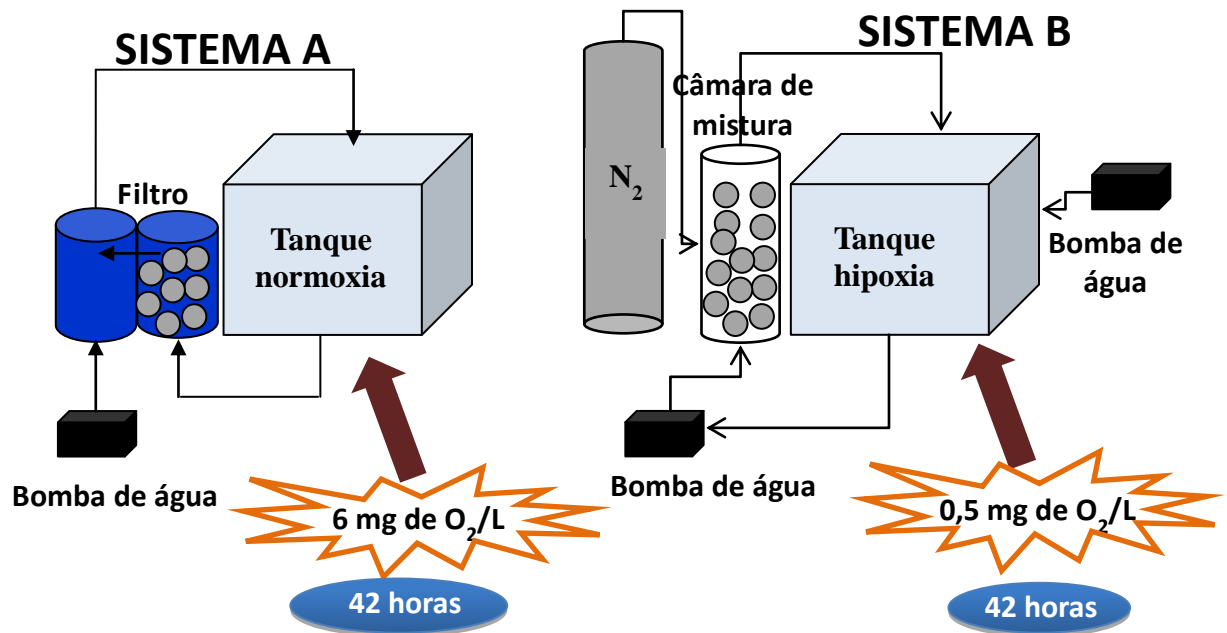
### 3.3.1 Experimento de hipoxia

Foram realizados três experimentos de hipoxia utilizando um total de oito pacus em cada vez que ficaram previamente aclimatados à temperatura ambiente segundo o método usado por Zhou *et al.* (2000). Os pacus foram distribuídos em dois tanques de 1.000 L equipados com sistema de filtro biológico, aeração por bombas de aspiração e água filtrada em carvão ativado. Foram mantidos por duas semanas nessas condições.

No primeiro tanque, quatro animais foram submetidos à concentração de oxigênio de aproximadamente 6,0 mg/L durante todo o experimento (grupo controle). No segundo tanque, quatro pacus foram submetidos à concentração de oxigênio de 0,5 mg/L (grupo hipoxia). Para diminuir o oxigênio dissolvido borbulhou-se lentamente, ao longo de cinco horas, nitrogênio gasoso na água do tanque contendo os pacus. Atingida a concentração de 0,5 mg/L, os animais foram mantidos nessa condição por 42 horas. Trata-se, portanto, de um experimento normoxia-hipoxia com coleta de sangue e eutanásia dos animais ao fim de 42 horas, quando foram coletados fígado e sangue. Os tanques foram cobertos com lona plástica para impedir a troca de gases com o ambiente. Na Figura 4 há o esquema do experimento.

O experimentos de hipoxia feitos sazonalmente foram realizados de maneira semelhante ao que foi citado acima, no entanto, foram realizados quatro experimentos de hipoxia divididos em dois para primavera/verão e dois para outono/inverno. Em cada experimento foram usados dez pacus divididos em cinco, nos tanques controle, e cinco, nos tanques em hipoxia.

Figura 5: Esquema de normoxia e hipoxia em peixes



Legenda: O sistema A se refere ao tanque normoxia (4,5-7 ppm de O<sub>2</sub>) onde foram mantidos os peixes controle.

O sistema B se refere ao tanque hipoxia (0,5-1,4 ppm de O<sub>2</sub>) onde foram mantidos os peixes ensaios.

Fonte: Adaptado de Zhou *et al.*, 2000.

### 3.3.2 Análise gasométrica

Alíquotas de sangue de dois animais controle e de dois mantidos em hipoxia, de cada experimento, foram inseridos no gasômetro para as análises da pressão parcial de oxigênio e de gás carbônico.

### 3.3.3 Preparo do soro

O sangue foi coletado pela punção de vasos que passam sob a porção caudal da coluna vertebral. Para o preparo do soro, o sangue foi deixado primeiro à temperatura ambiente por 20 min. A seguir, centrifugado a 2.500 x g por 10 min em centrífuga clínica. O soro sobrenadante foi removido com aspiração por pipeta “Pasteur” e mantido em geladeira (4 °C) ou congelado (-20 °C) até o momento dos ensaios.

### 3.3.4 Homogeneização dos tecidos e preparo da fração microsomal

Os fígados foram retirados e conservados em nitrogênio líquido até o momento do uso, quando foram descongelados. Após o descongelamento, os fígados foram passados suavemente em papel de filtro, pesados e picados com tesoura de ponta fina. Para cada grama de fígado foram acrescentados 4 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo 0,25 M de sacarose. A homogeneização foi feita em homogeneizador do tipo teflon-vidro (Potter, 1955), com os picados suspensos na solução tampão de fosfato dentro de frascos de homogeneização mergulhados em gelo picado. O preparo das frações foi realizado por centrifugação diferencial em ultracentrífuga refrigerada. As frações citosólica, mitocondrial e microsomal foram obtidas por centrifugação do homogeneizado a 800 x g por 5 min, centrifugação do sobrenadante obtido a 20.000 x g por 30 min (fração mitocondrial) e por nova centrifugação do sobrenadante pós-mitocondrial a 105.000 x g por 90 min, produzindo o sobrenadante (fração citosólica) e o depósito (fração dos microsomos). Os sobrenadantes e os depósitos mitocondriais foram mantidos no freezer (- 20 °C) e os microsomos foram mantidos no nitrogênio líquido até o momento do ensaio.

### 3.3.5 Quantificação das proteínas totais

As concentrações de proteínas de cada amostra de soro e homogeneizado de fígado foram determinadas usando o método de Peterson (1977). Alíquotas de soro ou da fração microsomal foram elevadas a um mililitro com água destilada em um tubo de ensaio. De acordo com a faixa de sensibilidade do método deve-se usar uma alíquota que contenha de 10 a 100 µg de proteínas totais. A seguir acrescentou-se 1,0 mL de reagente A, que é composto pela mistura de quatro componentes: a solução CTC (carbonato de sódio a 10%, tartarato duplo de sódio e potássio a 0,2% e sulfato de cobre a 0,1%), NaOH 3,2%, dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e água destilada na proporção de 1:1:1:1. Após agitação as amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos seguindo-se a adição do reagente B (Reativo de Folin e Ciocalteu mais água destilada, na proporção de 1:6). Após 30 min de desenvolvimento da reação, a absorvância a 750 nm dos ensaios e brancos foi registrada no espectrofotômetro contra água destilada. Os brancos da reação não continham amostra. Para a

construção da curva padrão utilizou-se 10 µg (P10) e 100 µg (P100) de albumina bovina no lugar da amostra. A quantidade de proteínas totais nas amostras dos tecidos foi determinada através das seguintes fórmulas matemáticas:

$$\text{Proteínas totais } (\mu\text{g}) = (I \cdot A)^S \quad (1)$$

$$S = 1 / \log (P10 / P100) \quad (2)$$

$$I = \text{antilog} (2 / S - \log P100) \quad (3)$$

### 3.3.6 Ensaio enzimáticos

A atividade de clássica de CarbE foi ensaiada de acordo com Morgan *et al.* (1994) usando como substrato o p-nitrofenilacetato (p-NPA) em concentração final de 3,0 mM em acetonitrila 100%. O aparecimento do p-nitrofenol foi registrado pela leitura da absorvância a 400 nm por 1 min em 0,2 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,7, a 25 °C. Foi utilizado o coeficiente de absorvância molar do p-nitrofenol igual a 13.000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

A atividade de hidrólise sobre acil-CoA da CarbE foi ensaiada de acordo com Kordel *et al.* (1991) usando 0,45 mM de concentração final de p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) como substrato em isopropanol 100%. Este reagente foi incubado com 0,455 mL de solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo Triton X-100 a 0,4% e polietilenoglicol (PEG) 0,1%, por 3 min em 37 °C. Após esse tempo, a amostra foi adicionada e o aparecimento do p-nitrofenol foi registrado pela leitura da absorção a 410 nm. Foi utilizado o coeficiente de absorvância molar do p-nitrofenol igual a 15.000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

O efeito do 4-HNE foi observado na atividade clássica de carboxilesterase do soro e na atividade de hidrólise sobre acil-CoA em soro e microssomos de fígado de acordo com Borazjani *et al.* (2011), com algumas modificações. O 4-HNE ficou incubado com as amostras, em meio reacional contendo tampão, a 25° C por 24 horas nas concentrações de 0,1 mM, 2 mM e de 4 mM. Após esse tempo, foi adicionado os substratos p-NPA ou p-NPP e foi registrado o aparecimento do p-nitrofenol pela leitura da absorção a 400 ou 410 nm. Os coeficientes de absorvância molar utilizados foram de 13.000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para a atividade clássica e de 15.000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para a atividade de hidrólise sobre acil-CoA.

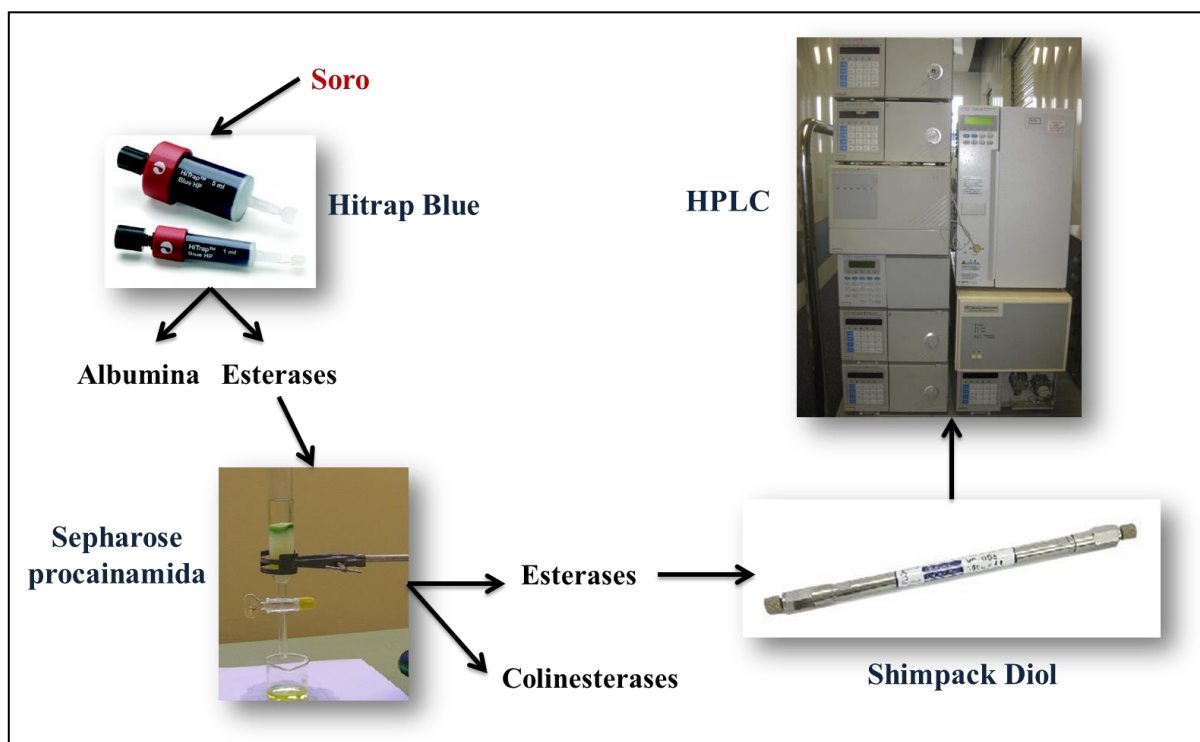
A atividade de lipase da CarbE foi ensaiada de acordo com von Tigerstrom e Steomaschuk (1989) usando Tween 20<sup>®</sup> em concentração final de 1,8% como substrato e CaCl<sub>2</sub> 3 mM. Os reagentes foram incubados em 0,5 mL de solução tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, por 2 min a 25 °C. Após o tempo de incubação, as amostras foram adicionadas e o aparecimento do produto por turvação, devido à hidrólise do Tween 20<sup>®</sup> e sua consequente precipitação com o cálcio, foi registrado a 500 nm no espectrofotômetro por 3 min a 37 °C.

As atividades enzimáticas foram expressas em U.mL<sup>-1</sup> de soro ou U.mg<sup>-1</sup> de proteína. Uma unidade (U) de atividade corresponde a um μmol de produto formado por um minuto de reação.

### 3.3.7 Purificação das carboxilesterases dos soros de pacu

O método utilizado por Salles *et al.* (2006) para isolar butirilcolinesterase sérica de piavussu foi adaptado e aplicado para isolar as CarbE dos soros de pacu (figura 6).

Figura 6: Esquema da purificação das carboxilesterases dos soros de pacu



### 3.3.7.1 Preparo da amostra

O soro utilizado nesta etapa foi obtido segundo descrito no item 3.3.3.

Quatro mililitros de soro obtidos de três pacus foram diluídos em igual volume de solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, e filtrados numa seringa com filtro de acetato de celulose MFS 13. Três mililitros de soro obtidos de dois curimatás foram diluídos e filtrados segundo o mesmo método utilizado para o soro de pacu.

### 3.3.7.2 Cromatografia de afinidade HiTrap Blue

Utilizou-se a coluna de afinidade HiTrap Blue de 5 mL, contendo o corante Cibacron Blue F3G-A ligado covalentemente à matriz hidrofílica de Blue Sepharose. O Cibacron Blue F3G-A pode se ligar fortemente e especificamente a várias proteínas, como também estabelecer interações hidrofóbicas com moléculas aromáticas aniônicas. HiTrap Blue é particularmente apropriada para isolar albumina, interferon,  $\alpha_2$ -macroglobulinas, fatores de coagulação e proteínas que requerem nucleotídeos. Esta coluna foi utilizada com a finalidade de separar a albumina e outras moléculas das esterases presentes no soro.

Alíquotas de soro dos animais mantidos em controle e hipoxia foram unidas formando um pool controle e um pool hipoxia. Cada pool de soro foi filtrado, passado em uma seringa com acetato de celulose e aplicado numa coluna de afinidade HiTrap Blue de 5 mL, contendo como ligante Cibacron Blue F3G-A, equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. A fração albumina foi eluída da coluna com a mesma solução de equilíbrio acrescida de KCl 1,5 M e foi armazenada a -20 °C. Na fração que não ligou ao Cibacron e na que foi eluída com KCl foi estimada a quantidade total de proteínas e ensaiada a atividade de CarbE como descrito nos itens 3.3.5 e 3.3.6.

### 3.3.7.3 Cromatografia de afinidade procaínamida-Sepharose 4B

O volume conjunto dos tubos que continham atividade de CarbE foi aplicado numa coluna de 1 mL de procaínamida-Sepharose 4B equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,1 M e EDTA 1 mM. A coluna foi então lavada com a mesma solução até que no eluato não se pudesse detectar proteínas. A fração colinesterásica foi eluída com 6 mL de solução de procaínamida 0,02 M e 4 mL de solução procaínamida 0,05 M. Em todas as frações que passaram na coluna foi quantificada a proteína total e ensaiada a atividade de CarbE como descrito nos itens 3.3.5 e 3.3.6.

### 3.3.7.4 Gel filtração em HPLC

A etapa final da purificação consistiu na remoção de contaminantes proteicos e procaínamida através de gel filtração em HPLC. Para isto, as frações enriquecidas com atividade de CarbE foram aplicadas numa coluna para HPLC Shim-pack Diol-150-Shimadzu 7,9 mm × 25 cm equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo EDTA 0,001 M e NaCl 0,1 M. O fluxo da coluna foi de 0,7 mL.min<sup>-1</sup> e a eluição das proteínas foi acompanhada com comprimento de onda de 280 nm. O pico contendo atividade de CarbE foi coletado manualmente. O peso molecular aparente das proteínas coletadas foi determinado através da cromatografia com padrões de peso molecular.

### 3.3.8 Eletroforese

Os géis para a eletroforese foram feitos de acordo com o método utilizado por Salles *et al.* (2006) para revelar a atividade de butirilcolinesterase em amostras de soro de piavussu, pacu, curimatá e humano.

### 3.3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes

Amostras de soro de pacu foram analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 12,5%, em placas de 13 x 14 cm de comprimento e 1,0 mm de espessura e gel de empacotamento a 6%. A eletroforese foi realizada a 100 V e 16-8 mA em 4 °C por 1 h. A atividade de CarbE foi revelada usando  $\alpha$ -naftilacetato 1 mM e fast blue B salt 2 mM como substrato em solução tampão tris HCl 50 mM, pH 7,5. O  $\alpha$ -naftilacetato é hidrolisado pela CarbE em  $\alpha$ -naftol que reage com o fast blue B salt formando um diazônio de coloração púrpura.

### 3.3.8.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE

Amostras de soro de pacu e foram analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5%, constituído de 0,4% de SDS, em placas de 13 x 14 cm de comprimento e 1,0 mm de espessura e gel de empacotamento a 3%. As amostras foram reduzidas com  $\beta$ -mercaptoetanol e submetidas à fervura (100 °C) por 5 minutos antes da aplicação. A eletroforese foi realizada a 100 V com miliamperagem de 32 mA para 16 mA em 4 °C por 3 h. As proteínas foram fixadas no gel com glutaraldeído 25% e reveladas com prata a 0,1%.

### 3.3.9 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados com o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Aplicou-se os testes estatísticos “t” de Student e One-way ANOVA, com pós-teste Tukey, com grau de significância de 5%.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimento de hipoxia

Mesmo que os animais tivessem o dobro do tamanho e muitas vezes o peso dos usados por Silva (2009), eles apresentaram, visualmente, os mesmos comportamentos sob hipoxia. Nos três experimentos realizados, observamos que os pacus se comportaram de maneira semelhante. A partir de 15 horas de experimento, os animais nadaram na superfície do tanque, aumentaram a frequência respiratória e apresentaram prolongamento do beijo inferior. Neste último processo, os pacus tentaram realizar a respiração aérea superficial, quando o animal vai em direção à superfície do tanque e nada com o grande beijo junto à superfície para aumentar a entrada de água mais oxigenada para as guelras. Apesar dessas adaptações observadas, quatro pacus mantidos em hipoxia não suportaram tais condições e morreram ao longo do experimento. Assim, mesmo que tenhamos adquirido vinte e quatro animais para o desenvolvimento do projeto, os ensaios enzimáticos foram realizados com vinte pacus.

A pressão parcial de oxigênio no sangue dos animais em hipoxia foi 96% menor do que a dos animais em normoxia (de  $30,25 \pm 4,25$  mmHg para  $1,16 \pm 0,6$  mmHg). Além disso, a pressão parcial de gás carbônico no sangue dos animais hipoxia ( $7,83 \pm 1,2$  mmHg) foi 64% menor do que a dos animais em normoxia ( $22,08 \pm 4,5$  mmHg).

A tabela 1 resume os resultados obtidos no experimento de hipoxia. A atividade clássica de CarbE sobre p-NPA foi ensaiada em soro e microsossoma de fígado dos pacus mantidos em hipoxia. A atividade no soro foi quase vinte vezes menor que nos microsossomos do fígado. Os níveis da atividade enzimática no soro foram 62% menores nos animais expostos a  $0,5$  mg de  $O_2 L^{-1}$  por 42 horas. A queda da atividade de CarbE nos microsossomos de fígado dos peixes em hipoxia foi menor, aproximadamente de 25%.

Tabela 1: Atividade de carboxilesterase sobre p-NPA em soro e microsossoma de fígado de pacus mantidos em  $6$  mg de  $O_2 L^{-1}$  e  $0,5$  mg de  $O_2 L^{-1}$  por 42 horas

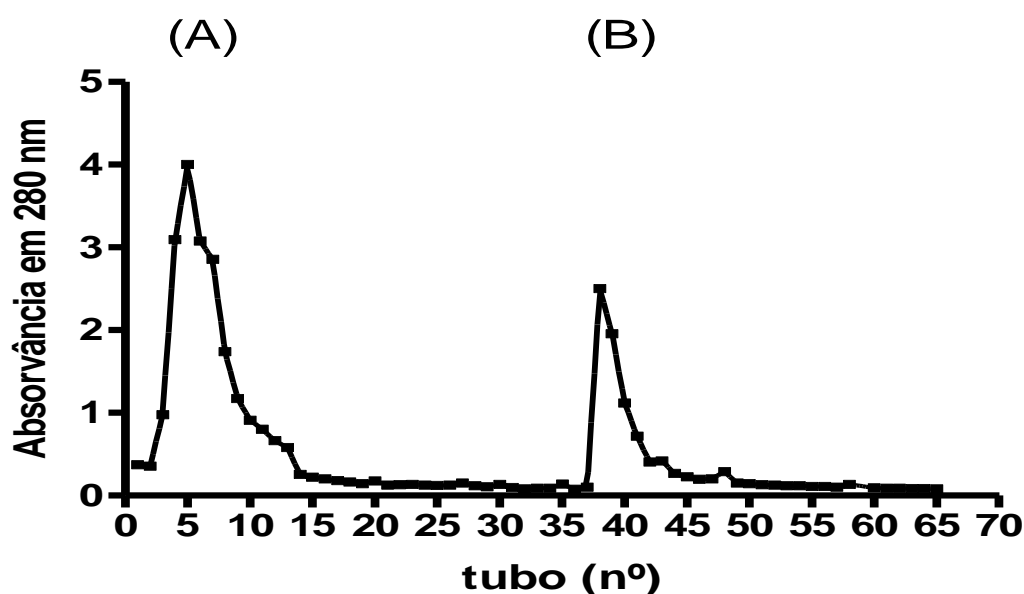
	$6,0$ mg de $O_2 L^{-1}$	$0,5$ mg de $O_2 L^{-1}$	n
Soro	$0,045 \pm 0,006$	$0,017 \pm 0,003^*$	10
Microsossoma de fígado	$0,86 \pm 0,1766$	$0,64 \pm 0,1$	10

Legenda: Indivíduos pesando em média  $1,0$  kg. A atividade foi expressa em  $U.mg^{-1}$  de proteínas. Uma unidade de atividade (U) equivale a um  $\mu mol$  de produto formado por um minuto de reação. n = número de indivíduos. Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $P < 0,05$ .

#### 4.2 Purificação da carboxilesterase do soro de pacu mantido em normoxia

A purificação da CarbE foi realizada nas amostras de soro dos animais em normoxia. Como os animais em hipoxia apresentaram queda de acima de 50% nos níveis de atividade da enzima houve dificuldade para ensaiar, etapa após etapa, a atividade enzimática viável durante os procedimentos de purificação. Primeiramente realizou-se uma cromatografia de afinidade numa coluna HiTrap Blue de 5 mL para retirar a albumina do soro (Figura 7).

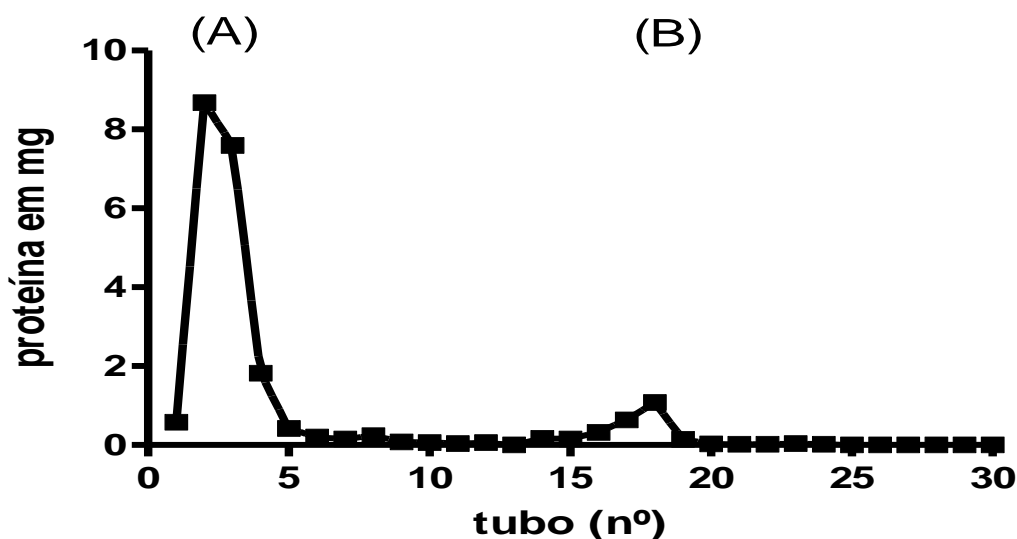
Figura 7: Cromatograma do fracionamento do soro de pacu pela coluna HiTrap Blue



Legenda: (A) Fração proteica sem albumina. (B) Fração contendo albumina. O volume coletado em cada tubo foi de 2 mL.

As frações enriquecidas com atividade carboxilesterásica (pico A da figura 7) foram aplicadas numa coluna de procaínamida-Sepharose 4B (Figura 8).

Figura 8: Cromatograma dos picos proteicos obtidos do fracionamento da amostra sérica sem albumina e enriquecida com atividade carboxilesterásica

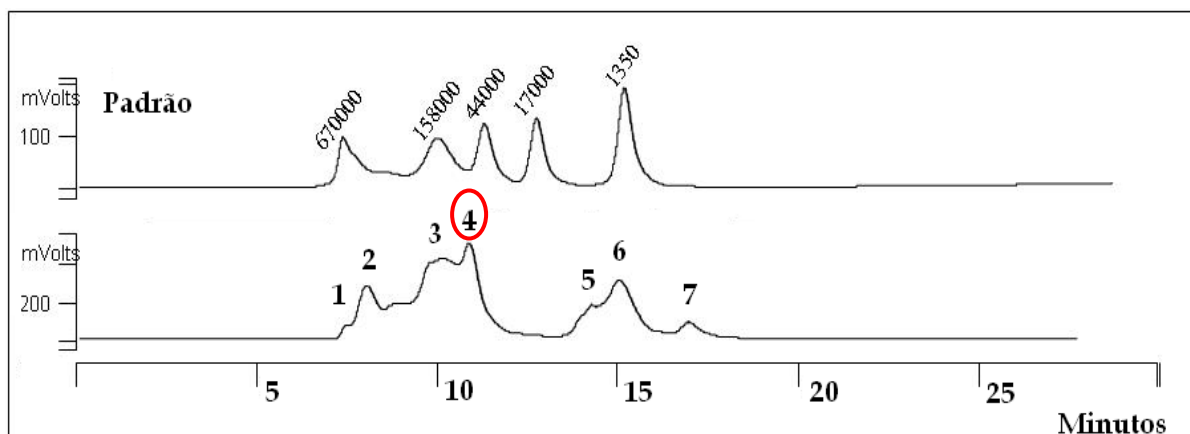


Legenda: O fracionamento foi realizado em uma coluna de procaínamida-Sepharose 4B. (A) Fração proteica não ligada (sem colinesterase). (B) Fração ligada (contendo colinesterase). O volume coletado em cada tubo foi de 2 mL.

As frações enriquecidas em atividade de CarbE coletadas (pico B da Figura 8) foram, por sua vez, aplicadas individualmente numa coluna de exclusão molecular (gel filtração) por HPLC.

A última fase da purificação gerou sete picos proteicos com massas moleculares relativas ( $M_r$ ) aproximadas de 570.000 (pico 2), 80.000 (pico 3), 56.000 (pico 4), 1.957 (pico 5), 432 (pico 6) e 83 (pico 7). A Figura 9 mostra um cromatograma representativo da última etapa de purificação.

Figura 9: Purificação parcial da CarbE de soro de pacu



Legenda: Cromatograma dos sete picos obtidos pelo HPLC. Usamos as seguintes moléculas como padrão de Mr: Tireoglobulina (670.000), gamaglobulina (158.000), ovoalbumina (44.000), mioglobina (17.000) e vitamina B<sub>12</sub> (1.350).

A etapa da HPLC produziu uma fração (pico 4) com atividade sobre p-NPA sete vezes maior que a atividade presente no soro (Tabela 2).

Tabela 2: Purificação de uma esterase de soro de pacu

<b>Etapas e frações</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Atividade Total (mU)</b>	<b>Atividade (mU.mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>%</b>	<b>Fator de Purificação</b>
Soro	84,6	2800	42	100	1
<b>HiTrapBlue</b>					
Fração sem albumina	44,9	1420	32	51	0,8
Fração com albumina	14,26	13	9		
<b>Procaïnâmica-sepharose 4B</b>					
Fração não ligada	19,88	1800	110	64	2,6
Fração ligada	2,64	0	0		
<b>HPLC</b>					
Mr 56.000	1,56	520	330	19	7,9

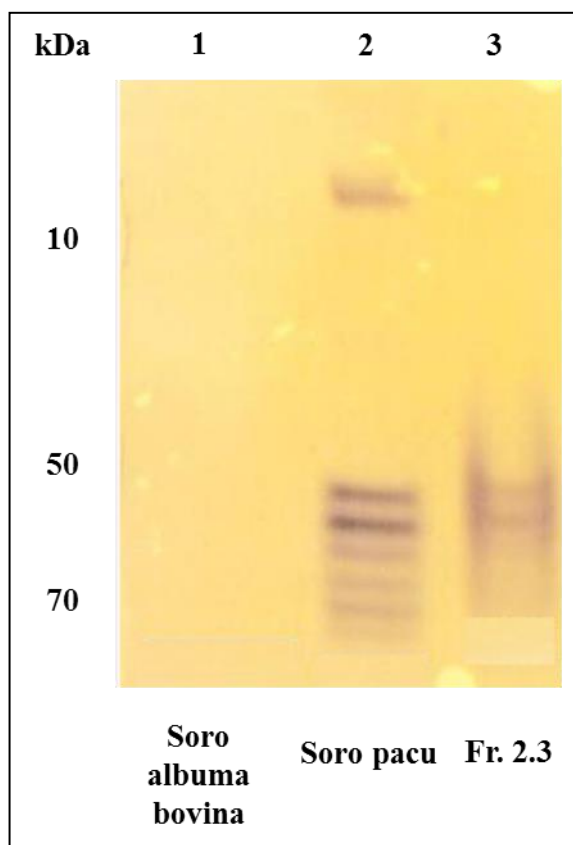
Legenda: Uma miliunidade de atividade (mU) equivale a um  $\eta$ mol de produto formado por minuto de reação.

### 4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As frações colhidas na etapa da HPLC com os maiores níveis de atividade sobre p-nitrofenilacetato foram usadas na eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não

desnaturantes (figura 10). A albumina e outras substâncias (interferon, globulinas, etc.) foram extraídas do soro de pacu na coluna HiTrapBlue. As colinesterases foram retiradas na coluna de procaínamida-Sepharose 4B. O gel não desnaturante foi revelado por atividade enzimática sobre o  $\alpha$ -naftilacetato. A albumina de soro bovina não possui atividade sobre  $\alpha$ -naftilacetato, entretanto, o soro de pacu e a fração 2.3 hidrolisaram o substrato. A fração 2.3 possui duas bandas com atividade de esterase, diferente do soro que possui seis bandas.

Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições não desnaturantes revelado por atividade sobre  $\alpha$ -naftilacetato



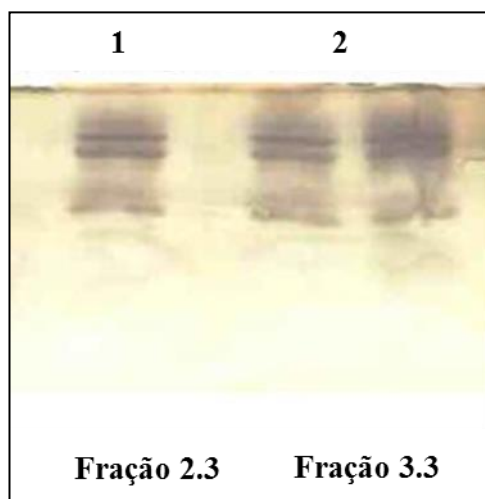
Legenda: A Fração 2.3 representa o pico 4 obtido no HPLC em que a atividade específica sobre p-NPA foi sete vezes maior do que a atividade presente no soro.

#### 4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE

As frações colhidas na etapa da HPLC com os maiores níveis de atividade sobre p-nitrofenilacetato também foram usadas na eletroforese em gel de poliacrilamida em condições

desnaturantes (figura 11). O padrão de peso molecular não foi tratado com B-mercaptoetanol e nem com calor. Entretanto, o arrasto observado não se deve apenas a este fator, mas também porque ele estava deteriorado. As frações obtidas no HPLC apresentaram três bandas ao contrário da albumina que mostrou várias bandas ao longo do gel.

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes revelada por prata



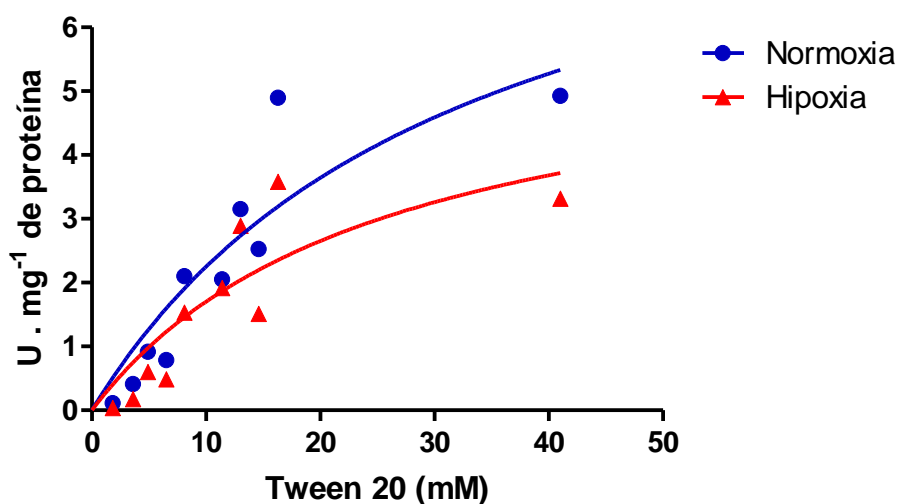
Legenda: As Frações 2.3 e 3.3 representam o pico 4 obtido no HPLC em que a atividade específica sobre p-NPA foi sete vezes maior do que a atividade presente no soro.

#### 4.5 Atividade de lipase da CarbE de soro e de microsomas de fígado

Para este ensaio usou-se o Tween 20<sup>®</sup> como substrato da reação. O Tween é hidrolisado pela enzima e um dos produtos precipita ao interagir com o CaCl<sub>2</sub>, que também é adicionado ao meio reacional. A CarbE purificada e a do soro dos pacus não possuem atividade frente ao Tween, diferentemente do que foi observado na fração microsomal do fígado. Apesar da dificuldade em realizar o experimento, por conta da turbidez do meio reacional, a figura 12 mostra o efeito do Tween 20<sup>®</sup> sobre a atividade de carboxilesterase dos microsomas de fígado de pacu em 6 mg de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) e em hipoxia (0,5 mg de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>). À medida que a concentração do substrato aumenta ocorre um aumento de atividade até atingir um limite. Não foi possível aumentar a concentração de substrato até os valores de saturação da enzima, pois o meio reacional fica turvo, dificultando as leituras no espectrofotômetro.

A atividade de hidrólise do Tween 20<sup>®</sup> por microsossomos de fígado dos animais mantidos em normoxia apresentou  $V_{\text{máx}}$  em torno de  $9,6 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína e uma  $K_M$  de  $32,5 \text{ mM}$  enquanto esta atividade em microsossomos de fígado dos animais mantidos em hipoxia apresentou uma  $V_{\text{máx}}$  de  $6,0 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína e uma  $K_M$  de  $25,3 \text{ mM}$ .

Figura 12: Efeito do Tween 20<sup>®</sup> sobre a atividade de carboxilesterase de microsossomos de fígado de pacu em normoxia e hipoxia



Legenda: Uma unidade de atividade (U) equivale a um  $\mu\text{mol}$  de produto formado por minuto de reação. Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados são referentes a um “pool” de microsossomos de dez indivíduos para cada grupo.

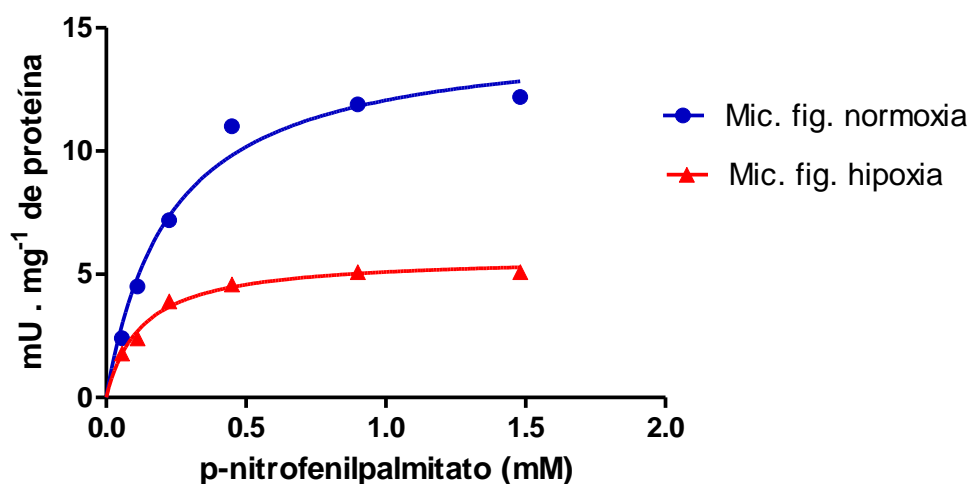
#### 4.6 Atividade de hidrólise de CarbE sobre acil-CoA em soro e fígado de pacus em normoxia e hipoxia

A fração purificada de CarbE do soro do pacu e a fração dos microsossomos de fígado apresentaram atividade frente ao para-nitrofenilpalmitato (p-NPP). A figura 13 mostra o aumento da velocidade da reação de CarbE dos microsossomos de fígado destas frações em resposta ao aumento da concentração do p-NPP. A atividade ensaiada em microsossomos de fígado foi menor, apresentando uma  $V_{\text{max}}$  de  $12,6 \text{ mU mg}^{-1}$  de proteínas e uma  $K_M$  de  $0,22 \text{ mM}$ . A atividade em microsossomos de fígado dos animais em hipoxia apresentou uma  $V_{\text{max}}$  de  $5,7 \text{ mU mg}^{-1}$  de proteína e uma  $K_M$  de  $0,12 \text{ mM}$ . No entanto, a atividade contida nessas duas frações possuem eficiência catalítica ( $V_{\text{máx}}/K_M$ ) semelhante. A atividade da CarbE purificada

do soro do pacu apresenta  $V_{\max}$  de  $33,5 \text{ mU mg}^{-1}$  de proteínas e uma  $K_M$  de  $0,82 \text{ mM}$  (figura 14). As três amostras possuem maiores atividades em pH 9,0 e em temperatura de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .

O soro dos pacus mantidos em normoxia e hipoxia possuem níveis de atividade sobre acil-CoA semelhantes, em torno de  $0,13 \text{ mU mg}^{-1}$  de proteínas. Comparada aos microsossomos, os níveis de atividade são em torno de 100 vezes menor do que a atividade encontrada nos animais em normoxia e 50 vezes menor nos animais em hipoxia.

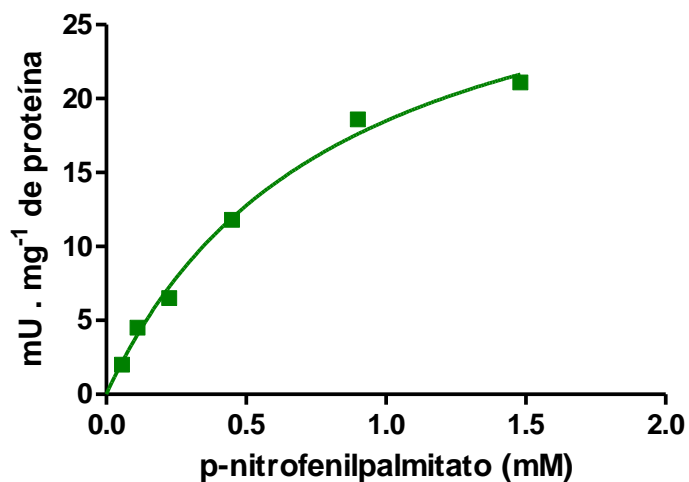
Figura 13: Curva velocidade versus concentração de p-nitrofenilpalmitato da atividade de carboxilesterase em microsossoma de fígado de pacu em normoxia (●) e microsossoma de fígado de pacu em hipóxia (▲)



Legenda: Uma miliunidade de atividade (mU) equivale a um  $\mu\text{mol}$  de produto formado por minuto de reação. Os resultados são expressos por média. O coeficiente de variação dos valores dos ensaios em cada concentração foi sempre menor que 6%. Os dados são referentes a um "pool" contendo dez indivíduos para o microsossoma de fígado e quatro indivíduos para a fração purificada de CarbE do soro.



Figura 14: Curva velocidade versus concentração de p-nitrofenilpalmitato fração purificada de CarbE do soro de pacu em normoxia (■)



Legenda: Uma miliunidade de atividade (mU) equivale a um  $\eta$ mol de produto formado por minuto de reação. Os resultados são expressos por média. O coeficiente de variação dos valores dos ensaios em cada concentração foi sempre menor que 6%. Os dados são referentes a um “pool” contendo quatro indivíduos.

A tabela 3 mostra a atividade de CarbE dos microsossomos de fígado frente ao p-NPP nos animais mantidos em normoxia e hipoxia. Os níveis enzimáticos de CarbE nos animais em hipoxia sofreram queda significativa em torno de 30%.

Tabela 3: Atividade de carboxilesterase sobre p-NPP em microsossomos de fígado de pacus mantidos em 6,0 mg de  $O_2 L^{-1}$  e em 0,5 mg de  $O_2 L^{-1}$  por 42 horas

	6,0 mg de $O_2 L^{-1}$	0,5 mg de $O_2 L^{-1}$	n
Microsossomos de fígado	14,4 $\pm$ 0,55	9,8 $\pm$ 0,6*	10

Legenda: Indivíduos pesando em média 1 kg. A atividade foi expressa em mU  $mg^{-1}$  de proteínas. Uma miliunidade de atividade (mU) equivale a um  $\eta$ mol de produto formado por um minuto de reação. n = número de indivíduos. Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \*P < 0,05.

#### 4.7 Efeito do 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) sobre a atividade de carboxilesterase nos animais em normoxia

O soro de pacus mantidos em normoxia foram encubados com 4-HNE nas concentrações de 100  $\mu$ M, 2 mM e 4 mM por 24 horas. A atividade de carboxilesterase de soro só foi inibida por 4-HNE nas concentrações acima de 2 mM para o substrato p-NPA (tabela 4).

Tabela 4: Atividade de carboxilesterase sobre p-NPA em soro após 24 h de mistura com 4-HNE

	p-NPA
Controle	0,038 $\pm$ 0,005
0,1 mM	0,038 $\pm$ 0,005
2 mM	0,034 $\pm$ 0,005
4 mM	0,014 $\pm$ 0,005*

Legenda: Indivíduos pesando em média 1 kg. A atividade foi expressa em U.mg<sup>-1</sup> de proteínas. Uma unidade de atividade (U) equivale a um  $\mu$ mol de produto formado por um minuto de reação. Os dados são referentes a um “pool” de soro de cinco indivíduos. Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \*P < 0,05.

O efeito do 4-HNE também foi visto na atividade de carboxilesterase de soro e de microsomas de fígado sobre p-NPP. Os níveis de atividade também sofreram queda nas concentrações acima de 2 mM de 4-HNE (tabela 5).

Tabela 5: Atividade de carboxilesterase sobre p-NPP em soro após 24 h de mistura com 4-HNE

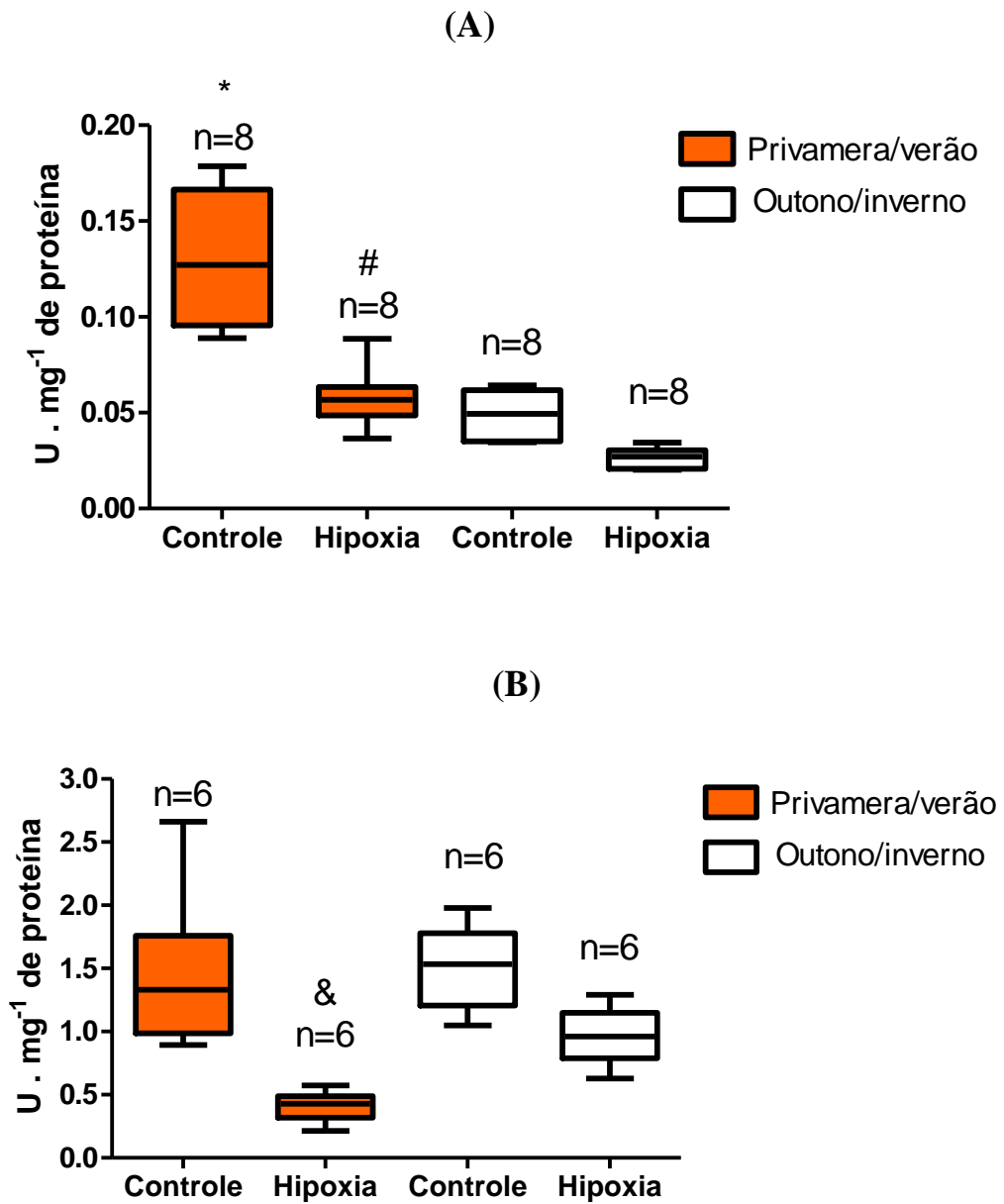
	Soro	Microssomos de fígado
Controle	0,030 $\pm$ 0,005	0,56 $\pm$ 0,02
0,1 mM	0,026 $\pm$ 0,002	0,58 $\pm$ 0,01
2 mM	0,013 $\pm$ 0,004*	0,50 $\pm$ 0,04
4 mM	0,004 $\pm$ 0,002*	0,23 $\pm$ 0,02*

Legenda: Indivíduos pesando em média 1 kg. A atividade foi expressa em mU.mg<sup>-1</sup> de proteínas. Uma unidade de atividade (U) equivale a um  $\mu$ mol de produto formado por um minuto de reação. Os dados são referentes a um “pool” de soro de cinco indivíduos. Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \*P < 0,05.

#### **4.8 Comparação da atividade de carboxilesterase em soro e microsossomos de fígado de pacus mantidos em hipoxia durante 42 horas nas estações primavera/verão e outono/inverno**

A atividade de algumas enzimas pode variar de forma sazonal devido a vários fatores. Como a CarbE atua de diversas formas no organismo, analisamos se as estações do ano alteram sua atividade. Embora o número total de animais utilizados tenha sido de quarenta, oito animais não suportaram a hipoxia e acabaram morrendo. Todos os animais tiveram comportamentos como os descritos no item 3.3.1. A figura 15 mostra a atividade de carboxilesterase sobre p-NPA em soro e microsossomos de fígado de pacus mantidos em 6,0 e em 0,5 mg de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> durante 42 horas. Os animais mantidos em hipoxia durante a primavera/verão, assim como aqueles do outono/inverno tiveram atividade de carboxilesterase diminuída tanto no soro como nos microsossomos de fígado em relação aos seus controles. No entanto, os níveis de atividade encontrados nas estações primavera/verão apresentam queda significativa, diferente do que ocorre no outono/inverno. No gráfico A, os animais do grupo controle primavera/verão tiveram atividade significativamente maior, cerca de duas vezes, em relação aos demais. Além disso, a atividade de CarbE no grupo hipoxia outono/inverno apresentou queda significativa de sua atividade em relação aos animais do grupo hipoxia primavera/verão. No gráfico B, dos microsossomos de fígado, os controles apresentaram os mesmos níveis de atividade, diferentemente do que foi observado no soro.

Figura 15: Atividade de carboxilesterase sobre p-NPA em soro (A) e microsossomos de fígado (B) de pacus mantidos a 6,0 ou 0,5 mg de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (hipoxia) por 42 horas durante os períodos primavera/verão e outono/inverno



Legenda: Uma unidade de atividade (U) equivale a um  $\mu\text{mol}$  de produto formado por minuto de reação. O coeficiente de variação das medidas de atividade foi sempre menor que 6%. \* $p < 0,5$  em relação à hipoxia primavera/verão e controle e hipoxia outono/inverno. #  $p < 0,5$  em relação à hipoxia outono/inverno. &  $p < 0,5$  em relação aos controles primavera/verão e outono/inverno.

## 5 DISCUSSÃO

Como primeira etapa realizamos experimentos de hipoxia nos pacus mantendo-os por 42 horas em  $0,5 \text{ mg de O}_2 \text{ L}^{-1}$ . As respostas comportamentais que observamos estão de acordo com aquelas descritas por Saint-Paul e Bernardino (1988) e por Rantin *et al.* (1998). Os pacus tentaram mais a superfície para superar a falta de oxigênio. Quando a concentração de  $\text{O}_2$  está abaixo de  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$  pacus adultos e juvenis são capazes de utilizar a camada da superfície da água, rica em oxigênio, para respirar, fenômeno conhecido como respiração na superfície aquática (ASR, “aquatic surface respiration”). Presenciamos também a formação de uma extensão dérmica no beijo inferior que facilita aos pacus obterem oxigênio ao nadarem com a boca alinhada à interface água-ar. Experimentos realizados por Zhou *et al.* (2000) com carpas comuns mantidas em hipoxia ( $0,5 \text{ mg de O}_2 \text{ L}^{-1}$ ) durante 168 h e por Xu *et al.* (2006) com tilápias mostraram redução da atividade locomotora. Tal fato deu suporte para a conclusão de que uma considerável parte da energia é usada para a atividade locomotora dos peixes (Lutz e Nilsson, 1997).

Da mesma forma que aconteceu com os experimentos com pacus de 200 g (Silva, 2009), a atividade de carboxilesterase sobre o p-nitrofenilacetato (p-NPA) no soro dos animais que usamos aqui, de 1 kg, mostrou um nível semelhante. No entanto, os pacus grandes possuem o dobro de atividade nos microsomas. É provável que a queda não seja observada no tempo de 42 horas de hipoxia, embora este tempo ser suficiente para diminuir a atividade presente no soro. Além disso, a quantidade de proteínas nos dois tecidos não sofreu nenhuma alteração.

Durante a hipoxia em ratos ocorre menor mobilização das reservas de triacilgliceróis e a oxidação anaeróbica da glicose passa a ser a única fonte de energia (ATP). Quanto aos peixes, ficou experimentalmente provado que as carpas *Carassius auratus auratus* (peixe-japonês ou peixe-dourado) são capazes de converter lactato em etanol sob carência de oxigênio, que é então excretado pelas brânquias (Shoubridge e Hochachka, 1980; Lushchak *et al.*, 2001). Propomos que talvez os pacus apresentem o mesmo mecanismo de adaptação, que os capacitaria a livrarem-se do excesso de ácido láctico derivado de glicólise em baixa disponibilidade de oxigênio. Entretanto, em experimentos de detecção de álcool por cromatografia gasosa, realizados por nosso grupo, ainda não foi possível detectar etanol nas amostras de sangue dos pacus mantidos em hipoxia.

As carboxilesterases podem ter atividade de lipases em adipócitos de camundongos após estímulos adrenérgicos (Soni *et al.*, 2004; Okazaki *et al.*, 2006). Foi também publicado que a carboxilesterase é a principal lipase do tecido adiposo em camundongos (Soni *et al.*, 2004). Além disso, a triacilglicerol hidrolase dos hepatócitos humanos é uma CarbE que hidrolisa triacilgliceróis de reserva e os re-esterifica dentro do retículo endoplasmático para, após associação a apo B, serem secretados para o sangue na forma de VLDL (Dolinsky *et al.*, 2004). Mesmo que tenham encontrado diminuição significativa da concentração de ácidos graxos livres no sangue de carpa e de truta arco-íris mantidas em hipoxia, Muusze *et al.* (1998) mostraram que apaiaris mantidos em hipoxia (1,5 até 0 ppm de O<sub>2</sub>) por 28 h não apresentaram variação nos níveis de glicose e de ácidos graxos livres no plasma em relação aos controles. Haman *et al.* (1997) mostraram que trutas arco-íris mantidas em hipoxia por 90 min não apresentaram variação nos níveis de glicose e de ácidos graxos livres no plasma, apesar do fluxo de ácidos graxos livres ter diminuído. Uma possível explicação deve-se ao fato de que a hipoxia deve causar diminuição da mobilização de triacilgliceróis e, conseqüentemente, da taxa de oxidação dos ácidos graxos não esterificados. A hiperglicemia também pode inibir a mobilização dos ácidos graxos das reservas de triacilgliceróis. A diminuição do fluxo de ácidos graxos livres e a diminuição de seus níveis podem estar associadas com a queda da atividade enzimática da CarbE também nos pacus mantidos em hipoxia. Já que foi visto que a hipoxia inibe a mobilização de ácidos graxos livres em outros animais, é bem possível que em pacus o processo seja semelhante.

Foi publicado que pacus em tanques-rede mostraram perfis diferenciados na mobilização das reservas de glicídios e lipídios, variando de acordo com o período do dia/noite (Silva, 2012). Estes autores concluíram que a significativa mudança das reservas energéticas durante 24 horas indica um metabolismo em que ocorre armazenamento de glicogênio sob normoxia, mas que passaria a um metabolismo mais anaeróbio, consumidor de glicogênio, nas situações de hipoxia. Esta conclusão baseou-se principalmente nos achados de maiores níveis de triacilgliceróis e glicose no plasma entre 16h00 e 24h00, com pequeno aumento de ácidos graxos livres no plasma entre 12h00 e 16h00, mas, inversamente, com níveis mais baixos de triacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicose entre 24h00 e 07h00. Ressalte-se que quando ocorre insolação das águas a disponibilidade de oxigênio aumenta, enquanto durante a noite a disponibilidade de oxigênio diminui por falta de luz.

Estudos mostram que genes de CarbE podem ser regulados por lipídios. Segundo Satoh e Hosokawa (2006) as CarbE têm os seus níveis e o local de sua expressão influenciados pelo estado nutricional, hormônios e por xenobióticos. Simões (2010) mostrou

que a atividade de CarbE no homogeneizado de fígado e no soro de curimatás é maior do que em pacus e piavussus. O curimatá possui hábito alimentar diferente dos pacus e dos piavussus. Apesar de não encontrarmos diferenças entre os níveis de atividades de esterase no soro dos pacus de cativeiro comparados aos dos pacus de vida livre do Pantanal (resultados não incluídos), a atividade de carboxilesterase em homogeneizado de seus fígados foi cinco vezes maior nos animais de vida livre, o que está em acordo com a hipótese de que os níveis de CarbE, que deve participar do metabolismo hepático dos lipídios, sejam controlados pelo estado nutricional dos pacus. Destacamos que, em vida livre, durante as chuvas do verão, os pacus permanecem nas zonas de inundação alimentando-se intensamente de frutos, sementes e castanhas, mas que durante a estação seca do inverno eles permanecem confinados nos rios, com reduzida disponibilidade alimentar. Este tipo de alimentação deve influenciar na atividade de CarbE como foi observado na figura 15. Os animais coletados durante a primavera/verão possuem maiores níveis de atividade, tanto no soro quanto nos microsossomos de fígado. Entretanto, a queda da atividade de CarbE nestes animais é mais expressiva do que a queda observada no grupo hipoxia outono/inverno. Este fato pode estar associado a uma diminuição dos níveis de ácidos graxos livres nos animais sob hipoxia durante a primavera e o verão. Outra indicação interessante de nossos resultados da figura 15 é que os animais do outono/inverno devem ter exportado menos enzima do fígado para o soro. Talvez as CarbE sejam mais necessárias no fígado do que no soro durante o outono e o inverno, uma vez que o metabolismo de lipídios pode ter sido alterado em resposta à mudança da dieta. Além disso, as atividades de CarbE presentes nos microsossomos de fígado dos animais coletados na primavera/verão são mais sensíveis as baixas de oxigênio do que aquelas vistas no outono/inverno.

Em humanos, as CarbE do tipo 1 do fígado podem catalisar reações de transesterificação sintetizando ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE) a partir do etanol e do ácido graxo da acil-CoA. Os FAEE são muito tóxicos em vários tecidos por desacoplarem a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (Redinbo e Potter, 2005) e aumentam de concentração com o consumo crônico de álcool (Salem e Laposata, 2004). Considerando que o pacu, assim como o peixe dourado, seja capaz de produzir etanol a partir do lactato, a queda da atividade de carboxilesterase nesses peixes diminuiria a formação dos FAEE, mesmo com o aumento das concentrações de etanol, o que permitiria que os pacus mantivessem suas mitocôndrias íntegras por longos períodos de hipoxia.

O fracionamento do soro de pacu isolou uma fração albumina que se mostrou também capaz de hidrolisar o p-NPA, mas com poder de catálise menor em relação às demais frações

do soro (Figura 7 e Tabela 2). A hidrólise de p-NPA pela albumina foi reportada pela primeira vez por Dirks e Boyer em 1951. O mecanismo de catálise ainda não foi elucidado, mas foi relatada a importância dos resíduos Arg-410 e Tyr-411 durante a hidrólise. Em razão da alta concentração da albumina no soro de pacu — cerca de 40% de todas as proteínas — provavelmente a albumina contribua de forma significativa para a atividade esterásica total no plasma deste peixe. Li *et al.* (2005) demonstraram que a atividade de hidrólise sobre p-NPA em soro humano é devido à albumina, sendo a alta concentração desta um fator determinante para a capacidade do soro de hidrolisar alguns ésteres. Simões (2010) mostrou que o fracionamento de soro de curimatá, ao contrário de pacu, isolou uma fração albumina incapaz de catalisar a hidrólise de p-NPA. Isso indica que são albuminas diferentes e que tal diferença deve ser considerada na susceptibilidade destes peixes a xenobióticos, uma vez que a capacidade de ligação de agrotóxicos organofosforados à albumina, como também a capacidade esterásica dessa proteína, podem, muito bem, ser critérios para avaliação da susceptibilidade a estes agrotóxicos (Silva Filho, 2004; Sorgob e Vilanova, 2008).

O subsequente fracionamento dos soros de pacu, mantidos em normoxia, na coluna de procaínamida e por HPLC resultaram em frações de *Mr* 56.000 (Figura 9) com atividade de CarbE. Tais frações foram testadas por Simões (2010) e mostraram serem insensíveis ao EDTA, quelante de íons cálcio e magnésio inibidor de paraoxonases (Mackness *et al.*, 1998), ao ecotiofato, organofosforado inibidor de colinesterases (Packman *et al.*, 1978) e a eserina, que é um conhecido agente inibidor da acetilcolinesterase (Monserrat e Bianchini, 2001). Além disto, não foram capazes de hidrolisar os substratos acetiltiocolina e butiriltioclina. Entretanto, as concentrações de EDTA testadas foram suficientes para inibir paraoxonase de rato (Li *et al.*, 2005) e EDTA dez vezes mais diluído do que a concentração testada por Simões (2010) foi capaz de inibir a paraoxonase do fígado de pacu (Bastos *et al.*, 1998). Não foi possível purificar a CarbE do soro dos animais em hipoxia. Como o método de fracionamento possui mais de uma etapa e a atividade da enzima é diminuída em aproximadamente 50%, não conseguimos quantidades para determinar a atividade da enzima nas frações subsequentes da utilização da coluna HiTrap Blue.

Yan *et al.* (1994) isolaram duas formas de CarbE de rim de rato e Morgan *et al.* (1994) isolaram duas formas de CarbE em microsomas de fígado de rato cujos pesos moleculares relativos são 57.000 e 59.000 e as denominaram hidrolases A e B, enquanto que as isoformas hepáticas humanas hCE-1 e hCE-2 têm massa de 60.000. Hashinotsume *et al.* (1978) isolaram de soro de rato uma isoforma de CarbE com *Mr* de 84.000, sensível a diisopropilfluorofosfato e eserina a 0,1 mM e insensível a EDTA a 10 mM. Do mesmo modo, Haubruge *et al.* (2002)



isolaram uma CarbE resistente ao malation em besouros *Tribolium castanem* com peso molecular de 62.000. Além disso, Lehner e Verger (1997) isolaram do microsomo de fígado de porco, a lipase triacilglicerol hidrolase, sensível ao diisopropilfluorofosfato e dietil-p-nitrofenil fosfato, com peso molecular de 60.000. Estudos feitos por Okazaki *et al.* (2006) isolaram uma isoforma de triacilglicerol hidrolase (TGH-2) de fígado de camundongo, com peso molecular de 61.600, pertencente a família das carboxilesterases.

O gel de eletroforese não desnaturante das frações colhidas no HPLC (figuras 10 e 11) com atividade sobre  $\alpha$ -naftilacetato apresentou duas bandas, assim como eletroforeses realizadas por Li *et al.* (2005) apresentaram uma ou duas bandas, dependendo da espécie analisada. No gel o soro mostrou ter várias esterases com atividade sobre o  $\alpha$ -naftilacetato, porém a albumina de soro bovino não possui atividade sobre tal substrato. A eletroforese desnaturante revelada por prata apresentou três bandas, diferente da eletroforese realizada por Haubruge *et al.* (2002) com frações de besouros, em que a fração isolada apresentou uma banda. Como a revelação por prata é um método mais sensível do que a revelação por atividade é provável que tenha mais uma proteína na amostra, mas que não tenha atividade sobre o  $\alpha$ -naftilacetato. Além disso, é possível que a proteína tenha sido quebrada ou que ela seja formada por subunidades que se separaram devido à exposição ao calor e  $\beta$ -mercaptoetanol. As várias bandas reveladas por prata na amostra contendo albumina podem ter aparecido pelo fato da albumina se ligar a outras substâncias durante o processo de purificação.

O efeito do Tween<sup>®</sup> 20 sobre a atividade de CarbE de microsomo de fígado de pacu foi mostrado na figura 10. Durante o ensaio, o meio reacional fica turvo dificultando a análise no espectrofotômetro, tornando o método difícil de ser reproduzido. Com o aumento da concentração do Tween 20<sup>®</sup>, ocorreu um aumento da atividade tanto da CarbE vinda dos animais em normoxia quanto daqueles mantidos em hipoxia. É digno de nota que nos gráficos pode-se notar que os animais mantidos em hipoxia sofreram queda dos níveis de atividade de hidrólise do Tween 20<sup>®</sup> reforçando a hipótese de que nos pacus sob hipoxia acontece inibição do fluxo de ácidos graxos livres. O soro íntegro e a fração purificada de CarbE do soro não hidrolisaram o Tween, possivelmente por alguma modificação estrutural que ocorreu quando a CarbE foi exportada para o sangue.

Além da atividade de lipase, ensaiamos atividades de CarbE de pacus como uma acil-CoA hidrolase frente ao p-nitrofenil palmitato (p-NPP) (figuras 13 e 14). A enzima separada do soro possui o dobro da atividade e  $K_M$  quatro vezes maior do que o encontrado na fração microsomal hepática. É provável que a enzima purificada do soro dos pacus seja uma

isoforma alterada em comparação àquela encontrada nos microsossomos de fígado, haja vista que ao ser lançada para o sangue a enzima perde a sequência de aminoácidos KDEL, que pode ser importante para realizar a sua atividade (Redinbo e Potter, 2005). Apesar de a fração purificada apresentar os maiores níveis enzimáticos, o volume de amostra de enzima necessário em cada ensaio é maior do que o das demais frações, o que dificultou repetir ensaios para caracterizá-la frente a mudanças de pH e temperatura. Além disso, ao ensaiarmos a atividade de hidrólise de carboxilesterase sobre p-NPP, observamos queda significativa da enzima nos microsossomos de fígado dos animais mantidos em hipoxia, com  $K_M$  duas vezes menor. A atividade sobre o p-NPP dos pacus mantidos em normoxia foi semelhante aquela observada por Gilham *et al.* (2003) em microsossomos de fígado de rato. No entanto, Gilham *et al.* (2003) mostraram que a lipase triacilglicerol hidrolase é responsável por essa atividade, embora Okazaki *et al.* (2006) relatar que esta enzima pertence a família das carboxilesterases. Mesmo que os ensaios com o Tween 20<sup>®</sup> não sejam tão reprodutivos como os ensaios com o p-NPP, os dados estão de acordo com os achados de von Tigerstrom e Stelmaschuk (1988) que mostraram que a atividade de CarbE da bactéria *Lysobacter enzymogenes* é cerca de 200 vezes maior utilizando o Tween como substrato.

O 4-hidroxinonenal (4-HNE) é um dos aldeídos formados quando da oxidação de fosfolipídios de membrana durante o estresse oxidante que ocorre quando o animal está em condições de hipoxia ou hiperoxia (Lushchak *et al.*, 2005; Jacobs e Marnett, 2009; Taylor e Moncada, 2009). Estudos feitos por Borazjani *et al.* (2011), mostraram que a atividades de esterase e lipase da CarbE humana são sensíveis ao 4-HNE em concentrações milimolares. Nossos resultados (tabelas 4 e 5) também mostram que as atividades de CarbE no soro e no microsossomo de fígado podem ser inibidas pelo 4-HNE. Isto sugere que o aumento de 4-HNE na hipoxia possa produzir 4-HNE bastante para ligar à CarbE, inibindo-a.

## CONCLUSÕES

- 1 - A sazonalidade não interfere na atividade clássica de carboxilesterase em microsomo de fígado, mas interfere na do soro.
- 2 - A atividade de carboxilesterase do soro é um bom biomarcador de hipoxia, em qualquer época do ano.
- 3 - Embora não apresente diferença significativa, os níveis de atividade de carboxilesterase no microsomo de fígado tendem a diminuir quando os animais são expostos à hipoxia.
- 4 - O aldeído 4-hidroxinonenal, cuja concentração aumenta por estresse oxidante resultante de hipoxia, inibe a atividade de CarbE sobre p-nitrofenil acetato no soro e a atividade sobre acil-CoA tanto no soro como nos microsomos dos fígado dos pacus.
- 5 - Considerando a atividade observada de carboxilesterase sobre Tween 20<sup>®</sup> e p-nitrofenil palmitato concluímos que esta enzima presente no soro e no microsomo de fígado pacu pode atuar como lipase.
- 6 - A diminuição dos níveis de atividade de CarbE em hipoxia é uma adaptação conveniente para o metabolismo de lipídios que ocorre em pacus sob baixa disponibilidade de oxigênio.

## REFERÊNCIAS

- ALDRIGDE, W.N. Two types of esterase (A and B) hydrolyzing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal*, United States, v. 53, p. 110-119, 1953.
- ALMEIDA-VAL, V.M.F. Evolutionary features of hypoxia tolerance in fish of the Amazon: from molecular to behavioral aspects. Disponível em: <<http://www-heb.pac.dfo-mpo.gc.ca/congress/2000/evolution/evolution.pdf>>. Acessado em 14/09/2010.
- ATOMI H.; IMANAKA, T. Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles. *Tetrahedron asymmetry*, England, v. 15, p. 2729-2735, 2004.
- ABOURJAILI, G.; SHTAYNBERG, N.; WETZ, R. *et al.* Current concepts in triglyceride metabolism, pathophysiology, and treatment. *Metabolism Clinical and Experimental*, England, v. 59, p. 1210-1220, 2010.
- BAFFI, M.A.; SOUZA, G.R.L.; SOUSA, C.S. *et al.* Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). *Molecular & Biochemical Parasitology*, England, v. 160, p. 70-73, 2008.
- BASTOS, V.L.F.C.; FOLLY, E.; ROSSINI, A. *et al.* Paraoxonase activity in liver of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Characidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Brazil, v. 15, n. 3, p. 677-685, 1998.
- BECKEMEIER, M.E.; BORA, P.S. Fatty acid ethyl ester: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, England, v. 30, p. 2487-2494, 1998.
- BLEICH, M.E.; SILVEIRA, R.M.L.; NOGUEIRA, F.M.B. Limnological patterns in northern Pantanal lagoons. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Brazil, v. 52, n. 3, p. 755-764, 2009.
- BONACCI, S.; BROWNE, M.A.; DISSANAYAKE, A. *et al.* Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, England, v. 49, p. 445-455, 2004.
- BORA, P.S.; GURUGE, B.L.; MILLER, D.D. *et al.* Purification and characterization of human heart fatty acid ethyl ester synthase/carboxylesterase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, England, v. 28, p. 2027-2032, 1996.
- BORAZJANI, A.; EDELMANN, M.J.; HARDIN, K.L. *et al.* Catabolism of 4-hydroxy-2-trans-nonanal by THP1 monocytes/macrophages and inactivation of carboxylesterases by this lipid electrophile. *Chemico-Biological Interactions*, Ireland, v. 194, p. 1-12, 2011.
- BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and applications in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, England, v. 26, p. 73-81, 2002.

- BRITSKI, H.A.; SILIMONS, K.Z.S.; LOPES, B. *Peixes do Pantanal: manual de identificação*. 2 ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2007. 227 p.
- CALCAGNOTTO, D.; DESALLE, R. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotropical Ichthyology*, Brazil, v. 7, n. 4, p. 607-616, 2009.
- CALIL, B.M. Automação de piscicultura em tanques artificiais. 2005. 42 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Taubaté, Taubaté, São Paulo, 2005.
- CHAHINIAN, H.; NINI, L.; BOITARD, E. *et al.* Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl ester and TAG. *Lipids*, Germany, v. 37, n. 7, p. 653-662, 2002.
- CHANDA, S.M.; MORTENSEN, S.R.; MOSER, V.C. *et al.* Tissue-Specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison. *Fundamental and Applied Toxicology*, England, v. 38, n. 2, p. 148-157, 1997.
- COZTANZO, J. P. A physiological basis of prolonged submergence in hibernating garter snakes *Thamnophis sirtalis*: evidence for an energy-sparing adaptation. *Physiological Zoology*, United States, v. 52, p. 580-592, 1989
- CYGLER M.; SCHRAG J. D.; SUSSMAN J. L. *et al.* Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Science*, United States, v. 2, p. 366-382, 1993.
- DE SMIDT, O.; DU PREEZ, J.C.; ALBERTY, J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Research*, European, v. 8, n. 7, p. 967-978.
- DIAZ, R.J.; BREITBURG, D.L. *The hypoxic environment*. In: Hipoxia: Fish physiology series. 1 ed, v. 27. England, Elsevier Inc., 2009, p. 1-23.
- DICZFALUZY M,A.; BJÖRKHEM, I.; EINARSSON, C. *et al.* Characterization of enzymes involved in formation of ethyl esters of long-chain fatty acids in humans. *Journal of Lipid Research*, United States, v. 42, p. 1025-1032, 2001.
- DIRKS, B.M.; BOYER, P.D. Nonenzymatic cleavage of p-nitrophenyl esters. *Cereal Chemistry*, United State, v. 90, p. 448-483, 1951.
- DOLINSKY, V.W.; GLHAM, D.; ALAM, M. *et al.* Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Switzerland, v. 61, p. 1633-1651, 2004.
- ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. *Chemistry of Plant Protection*, v. 6, p. 65-107, 1990.

FARRELL, A.P.; RICHARDS, J.G. *Defining hypoxia: an integrative synthesis of the responses of fish to hypoxia*. In: *Hypoxia: Fish Physiology Series*. 1 ed, v. 27. England, Elsevier Inc., 2009, p. 487-503.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A.M.P. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, United States, v. 88, p. 134-142, 2007.

FRANÇOIS H.; ZWINGELSTEIN G.; WEBER J-M. Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading. *American Journal Physiology*, United States, v. 273 n. 6, p. R2046-R2054, 1997.

GERSHATER, M.C.; EDWARDS, R. Regulating biological activity in plants with carboxylesterases. *Plant Science*, Ireland, v.173, p. 579–588, 2007.

GILHAM, D.; HO, S.; RASOULI, M. *et al.* Inhibitors of hepatic microsomal triacylglycerol hydrolase decrease very low density lipoprotein secretion. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, United States, v. 17, n. 12, p. 1685-1687.

GONÇALVES, F.C.; MERCANTE, M.A.; SANTOS, E.T. Hydrological cycle. *Brazilian Journal of Biology*, Brazil, v. 71, n. 1, 241-253, 2011.

GRAHAM, J.B. Ecological, evolutionary, and physical factors influencing aquatic animal respiration. *American Zoologist*, United States, v. 30, n. 1, p. 137-146, 1990.

HAMAN, F.; ZWINGELSTEIN G.; WEBER J-M. Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading. *The American Journal of Physiology*, United States, v. 273, n. 6, p. R2046-R2054, 1997.

HASHINOTSUME, M.; HIGASHINO, K.; HADA, T. *et al.* Purification and enzymatic properties of rat serum carboxylesterase. *Journal of Biochemistry*, England, v. 84, p. 1325-1333, 1978.

HAUBRUGE, E.; AMICHOT, M.; CUANY, A. *et al.* Purification and characterization of a carboxylesterase involved in malathion-specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, p. 1181-1190, 2002.

HERMES-LIMA M.; STOREY J. M.; STOREY K. B. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. *Cell and Molecular Responses to Stress*, edited by K. B. Storey and J. M. Storey, vol. 2, Protein adaptations and signal transduction. *Elsevier Press*, Amsterdam, p. 263-287, 2001

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Canada, v. 133, p. 537-556, 2002.

HERMMENT, A. C.; OTTO, T. C.; WIERDI, M. *et al.* Human carboxylesterase 1 stereoselectively binds the nerve agent cyclosarin and spontaneously hydrolyzes the nerve agent sarin. *Molecular Pharmacology*, United States, v. 77, n. 4, p. 508-516, 2010.

HOCHCHAKA, P.W.; LUTZ, P.L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Canada, v. 130, p. 435-459, 2001.

HOCHCHAKA, P.W.; BUCK, L.T.; DOLL, C.J. *et al.* Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, v. 93, n. 18, p. 9493-9498, 1996.

HOCKEL, M.; VAUPEL, P. Biological consequences of tumor hypoxia. *Seminars in Oncology*, United States, v. 28, n. 2, p. 36-41, 2001.

HOLMES, R.S.; COX, L.A.; VANDEBERG, J.L. Mammalian carboxylesterase 5: Comparative biochemistry and genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology part D: Genomics and Proteomics*, Canada, v. 3, p. 195-204, 2008.

HOSOKAWA, M. Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs. *Molecules*, Switzerland, v. 13, p. 412-431, 2008.

JACOBS, A.T.; MARNETT, L.J. Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress. *Accounts of Chemical Research*, United States, v. 43, n. 5, p. 673-683, 2010.

JOKANOVIĆ, M. Current understanding of the mechanisms involved in metabolic detoxification of warfare nerve agents. *Toxicology Letters*, Netherlands, v. 188, p. 1-10, 2009.

KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D. *et al.* Extracellular lipase of *pseudomonas sp.* strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, United States, v. 173, n. 15, p. 4836-4841, 1991.

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

LEHNER, R.; VERGER, R. Purification and characterization of a porcine liver microsomal triacylglycerol hydrolase. *Biochemistry*, United States, v. 36, n. 7, p. 1861-1868, 1997.

LI, B.; SEDLACEK, M.; MANOHARAN, I. *et al.* Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology*, England, v. 70, p. 1673-1684, 2005.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V.; LUSHCHAK, O.V. *et al.* Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Netherland, v. 37, p. 1319-1330, 2005.

LUSHCHAK, V.L.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Canada, v. 144, n. 3, p. 283-289, 2006.

LUSHCHAK, V.L.; BAHNJUKOVA, T.V.; STOREY, K.B. Effect of hypoxia on the activity and binding of glycolytic and associated enzymes in sea scorpion tissues. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Brazil, v. 31, p. 1059-1067, 1998.

LUSHCHAK, V. I.; LUSHCHAK, L.P.; MOTA, A. A. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *The American Journal of Physiology – regulatory, integrative and comparative physiology*, United States, v. 280, p. R100-R107, 2001.

LUTZ, P.L.; NILSSON, G.E. Contrasting strategies for anoxic brain survival – glycolysis up and down. *The Journal of Experimental Biology*, England, v. 200, 411-419, 1997.

MACHADO, F.A. História natural de peixes do Pantanal: com destaque em hábitos alimentares e defesa contra predadores. 2003. Tese (Doutorado em biologia) – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, 2003.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Human serum paraoxonase. *General Pharmacology*, Italy, v. 31, n. 3, p. 329-339, 1998.

MORGAN, E.W.; YAN, B.; GREENWAY, D. *et al.* Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hydrolase A and B). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, United States, v. 315, p. 495-512, 1994.

MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; LEWIS, C. E. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *Journal of Immunology*, United States, v. 175, n. 10, p. 6257-6263, 2005.

MUUSZE, B.; MARCON, J.; THILLART, G. *et al.* Hypoxia tolerance of Amazon fish respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronatus ocellatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Canada, v. 120, p. 151-156, 1998.

NIKINMAA, M. Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. *Respiration Physiology*, England, v. 128, p. 317-329, 2001.

NIKINMAA, M. Oxygen-dependent cellular functions—why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Canada, v. 133, p. 1-16, 2002.

NIKINMAA, M.; REES, B.B. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *The American journal of physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, United States, v. 288, p. 1079-1090, 2005.

NILSSON, G.E.; RENSHAW, G.M.C. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *The Journal of Experimental Biology*, England, v. 207, p. 3131-3139, 2004.



ODACI, D.; TIMUR, S.; TELEFONCU, A. Carboxyl esterase-alcohol oxidase based biosensor for the aspartame determination. *Food Chemistry*, England, v. 84, p. 493-496, 2004.

OKAZAKI, H.; IGARASHI, M.; NISHI, M. *et al.* Identification of a novel member of the carboxylesterase family that hydrolyzes triacylglycerol: A Potential Role in Adipocyte Lipolysis. *Diabetes*, v. 55, p. 2091-2097, 2006.

PACKMAN, P.M.; MEYER, D. A.; VERDUN, R. M.; Hazard of succinylcholine administration during electrotherapy. *Formerly Archives of General Psychiatry*, Germany, v. 35, n. 9, p. 1137-1141, 1978.

PETERSON, G.L.A. Simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, United States, v. 83, p. 346-356, 1977.

POTTER, V.R. *Tissues homogenates*, In: Methods in Enzymology. Ed. S. P. Colowick, N.O. Kaplan. United States, v. 1, p. 10-15, 1955.

POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; FARLAND, M.C. *A vida dos vertebrados*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1999. 798 p.

QUIROGA, A. D.; LEHNER, R. Liver triacylglycerol lipases. *Triglyceride Metabolism and Disease*, United States, v. 1821, n. 5, p. 762-769, 2012.

RANTIN, F.T.; GUERRA, C.D.R.; KALININ, A.L. *et al.* The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Canada, v. 119, p. 991-997, 1998.

REDINBO, M.R.; POTTER, P.M. Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug Discovery Today*, England, v. 10, n. 5, p. 313-325, 2005.

RODWAY, G.W.; HOFFMAN, L.A.; SANDERS, M.H. High-altitude-related disorders - part I: pathophysiology, differential diagnosis, and treatment. *Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care*, United States, v. 32, n. 6, p. 353-359, 2003.

SAINT-PAUL, U.; BERNARDINHO, G. Behavioural and ecomorphological responses of the neotropical pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalminidae) to oxygen-deficient waters. *Experimental Biology*, Germany, v. 48, n. 1, p. 19-26, 1988.

SALEM, R.O.; LAPOSATA, M. *Alcohol and fatty acid ethyl esters*. In: Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology. 1 ed. England, Elsevier Ltd., 2004, p. 1195-1207.

SALLES, J.B.; CUNHA BASTOS, V.L.F.; SILVA FILHO, M.V. *et al.* A novel butyrylcholinesterase from serum of *Leporinus macrocephalus*, a Neotropical fish. *Biochimie*, France, v. 88, p. 59-68, 2006.

SANCHEZ-HERNANDES, J.C.; MAZZIA, C.; CAPOWIEZ, Y. *et al.* Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, Canada, v. 150, p. 503-511, 2009.

- SATOH, T. Toxicological implications of esterases – From molecular structures to functions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, United States, v. 207, p. S11-S18, 2005.
- SATOH, T.; HOSOKAWA, M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-biological Interactions*, Ireland, v. 162, p. 195–211, 2006.
- SHOUBRIDGE, E.A.; HOCHACHKA, P.W. Ethanol: novel end product of vertebrate anaerobic metabolism. *Science*, United States, v. 209, n. 4453, p. 308-309, 1980.
- SIMÕES, A.F. Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e carboxilesterase na resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados. 2010. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SILVA, E.S. Carboxilesterase como biomarcador de hipoxia em peixes. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- SILVA FILHO, M.V. Sensibilidade in vitro da acetilcolinesterase cerebral ao metil-paration como critério de avaliação toxicológica em peixes. 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- SILVA, F.J.; SILVA, C.A. Feeding activity of the pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) reared in fish cages. *Bioikos*, Brazil, v. 26, n. 1, p. 35-42, 2012.
- SOARES, M.J.; CHAKRABORTY, D.; RENAUD, S.J. *et al.* Regularoty pathways controlling the endovascular invasive trophoblast cell lineage. *Journal of Reproduction and Development*, Japan, v. 58, n. 3, p. 283-287, 2012.
- SONI, K.G.; LEHNER, R.; METALNIKOV, P. *et al.* Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *The Journal of Biological Chemistry*, United States, v. 279, n. 39, 40683-40689, 2004.
- SOGORB, M.A.; GANGA, R.; VILANOVA, E. *et al.* Plasma phenylacetate and 1-naphthyl acetate hydrolyzing activities of wild birds as possible non-invasive biomarkers of exposure to organophosphorous and carbamate insecticides. *Toxicology Letters*, Netherlands, v. 168, p. 278-285, 2007.
- SONNA, L.A.; CULLIVAN, M.L.; SHELDON, H.K. *et al.* The effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HEPG2). *Physiological Genomics*, United States, v. 12, n. 3, p. 195-207, 2003.
- STOREY K.B. Tissue-specific controls on carbohydrate catabolism during anoxia in goldfish. *Physiological Zoology*, United States, v.60, p. 601–607, 1987.
- STOREY K. B.; STOREY J. M. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Quarterly Reviews in Biology*, United States, v. 65, p. 145–174, 1990.

STOREY, K.B.; STOREY, J.M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biological Reviews*, England, v. 79, p. 207-233, 2004.

TAYLOR, C.T.; MONADA, S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, United States, v. 30, n. 4, p. 643-647, 2010.

VAL, A. L.; SILVA, M. N. P.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: A never-ending task. *South African Journal of Zoology*, South African, v. 33, p. 107-114, 1998.

VAN WAVESVELD, J.; ADDINK, A. D. F.; VAN DEN THILLART, G. The anaerobic energy metabolism of goldfish determined by simultaneous direct and indirect calorimetry during anoxia and hypoxia. *Journal of Comparative Physiology*, United States, v. 159B, p. 263-268, 1989.

VIANEN, G.J.; OBELS, P.P.; VAN DEN THILLART, G.E.E.J.M. *et al.*  $\beta$ -Adrenoceptors mediate inhibition of lipolysis in adipocytes of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, United States, v. 282, p. E318-E325, 2002.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALMEIDA, E.A.; LÓPEZ-BAREA, J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, England, v. 145, p. 404-412, 2007.

VON TIGERSTRON, R.G.; STELMASCHUK, S. The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. *Canadian Journal of Microbiology*, Canada, v. 35, p. 511-514, 1988.

VON TIGERSTRON, R.G.; STELMASCHUK, S. Localization and characterization of lipolytic enzymes produced by *Lysobacter enzymogenes*. *Journal of General Microbiology*, England, v. 135, p. 1027-1035, 1989.

WEELock, C.E.; EDER, K.J.; WERNER, I. *et al.* Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, Finland, v. 74, p. 172-192, 2005.

WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle *Trachemys scripta elegans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, United States, v. 170, p. 177-185, 1997.

WU, R.S.S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, England, v. 45, p. 35-45, 2002.

XU, J.; LIU, Y.; CUI, S. *et al.* Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. *Aquacultural Engineering*, England, v. 35, p. 207-217, 2006.

YAN, B.; YANG, D.; BRADY, M. *et al.* Rat kidney carboxylesterase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Korea (South), v. 269, n. 47, p. 29688-29696, 1994.

ZHOU, B.S.; WU, R.S.S.; RANDALL, D.J. *et al.* Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *Journal of Fish Biology*, Scotland, v. 57, p. 1160-1171, 2000.