



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

Eduardo dos Santos Silva

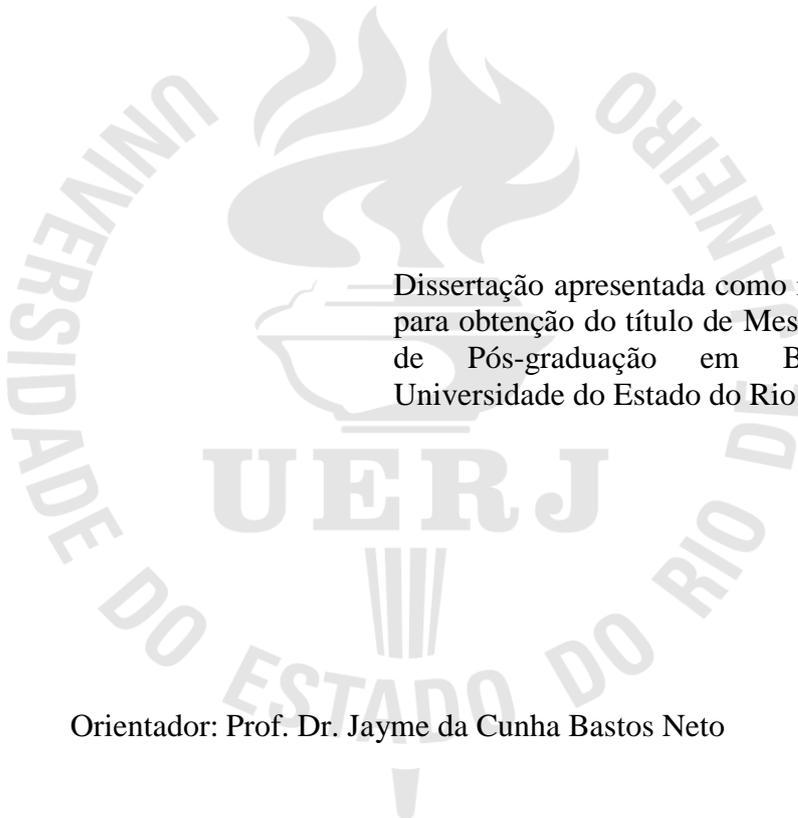
**Carboxilesterase como biomarcador de hipoxia em peixes**

Rio de Janeiro

2009

Eduardo dos Santos Silva

**Carboxilesterase como biomarcador de hipoxia em peixes**



—Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre 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

2009

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

S586 Silva, Eduardo dos Santos.  
Carboxilesterase como biomarcador de hipoxia em peixes / Eduardo dos Santos Silva. – 2009.  
68 f.

Orientador: Jayme da Cunha Bastos Neto.

Dissertação (Mestrado) - 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. Hipoxia 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 dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Eduardo dos Santos Silva

**Carboxilesterase como biomarcador de hipoxia em peixes**

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

Aprovada em 17 de fevereiro de 2009.

Orientador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

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

Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Cristina Paes  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Bosco de Salles  
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Rio de Janeiro

2009

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido o milagre da vida e por me permitir conhecer, viver e aprender ao lado de pessoas magníficas.

Aos meus pais por terem me apoiado desde sempre naquilo que eu mais gosto, que é estudar e ajudar as pessoas.

A Tayanne pelo amor, carinho e apoio nas horas difíceis e alegres e a toda sua família pelo apoio.

Aos amigos Renato Lopes, Aline e Allan Lopes, Rafael, Manildo, Frederico, Santiago, Artur, Laís, Bruna, Walter, Ana Maria, João Roberto, Cristiane e João Bosco pela convivência, alegria, ajuda e apoio.

Aos professores Lin, Roosevelt e Rojane, pelo companheirismo e indispensável ajuda.

Aos novos alunos Paulo, Pâmela, Ana Paula, Renata, Davi e Ana Cristina pelo apoio.

Ao Paulinho, as professoras Márcia Paes e Marsen e aos amigos do Departamento de Bioquímica.

Aos amigos da turma 2003/1 e aos professores Marcelo Guerra, Ana Angélica, e Regina da Faculdade de Formação de Professores (UERJ) pelos momentos únicos de aprendizado, alegria e apoio.

A Dr.<sup>a</sup> Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos pela sinceridade e apoio.

Ao meu orientador Dr. Jayme da Cunha Bastos por ter me acolhido calorosamente em seu laboratório e ter me dado a oportunidade de aprender, me livrar da besta fera e crescer tanto profissionalmente quanto como ser humano.

Ao Dr. Sérgio por disponibilizar o aparelho de gasometria.

Aos pescadores e ao senhor Luiz pela simpatia, ajuda e por ter disponibilizado o espaço e os peixes para este trabalho.

## RESUMO

SILVA, Eduardo dos Santos. *Carboxilesterase como biomarcador de hipoxia em peixes*. 2009. 68 f. Dissertação Mestrado (Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Quando as esterases acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE) e carboxilesterase (CarbE) hidrolisam ésteres de fosfato seus sítios ativos sofrem fosfatação inibitória. Por isto, tal fosfatação pode proteger seres vivos contra o espalhamento de xenobióticos organofosforados dentro de seus corpos, já que estas enzimas têm a capacidade de captar moléculas de pesticidas organofosforados estequiometricamente. Os organismos terrestres vivem em um ambiente com mais oxigênio do que os organismos aquáticos. Na água, quando o nível de oxigênio atinge aproximadamente 2,6 mg/L o ambiente está em hipoxia. Este fenômeno afeta ecossistemas aquáticos, uma vez que muitos organismos não conseguem se adaptar à baixa do oxigênio. Estudamos peixes em hipoxia e hiperoxia para entender melhor a bioquímica do funcionamento de suas enzimas captadoras de organofosforados quando eles estão expostos às variações físico-químicas de seus habitats. Dois grupos de no mínimo seis pacus (*Piaractus mesopotamicus*), seis peixes dourados (*Carassius auratus auratus*), seis tilápias (*Oreochromis niloticus niloticus*), seis piavussus (*Leporinus macrocephalus*), seis apaiaris (*Astronotus ocellatus*), ou seis carpas (*Cyprinus carpio carpio*) foram aclimatados à temperatura ambiente em dois aquários de 250 L. No primeiro aquário, pelo menos três animais “ensaio” de cada espécie sofreram hipoxia por diminuição da concentração de oxigênio até 0,5 mg/L através de borbulhamento de nitrogênio na água. Quando estes animais atingiram a hipoxia foram mantidos a 0,5 mg/L de oxigênio por 6, 8, 24 ou, no máximo, por 42 horas. Três peixes “controle” de cada espécie foram mantidos em normoxia (4,5 até 7,0 mg/L de oxigênio). Após estes tempos houve a retirada de cerca de 3,5 mL de sangue e dos fígados. Depois de coagular, o sangue foi centrifugado para retirada do soro sobrenadante, que foi usado como amostra para ensaios das esterases. Os fígados foram armazenados em freezer a -70 °C e, no momento do ensaio, homogeneizados e centrifugados para obter as frações citosólica e microsomal. As atividades das esterases foram ensaiadas em espectrofotômetro com os substratos acetiltiocolina, butiriltiocolina ou p-nitrofenilacetato. As atividades sobre p-nitrofenilacetato (CarbE) do soro e do fígado sofreram queda em todos os exemplares das espécies submetidos à hipoxia. Tipicamente, esta atividade caiu cerca de 50% nos soros de pacus mantidos por 42 h sob concentrações de oxigênio abaixo de 1,0 mg/L. O tempo para que ocorresse a queda desta atividade enzimática variou de espécie para espécie.

Palavras-chave: Carboxilesterase. Pacu. Hipoxia.

## ABSTRACT

SILVA, Eduardo dos Santos. *Carboxylesterase biomarker hypoxia in fish*. 2009. 68 f. Dissertação Mestrado em Biociências - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

When the esterases acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE) and carboxylesterase (CarbE) hydrolyze phosphate esters their active sites undergo inhibition by phosphorylation. Therefore, such phosphorylation may protect living beings against the spreading of organophosphates xenobiotics into their bodies, since these enzymes are capable of collecting organophosphate pesticide molecules stoichiometrically. Terrestrial organisms live in an environment with more oxygen than aquatic organisms. In water, once the level of oxygen reaches 2.6 mg/mL, the environment is a hypoxic one. This occurrence affects aquatic ecosystem, as many organisms cannot adapt to low oxygen availability. We have been studying fish exposed to hypoxia and hyperoxia in order to understand better the biochemistry of enzymes capable of picking up organophosphates when fish are exposed to changes in the physical-chemistry of their habitats. Two groups of at least six pacu (*Piaractus mesopotamicus*), six goldfishes (*Carassius auratus auratus*), six tilapias (*Oreochromis niloticus niloticus*), six piavussus (*Leporinus macrocephalus*), six oscars (*Astronotus ocellatus*) or six carps (*Cyprinus carpio carpio*) were acclimated in two aquariums of 250 L. In separate aquaria, at least three assay animals of each species suffered 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 6, 8, 24 or no more than 42 hours. Three control fish of each species were kept in normoxia (4.5 to 7 mg/mL of oxygen). Then, 3.5 mL of blood were withdrawn, fishes were sacrificed and their liver removed. After clotting, blood was centrifuged to remove the supernatant serum, which was used as a sample for assaying esterase activities. Livers were stored at -70 °C and, at the time of the enzyme assays, homogenized and centrifuged to obtain the cytosolic and microsomal fractions. Esterase activities were assayed using a spectrophotometer with the substrates acetylthiocholine, butyrylthiocholine or p-nitrophenylacetate. The serum and liver activities with p-nitrophenylacetate fell in all specimens subjected to hypoxia. Typically, in pacu kept for 42 h below 1.0 mg of oxygen per liter this activity dropped about 50%. The time required for the drop on enzyme activities varied from species to species.

Keywords: Carboxylesterase. Pacu. Hypoxia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.....	18
Figura 2 –	Ativação metabólica do organofosforado paration.....	20
Figura 3 –	Representação da inibição da acetilcolinesterase por um organofosforado.....	20
Figura 4 –	Mecanismo catalítico da carboxilesterase de mamíferos.....	22
Figura 5 –	<i>Leporinus macrocephalus</i> (piavussu).....	30
Figura 6 –	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu).....	30
Figura 7 –	<i>Carassius auratus auratus</i> (peixe-dourado).....	31
Figura 8 –	<i>Cyprinus carpio carpio</i> (carpa colorida).....	31
Figura 9 –	<i>Astronotus ocellatus</i> (apaiari).....	32
Figura 10 –	<i>Oreochromis niloticus niloticus</i> (tilápia).....	32
Figura 11 –	Esquema de normoxia e hipoxia em peixes.....	37
Figura 12 –	Esquema simplificado da homogeneização e centrifugação de fígado dos peixes para obter as frações.....	38
Figura 13 –	Atividade de carboxilesterase do soro de <i>Piaractus mesopotamicus</i> submetidos à hipoxia por 42 h.....	42
Figura 14 –	Atividade de carboxilesterase do homogeneizado de fígado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> submetidos à hipoxia por 42 h.....	42
Figura 15 –	Atividade específica de carboxilesterase do soro (A), do homogeneizado (B), das frações citosol (C) e microsomal (D) de fígado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> submetidos à hipoxia por 42 h.....	43
Figura 16 –	Atividade de carboxilesterase por mL de soro de <i>Carassius auratus auratus</i> submetidos à hipoxia por 6 h.....	44
Figura 17 –	Atividade de carboxilesterase por mL de soro de <i>Carassius auratus auratus</i> submetidos à hipoxia por 8 h.....	44
Figura 18 –	Atividade de carboxilesterase em homogeneizado de fígado de <i>Carassius auratus auratus</i> submetidos à hipoxia por 8 h.....	45

Figura 19 –	Atividade específica de carboxilesterase em soro (A) e homogeneizado de fígado (B) de <i>Carassius auratus auratus</i> submetidos à hipoxia por 8 h.....	46
Figura 20 –	Atividade de carboxilesterase de soro de <i>Oreochromis niloticus niloticus</i> submetidos à hipoxia por 6 h.....	47
Figura 21 –	Atividade de carboxilesterase em homogeneizado de fígado de <i>Oreochromis niloticus niloticus</i> submetidos à hipoxia por 6 h.....	47
Figura 22 –	Atividade específica de carboxilesterase em soro (A) e em homogeneizado de fígado (B) de <i>Oreochromis niloticus niloticus</i> submetidos à hipoxia por 6 h.....	48
Figura 23 –	Atividade de carboxilesterase do soro de <i>Oreochromis niloticus niloticus</i> .....	49
Figura 24 –	Atividade específica de carboxilesterase do soro de <i>Oreochromis niloticus niloticus</i> .....	49
Figura 25 –	Atividade de carboxilesterase do homogeneizado de fígado de <i>Oreochromis niloticus niloticus</i> submetidos à hipoxia por 12 h.....	50
Figura 26 –	Atividade de carboxilesterase por mL e específica do soro de <i>Leporinus macrocephalus</i> submetidos à hipoxia por 24 h.....	51
Figura 27 –	Atividade de carboxilesterase por grama de tecido e específica do homogeneizado de fígado de <i>Leporinus macrocephalus</i> submetidos à hipoxia por 24 h.....	51
Figura 28 –	Atividade de carboxilesterase por mL e específica do soro de <i>Astronotus ocellatus</i> submetidos à hipoxia por 24 h.....	52
Figura 29 –	Atividade de carboxilesterase por grama de tecido e específica do homogeneizado de fígado de <i>Astronotus ocellatus</i> submetidos à hipoxia por 24 h.....	52
Figura 30 –	Atividade de carboxilesterase por mL e específica do soro de <i>Cyprinus carpio carpio</i> submetidos à hipoxia por 24 h.....	53
Figura 31 –	Atividade de carboxilesterase por grama de tecido e específica do soro de <i>Cyprinus carpio carpio</i> submetidos à hipoxia por 24 h.....	54
Tabela 1 –	Comparação entre as atividades de carboxilesterase do soro dos animais estudados.....	55
Tabela 2 –	Comparação entre as atividades de carboxilesterase do fígado dos animais estudados.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	Acil-Coenzima A: acil transferase
AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
AcCoA	Acetilcoenzima A
ARNT	Translocador nuclear do receptor de arila
ASR	Respiração da superfície aquática
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina-trifosfato
BChE	Butirilcolinesterase
CAT	Colina acetiltransferase
CarbE	Carboxilesterase
ChE	Colinesterase
CES	Carboxilesterase
CoASH	Coenzima A
c-DNA	Ácido desoxirribonucleico Complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CPT-11	Irinotecan
CYP	Citocromo
DFP	Diisopropilfosforofluoridato propil
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAEE	Ésteres etílicos de ácidos graxos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Glu	Ácido glutâmico
GLUT-1	Transportador de glicose 1
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEPG2	Hepatócitos humanos
Hep3B	Hepatoma humano
hiCarbE	Carboxilesterase de intestino delgado humano
HIF	Fator induzido por hipoxia (hypoxia-inducible factor)
HIF-1 $\alpha$	Fator induzido por hipoxia 1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ )
HIF-2 $\alpha$	Fato induzido por hipoxia 2 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ )

HIF-3 $\alpha$	Fator induzido por hipoxia 3 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 3 $\alpha$ )
HIF- $\beta$	Fator induzido por hipoxia $\beta$ (hypoxia-inducible factor $\beta$ )
His	Histidina
HRE	Elementos de resposta à hipoxia
HSL	Lipase hormônio sensível (Hormone-sensitive lipase)
IBD	Doenças inflamatórias do intestino (Inflammatory bowel disease)
IUB	União Internacional de Bioquímica
KDEL	Lisina-aspartato-glutamato-leucina (KDEL)
LDH	Lactato desidrogenase
LDH-A	Lactato desidrogenase A
LDH-B	Lactato desidrogenase B
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
Leu	Leucina
Lis	Lisina
LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ODD	Degradação dependente de oxigênio
p-NPA	p-nitrofenilacetato
PON	Paraoxonase
PON1	Paraoxonase do soro humano
Ser	Serina
SN-38	Forma ativa do irinotecan
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

## LISTA DE SÍMBOLOS

mg	Miligrama
L	Litro
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
K <sup>+</sup>	Íon potássio
h	Hora
min	Minuto
%	Porcentagem
ppm	Partes por milhão
°C	Grau Celsius
nm	Nanômetro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
U	Unidade
CO <sub>2</sub>	Molécula de gás carbônico
β	Beta
α	Alfa
±	Mais ou menos
cm	Centímetro
g	grama
M	Molar
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Rotação por minuto
g	Gravidade
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mmol	Milimol
mmHg	Milímetro de mercúrio
*	Asterisco
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Molécula de superóxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Molécula de peróxido de hidrogênio

$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxil
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlet
$\text{NO}$	Molécula de óxido nitroso
$\text{ONOO}$	Molécula de peroxinítrico

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
1.1	<b>Esterases</b> .....	16
1.1.1	<u>Colinesterase</u> .....	17
1.1.2	<u>Carboxilesterases</u> .....	21
1.2	<b>Hipoxia</b> .....	25
1.2.1	<u>Adaptações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas</u> .....	25
1.2.2	<u>HIF: regulador de adaptações a hipoxia</u> .....	28
1.3	<b>Animais estudados</b> .....	30
1.3.1	<u>Characiformes <i>Leporinus macrocephalus</i> Garavello &amp; Britski, 1988 e <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)</u> .....	30
1.3.2	<u>Cipriniformes <i>Carassius auratus auratus</i> (Linnaeus, 1758) e <i>Cyprinus carpio carpio</i> Linnaeus, 1758</u> .....	31
1.3.3	<u>Perciformes <i>Astronotus ocellatus</i> Agassiz, 1831 e <i>Oreochromis niloticus niloticus</i> (Linnaeus, 1758)</u> .....	32
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	34
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	34
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
3.1	<b>Animais</b> .....	35
3.2	<b>Equipamentos</b> .....	35
3.3	<b>Experimentos de hipoxia</b> .....	36
3.4	<b>Preparo de soro</b> .....	37
3.5	<b>Preparo dos homogeneizados teciduais</b> .....	37
3.6	<b>Determinação da quantidade de proteínas</b> .....	39
3.7	<b>Determinação de lactato no sangue</b> .....	39
3.8	<b>Ensaio enzimático da carboxilesterase</b> .....	39
3.9	<b>Análises estatísticas</b> .....	40
4	<b>RESULTADOS</b> .....	41
4.1	<b><i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)</b> .....	41
4.2	<b><i>Carassius auratus auratus</i> (Linnaeus, 1758)</b> .....	43

4.3	<i>Oreochromis niloticus niloticus</i> (Linnaeus, 1758).....	46
4.4	<i>Leporinus macrocephalus</i> Garavello & Britiski, 1988.....	50
4.5	<i>Astronotus ocellatus</i> Agassiz, 1831.....	51
4.6	<i>Cyprinus carpio carpio</i> Linnaeus, 1758.....	52
4.7	Comparação entre as atividades de carboxilesterase.....	54
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63

## INTRODUÇÃO

Os organismos vivos possuem diversas enzimas capazes de hidrolisar ésteres de ácidos carboxílicos. Ao longo da evolução, de acordo com as mudanças do ambiente, estas enzimas sofreram alterações genéticas, que resultaram em funções e localizações distintas. Apesar de apresentarem um alto grau de semelhança em relação aos seus sítios ativos, cada uma desenvolveu uma especificidade frente ao seu substrato. Tais enzimas, chamadas de esterases, têm papéis importantes no organismo participando do metabolismo de xenobióticos, de drogas e de lipídios, do controle de impulso colinérgico e também da ativação de drogas e pró-drogas. Estas funções fazem com que as esterases sejam reconhecidas e estudadas amplamente em diversas áreas como toxicologia, bioquímica, farmacologia e clínica médica.

Uma das funções clássicas de um grupo de esterases é modular o impulso nervoso pelo fato de catalisarem reações que tenham neurotransmissores colinérgicos como substrato. Isso faz com que tais esterases estejam distribuídas principalmente no sistema nervoso de todas as espécies de organismos (Eto, 1990). Alguns estudos mostram que algumas esterases estão envolvidas no processo de lipólise do tecido adiposo e no metabolismo do colesterol, podendo ser importante no combate às doenças cardiovasculares. Outros mostram que esterases estão associadas com lipoproteínas, impedindo que ocorra acúmulo de gordura nas paredes dos vasos sanguíneos, protegendo contra doenças cardiovasculares (Redinbo & Potter, 2005). Uma vez que algumas estão envolvidas no metabolismo de drogas e pró-drogas elas são usadas como ativadoras de fármacos que atuam em células cancerígenas. Além disso, as esterases podem ser usadas no tratamento de pessoas sob overdose causada por drogas como a cocaína e a heroína porque algumas podem catalisar a clivagem desses compostos (Redinbo & Potter, 2005). Como as esterases catalisam a hidrólise de vários compostos artificiais, elas também são comumente estudadas no que se refere ao metabolismo de xenobióticos, pois algumas são inibidas por eles e outras têm efeito protetor hidrolisando-os.

Os organofosforados foram utilizados como armas químicas durante a Segunda Guerra Mundial e, poucos anos depois, usados como inseticidas no combate de pragas na agricultura. Entretanto, não só insetos, fungos e plantas, mas uma série de grupos de organismos, inclusive os mamíferos, é sensível aos organofosforados. Ao utilizar agrotóxicos na agricultura, o ambiente é normalmente o destino final desses compostos devido às grandes quantidades usadas. Grande parte do xenobiótico usado pode ser carregada pela água da

chuva, cair em rios e entrar no lençol freático poluindo a água potável da região, dentre outros impactos ambientais (Eto, 1990; Casida & Quistad, 2005).

O ambiente aquático recebe poluentes de vários tipos, níveis e natureza. Os lançamentos vão desde esgoto doméstico até metais pesados como o chumbo, mercúrio e cádmio. Com isso, ocorrem mudanças do ambiente que fazem com que as espécies se adaptem para sobreviver. Entretanto, nem todas as formas de vida conseguem se adaptar a essa pressão ambiental e a extinção de determinada espécie pode ocorrer, o que diminuirá a biodiversidade de uma região. As estratégias para que os organismos aquáticos sobrevivam em ambientes poluídos são diversas, mas nunca completamente eficientes, já que a exposição crônica a alguns tipos de xenobióticos pode causar danos irreversíveis a um organismo ou até a um ecossistema inteiro. Os xenobióticos, por serem compostos lipofílicos, podem ser absorvidos facilmente pelo organismo através da pele, pulmão ou trato gastrointestinal. Para ser excretado, o xenobiótico precisa ser convertido em um composto que seja solúvel em água. Esta conversão, conhecida como biotransformação, é um processo catalisado por várias enzimas, dentre elas as esterases, que estão presentes no fígado e em outros tecidos. Qualquer dano nas enzimas que participam da biotransformação pode fazer com que o organismo morra, dependendo da concentração de xenobiótico absorvida, da sua natureza química e da sua meia vida. Vários estudos com vertebrados mostram que carbamatos e organofosforados, que são compostos usados na agricultura, inibem a atividade de esterases (Jokanović, 2001).

Outro fator de grande importância e que modifica as estratégias de sobrevivência de várias formas de vida, tanto aquáticas quanto terrestre, é a hipoxia. Um ambiente aquático está em hipoxia quando a concentração de oxigênio dissolvido é menor do que 2,8 mg/L (Diaz & Rosenberg, 1995). A hipoxia pode ser um fenômeno natural derivado da estratificação vertical ou, como vem ocorrendo nos últimos anos, causado pela ação antrópica por conta da entrada de matéria orgânica na água. Sendo assim, a hipoxia é um fenômeno que afeta grandes extensões das águas de todo o mundo. Entretanto, muitos organismos possuem diversas estratégias de adaptação que os tornam aptos a sobreviverem por determinado tempo sob hipoxia. Vertebrados como peixes e algumas espécies de tartarugas conseguem passar semanas em ambiente hipóxico ou anóxico, enquanto mamíferos são muito mais sensíveis às variações de oxigênio. Além dos vertebrados, animais invertebrados como poliquetas e planárias também se adaptam as condições de hipoxia (Wu, 2002). Cada espécie se adapta, conforme o seu metabolismo, ao ambiente em hipoxia com mudanças moleculares, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e comportamentais (Wu, 2002).

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Esterrases

As esterases são uma família de enzimas cuja caracterização catalítica individual está baseada na especificidade para o seu substrato. São sintetizadas principalmente pelo fígado e encontradas em vários tecidos. Nas células, as esterases estão associadas a organelas, como o retículo endoplasmático, de onde podem ser excretadas para o plasma (Satoh, 2005; Chahinian *et al.*, 2002). Assim, as esterases são chamadas carboxilesterases, colinesterases e paraoxonases de acordo com o substrato que sofre hidrólise. Aldridge (1953) classificou as esterases de acordo com o grau de afinidade com os organofosforados. As esterases do tipo A preferem grupos arilas ligados à carbonila dos carboxilésteres e hidrolisam ésteres de organofosforados. As do tipo B preferem grupamentos alquilas 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. As colinesterases (ChE) e carboxilesterases (CarbE) são esterases do tipo B. As paraoxonases (PON) são enzimas do tipo A; não são inibidas por organofosforados (Mackness *et al.*, 1998).

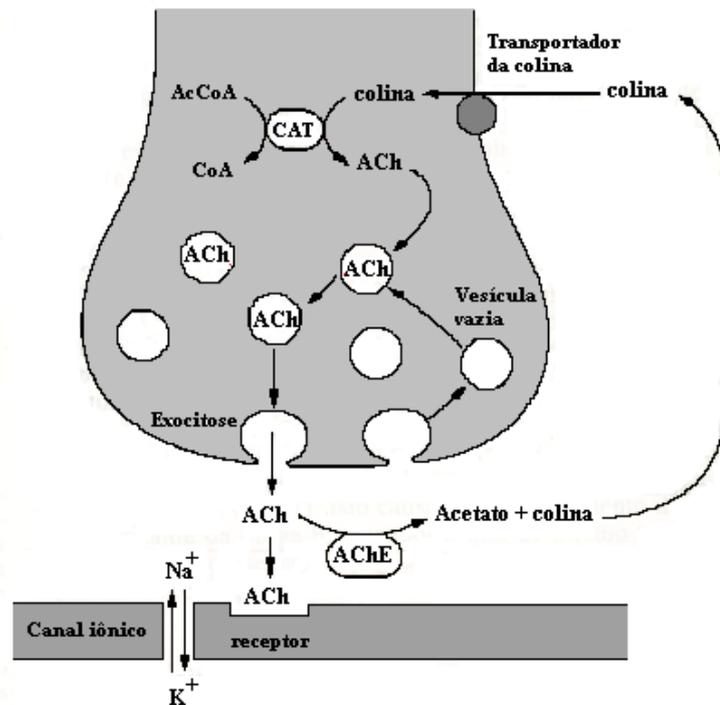
As colinesterases e carboxilesterases são conhecidas comumente como serino-esterases devido apresentarem a serina como o aminoácido mais importante da tríade catalítica de aminoácidos glutamato, serina e histidina presentes em seu sítio ativo. Durante a hidrólise, o grupo -OH do resíduo de serina exerce um ataque nucleofílico e reage com o substrato éster gerando, pela adição posterior de uma molécula de água, um ácido e um álcool (Satoh, 2005). Os compostos organofosforados podem inibir as serino-esterases quando o grupamento serina do sítio ativo da enzima exerce um ataque nucleofílico ao grupo fosfato do xenobiótico, o que termina por impedir que a molécula de água participe da reação e libere o fosfato (Eto, 1990). Por outro lado, as paraoxonases possuem alta afinidade pelo organofosforado paraoxon, hidrolisando-o e exercendo uma função desintoxicante do organismo (Mackness *et al.*, 1998).

### 1.1.1 Colinesterases

O termo colinesterase foi proposto quando Stedman *et al.* (1932) demonstraram que existiam enzimas no soro de cavalo que hidrolisavam os substratos acetilcolina e butirilcolina. As colinesterases são representadas por duas enzimas: a acetilcolinesterase (AChE) (E.C 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE) (E.C 3.1.1.8) ou pseudoesterase. A acetilcolinesterase é encontrada na membrana de eritrócitos, nas fendas sinápticas de tecidos nervosos e nas junções neuromusculares. A butirilcolinesterase é sintetizada no fígado e secretada para o plasma (Lejus *et al.*, 1998).

A AChE participa da transmissão do impulso nervoso nas fendas sinápticas pela hidrólise da molécula acetilcolina (ACh). Quando ocorre um estímulo nervoso um canal de cálcio é aberto permitindo a entrada de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) estimulando a excitose de vesículas pré-sinápticas contendo moléculas de ACh que são liberadas nas junções neuromusculares, nas fendas pré-ganglionares e parassimpáticas, nas sinapses dos terminais das fibras nervosas pós-ganglionares parassimpáticas e nas sinapses do sistema nervoso central para se ligarem aos seus receptores no neurônio seguinte. Neste momento, a AChE cliva as acetilcolinas liberando moléculas de colina (que são captadas pela membrana pré-sináptica) e de acetatos. Isto impede que ocorra acúmulo do neurotransmissor regulando os níveis de acetilcolina (Lejus *et al.*, 1998) (Figura 1). A BChE também catalisa a hidrólise de ésteres de colina, entretanto não possui um papel fisiológico definido. Os estudos utilizando a BChE estão relacionados com a sua ação catalítica frente a anestésicos como os relaxantes musculares succinilcolina e mivacúrio. Entretanto, estudos recentes sugerem que a BChE é expressa numa populações de neurônios em que apresenta função de correguladora da neurotransmissão colinérgica e que pode estar envolvida com o desenvolvimento do sistema nervoso (Darvesh *et al.*, 2003).

Figura 1: Esquema da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase



Legenda: Na figura: acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase (AChE), acetilcoenzima A (AcCoA), coenzima A (CoASH) e colina acetiltransferase (CAT).

Fonte: Baseado em Rang *et al.*, 2001.

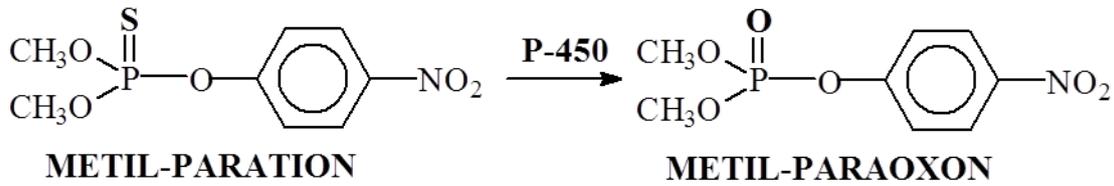
Além das funções colinérgicas, sugere-se que as colinesterases estão envolvidas no processo de adesão célula-célula devido ao grau de homologia entre a AChE e a família de proteínas de adesão celular sináptica (neurogilingina) (Grisaru *et al.*, 1999; Layer *et al.*, 2005). Entretanto, quando o gene da AChE é suprimido inteiramente em camundongos, o desenvolvimento do sistema nervoso e o estabelecimento das conexões neuronais não são alterados e nem ocorrem anomalias morfológicas em seu cérebro (Massoulié *et al.*, 2008).

As colinesterases podem regular sua expressão antagonicamente. Em estudos inserindo um gene nocauteado de BChE em uma linha de células precursoras de retina em ratos, a AChE sofre aumento significativo de sua atividade, enquanto na ausência de AChE, a BChE pode hidrolisar a acetilcolina protegendo o sistema colinérgico (Darvesh *et al.*, 2003; Layer *et al.*, 2005). As BChE também podem estar envolvidas com patologias neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Estudos mostram que pacientes que apresentam a doença e que possuem deficiência em expressar a BChE tem melhores respostas cognitivas do que pacientes normais. A hipótese sugerida é que o cérebro deficiente de BChE é capaz de manter

a acetilcolina em níveis normais por um período mais longo devido a baixa atividade de BChE resultar em menor consumo de acetilcolina (Layer *et al.*, 2005; Duysen *et al.*, 2007).

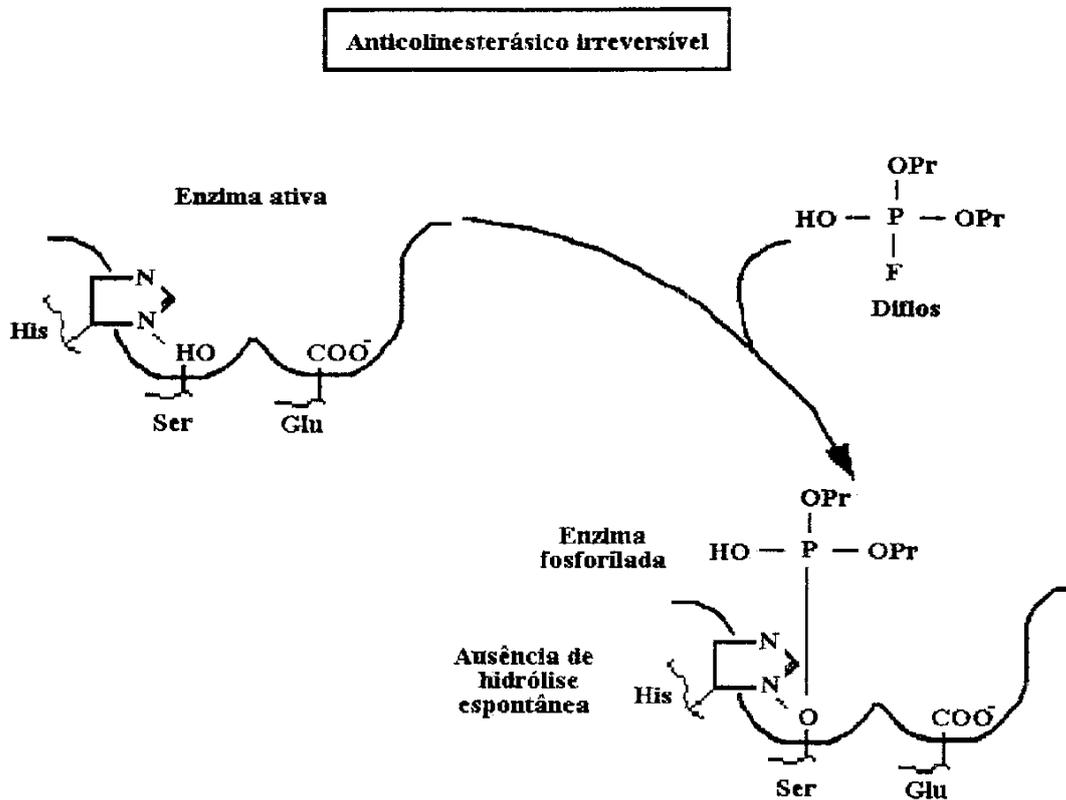
As colinesterases podem ser inibidas por compostos xenobióticos organofosforados (herbicidas, fungicidas e inseticidas) e carbamatos. Os compostos organofosforados podem inibir a AChE fosfatando o seu sítio ativo. A desintoxicação ocorre lentamente resultando na acumulação, em níveis tóxicos, de acetilcolina nas fendas sinápticas. A inibição por carbamatos ocorre de maneira semelhante, porém a descarboxilação do sítio ativo da enzima é mais rápida (Eto, 1990). Quando um organofosforado é absorvido pelo organismo, devido suas propriedades lipofílicas, o composto cai na corrente sanguínea e vai para as células hepáticas. Nessas células existe uma família de enzimas chamadas de citocromos P450 (CYP) que, atuando como mono-oxigenases, realizam a primeira fase de biotransformação de xenobióticos ao trocarem o átomo de enxofre (P=S) do organofosforado por um átomo de oxigênio (P=O) (reação de dessulfuração oxidante) tornando a molécula mais solúvel no meio aquoso para ser eliminada na urina (figura 2). Entretanto, quando o xenobiótico é biotransformado, o seu novo grupamento fosfato é capaz de inibir fortemente as colinesterases (figuras 2 e 3) (Eto, 1990; Jokanović, 2001). O organofosforado Folidol 600<sup>®</sup> tem como pré-droga o metilparation, que se transforma em metilparaaxon, sua forma ativa, pela ação dos CYP-450, como mostrado na figura 2. O Folidol é amplamente utilizado como pesticida na agricultura para o controle de pragas e nas pisciculturas como remédio para o controle de parasitas de peixes. Infelizmente, os níveis usados desses organofosforados estão geralmente acima do permitido e são tóxicos para peixes (Aguiar, 2004). Muitos trabalhos mostram as colinesterases usadas como biomarcadores dos organofosforados nos organismos aquáticos. Pathiratne & George (1998) mostraram que tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a 3 ppm do inseticida organofosforado malation durante 24 h apresentaram 90% de inibição da atividade de AChE no cérebro. Outro estudo mostra matrinxãs (*Brycon cephalus*) expostos a 2 ppm de Folidol 600<sup>®</sup> por 96 h sofrendo inibição de 87% da atividade de AChE do cérebro. Já foi publicado que as atividades de AChE em peixes neotropicais expostos a organofosforados podem variar de espécie para espécie (Aguiar *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007). Além do uso de AChE de peixes como biomarcadores de pesticidas, as AChE de invertebrados, como moluscos e poliquetas, também são sensíveis a organofosforados podendo ser usadas para biomarcar a exposição destes animais a xenobióticos (Bonacci *et al.*, 2004; Hannam *et al.*, 2008; Laguerre *et al.*, 2009).

Figura 2: Ativação metabólica do organofosforado paration



Fonte: Jokanović 2001.

Figura 3: Representação da inibição da acetilcolinesterase por um organofosforado



Fonte: Rang *et al.*, 2001.

Proteínas humanas podem fornecer proteção ao captarem compostos organofosforados antes que possam reagir com o alvo AChE. O tempo para a inativação ocorrer deve ser anterior ao necessário para as AChE serem afetadas, cerca de 2 min após a exposição de humanos a organofosforados (Heffron & Hobbiger, 1979). Com isso, para identificar

candidatos a limpadores biológicos (“*bioscavenger*”) alguns estudos têm focado primeiramente as BChE derivadas de plasma humano (Lenz *et al.*, 2007).

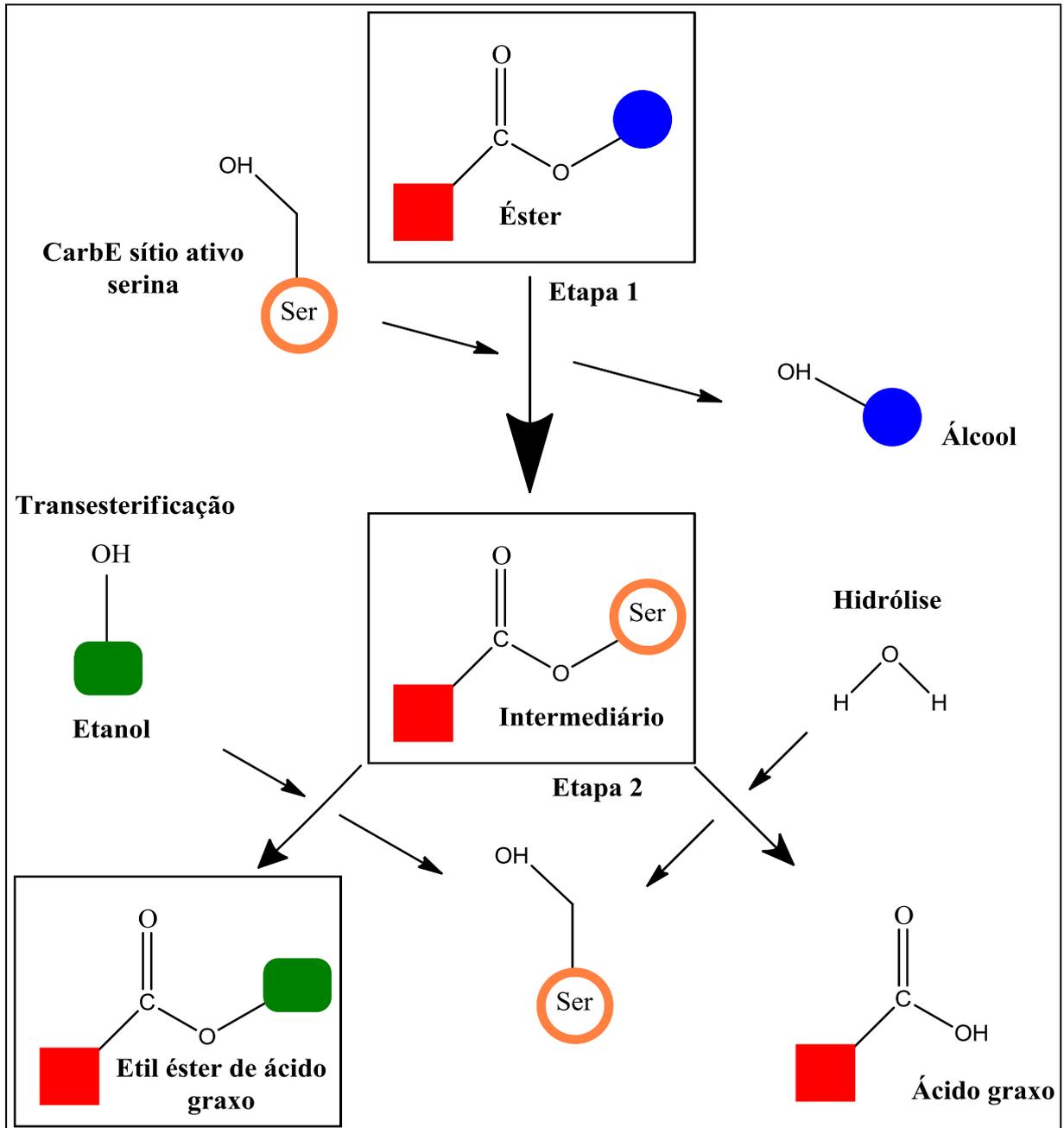
### 1.1.2 Carboxilesterase

As carboxilesterases (E.C 3.1.1.1) são enzimas serino-hidrolases, como as colinesterases. São encontradas em várias classes de organismos, desde bactérias até os seres humanos. As CarbE são ditas esterases não específicas por hidrolisarem qualquer éster carboxílico. As CarbE hidrolisam tais ésteres carboxílicos em ácido orgânico e álcool. As CarbE estão expressas em muitos tecidos como o fígado, rim, intestino delgado, pulmão, tecido adiposo e cérebro. Estudos recentes mostram que CarbE não está presente no plasma humano, mas que se encontra em plasma de tigre, rato, camundongo, coelho, cavalo e gato (Li *et al.*, 2005). As CarbE estão ancoradas no retículo endoplasmático das células hepáticas através de uma sequência de aminoácidos Lis-Asp-Glu-Leu (KDEL) presente em seu C-terminal. Esta sequência de aminoácidos pode ser clivada permitindo a liberação e secreção da enzima para o citosol ou para o exterior da célula (Redinbo & Potter, 2005; Satoh & Hosokawa, 2006).

A classificação das CarbE ainda é bastante discutida devido a enzima não apresentar especificidade para um substrato. Estudos recentes mostram que as CarbE estão envolvidas com o metabolismo de xenobióticos fornecendo evidências de múltiplas formas da enzima. De acordo com a classificação da União Internacional de Bioquímica (IUB) as CarbE exibem propriedades de carboxilesterase e de lipases (Satoh & Hosokawa, 2006). Baseando-se na alta homologia, sequência genética e similaridade de características das isoenzimas de CarbE de fígado de humanos, estes autores classificaram estas esterases em cinco subfamílias: CES 1, CES 2, CES 3, CES 4 e CES 5.

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 4), sendo que na primeira a serina do sítio ativo da enzima se liga a um substrato éster liberando álcool e formando um intermediário éster da serina. Na segunda etapa pode ocorrer uma transesterificação, quando então a porção éster do intermediário formado se liga a um álcool do meio, ou ocorrer a entrada de uma molécula de água, que dará origem a liberação de um ácido orgânico (Redinbo & Potter, 2005).

Figura 4: Mecanismo catalítico da carboxilesterase de mamíferos



Fonte: Redinbo & Potter 2005.

Diversas funções são apontadas para as CarbE. Elas participam do metabolismo de drogas, pré-drogas, drogas antitumorais e narcóticos, como a cocaína e heroína, tendo um importante papel farmacocinético e metabólico (Holmes *et al.*, 2008). As CarbE também estão envolvidas no metabolismo de lipídios porque hidrolisam ésteres de colesterol com ácidos graxos de cadeia curta e longa (Soni *et al.*, 2004; Okazaki *et al.*, 2006; Satoh & Hosokawa,

2006) e podem, ainda, assim como as BChE, captar organofosforados e inseticidas carbamatos (Redinbo & Potter, 2005; Satoh & Hosokawa, 2006).

O número de trabalhos utilizando a CarbE de peixes como biomarcadores de exposição a organofosforados e carbamatos vem crescendo. O organofosforado paration e o diisopropilfosforofluoridato (DFP) são potentes inibidores da CarbE *in vivo* em ratos (Dettbarn *et al.*, 1999). 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), o que sugere 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 sua 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 pareceu proteger as colinesterases cerebrais do animal.

Uma isoenzima da CarbE chamada egasina está associada à  $\beta$ -glicuronidase em microsomas 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. Com isso, a atividade de  $\beta$ -glicuronidase passa a ser um bom marcador de exposição a organofosforados e é muito mais sensível do que a inibição da AChE em ratos (Satoh & Hosokawa, 2006).

As CarbE também vêm sendo usadas como agentes terapêuticos para combater tumores malignos de humanos. Elas podem converter o fármaco anticancerígeno irinotecan (CPT-11) na sua forma ativa, o SN-38, um potente inibidor da topoisomerase I. Esta droga é usada no tratamento de câncer de cólon em adultos porque depois de ativada impede que a topoisomerase I modifique o DNA da célula. Porém, administrada em altas doses, pode ter efeito tóxico, provocando diarreia nos pacientes devido à alta atividade da CarbE expressa no intestino delgado (hiCarbE). Além disso, também pode causar síndrome colinérgica ao inibir a AChE. No entanto, somente 5% da pré-droga CPT-11 é convertida em SN-38 (Hyatt *et al.*, 2005; Redinbo & Potter, 2005; Matzow *et al.*, 2007) porque nas células tumorais, hipóxicas, a atividade de CarbE é menor do que em células normais. Para aumentar a atividade da CarbE nestas células, são realizados estudos de transferência *in vivo* utilizando um vetor adenoviral contendo o cDNA das CarbE de fígado de coelho ou de humano (apesar de ser menos eficiente que a CarbE do coelho) para aumentar o efeito citotóxico do CPT-11 (Guichard *et*

*al.*, 1999; Redinbo & Potter, 2005; Matzow *et al.*, 2007). A atividade de CarbE também está diminuída em células tumorais de fígado e mama (Lund-Pero *et al.*, 1994) e essa diminuição deve ter implicações no processo inflamatório visto que a enzima é encontrada em macrófagos e monócitos (Stadnyk *et al.*, 1990; Munger *et al.*, 1991). Além disso, é sabido que fatores de transcrição gênica da CarbE estão inibidos em hepatócitos humanos, fazendo com que a enzima seja pouco expressa (Sonna *et al.*, 2002).

O colesterol possui inúmeras funções importantes, mas em níveis elevados é danoso para a saúde. O colesterol é produzido principalmente no fígado e no intestino, podendo ser exportado do fígado nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e do intestino nos quilomícrons. As lipoproteínas de densidade baixa (LDL), originadas depois da perda de triacilgliceróis das VLDL, se em excesso junto às paredes arteriais, podem ser oxidadas. Esta oxidação pode ativar um mecanismo de defesa que acione macrófagos que, ao fagocitarem as moléculas de LDL as transformam em ésteres de colesterol pela atividade da acilCoA-acilcolesterol transferase (ACAT). Ao fagocitarem as moléculas de LDL, os macrófagos e as células musculares lisas dos vasos sanguíneos se transformam em “foam cells” (células espumosas) formando placas ateroscleróticas, diminuindo o calibre dos vasos sanguíneos e podendo causar problemas, como o infarto. Provavelmente as CarbE, que são capazes de catalisar a reação inversa da ACAT, diminuiriam o excesso de ésteres de colesterol dos vasos sanguíneos, protegendo o organismo contra a aterosclerose (Redinbo & Potter, 2005).

As CarbE apresentam função importante no tecido adiposo. A lipólise nos adipócitos ocorre por meio de uma proteína lipase hormônio sensível (HSL) que controla muitas reações do tecido adiposo branco. Entretanto, camundongos com deficiência de HSL apresentam taxas lipolíticas basais maiores que camundongos normais. Estudos recentes mostraram que as CarbE são as principais lipases do tecido adiposo, pois apresentam atividade sobre moléculas de triacilgliceróis, contribuindo para o processo de lipólise, impedindo que o acúmulo de lipídios cause doenças como obesidade, diabetes e aterosclerose (Soni *et al.*, 2004; Okazaki *et al.*, 2006).

O consumo crônico de álcool, além de produzir acetaldeído e acetato, pode induzir a formação de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE, *fatty acid ethyl esters*) por ação de enzimas, dentre elas as CarbE, no fígado, pâncreas, tecido adiposo e coração. Os ácidos graxos presentes no citosol reagem com o etanol formando moléculas de FAEE que se acumulam na membrana interna da mitocôndria. Quando esses compostos se acumulam 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. As

CarbE também podem fazer a reação inversa em algumas moléculas de FAEE dentro da mitocôndria, liberando ácidos graxos. É interessante ressaltar que já foi publicado que ácidos graxos livres em concentrações baixas, por volta de 5  $\mu\text{M}$ , também são desacopladores da fosforilação oxidativa (Beckemeier & Bora, 1998; Redinbo & Potter, 2005; Satoh & Hosokawa, 2006).

## 1.2 Hipoxia

### 1.2.1 Adaptações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas

A hipoxia é definida quando a concentração de oxigênio é menor do que 2,8 mg/L ou 2,8 ppm (Diaz & Rosenberg, 1995). O fenômeno de hipoxia pode ser natural ou provocado pela entrada de nutrientes e matéria orgânica em águas de baixa circulação. Atualmente a hipoxia afeta milhares de  $\text{km}^2$  de águas marinhas, sendo um fenômeno comum em áreas costeiras, baías e estuários, o que pode causar problemas ecológicos decorrente de morte em massa de peixes e de animais marinhos. A concentração de oxigênio da água é 30.000 vezes menor do que a do ar e a sua taxa de difusão é 10.000 vezes mais lenta. Ademais, vários fatores ambientais podem mudar a concentração de oxigênio na água, como temperatura, salinidade, profundidade e a vegetação (Wu, 2002; Nikinmaa & Ress, 2005).

Com mais de 25.000 espécies descritas, ocupando uma variedade de ambientes, os peixes são o grupo mais diverso dentre os vertebrados. O surgimento desses animais ocorreu no período Cambriano, cerca de 500 milhões de anos atrás. Os peixes teleósteos, o maior grupo, têm evoluído independentemente da linhagem dos vertebrados tetrápodes há pelo menos 350 milhões de anos. A evolução dos teleósteos fez o grupo criar adaptações para viver em diferentes ambientes aquáticos e para suportar as mudanças da tensão de oxigênio ambiental (Nikinmaa & Ress, 2005). Não obstante, em peixes, as respostas comportamentais à hipoxia são semelhantes àsquelas observadas em outros animais. Na tentativa de captar mais oxigênio os teleósteos migram para águas superficiais onde a disponibilidade de oxigênio é maior (Wu, 2002). Os peixes respondem à hipoxia com hiperventilação imediata e com aumento dos eritrócitos para lançar mais células vermelhas no sangue, e mudança no volume de plasma para manter a concentração de oxigênio em níveis normais (Nikinmaa, 2001;

Nikinmaa & Ress, 2005). A seleção das espécies tolerantes ocorre quando os níveis de oxigênio não voltam ao normal com o passar do tempo. 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 ao ambiente hipóxico. Tartarugas são capazes de hibernar em águas frias anóxicas por meses em um estado inativo para poupar ATP suficientemente 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 quando submergidas em águas frias de 3 °C (Hermes-Lima & 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 & Zenteno-Savín, 2002).

Através de adaptações fisiológicas, os peixes podem melhorar a captação do oxigênio através do remodelamento das lamelas branquiais. Este fenômeno foi observado em *Carassius* quando foram mantidos em hipoxia durante sete dias. Esta adaptação pode estar associada com processos de sinalização de apoptose que são ativados durante a hipoxia (Nikinmaa & Ress, 2005).

Quando os animais estão ativos durante a hipoxia ou anoxia eles precisam produzir 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 reverter esse quadro. A expressão das enzimas da via glicolítica, como a fosfofrutocinase, é intensificada para melhorar a produção de energia (Wu, 2002). Isto 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, ficaram aumentados de 3,5 vezes (Lutz & Nilsson, 1997). Em cérebro de 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 carpa comum (*Cyprinus carpio*) mantida em hipoxia por sete dias, a atividade de fosfofrutocinase foi diminuída (Zhou *et al.*, 2000). Assim, a é possível que a atividade das enzimas glicolíticas possa 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. A isoenzima do tipo A da LDH (LDH-A) converte melhor a molécula de piruvato em lactato, já a isoenzima do tipo B (LDH-B) é mais eficiente na conversão de lactato para piruvato. Em virtude disso, a relação LDH-A/LDH-B está inversamente relacionada com a disponibilidade de oxigênio ambiente. 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 esta espécie mostraram maior expressão da LDH-B no músculo e no cérebro e menor expressão no fígado (Nikinmaa & 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 & Nilsson, 1997; Nikinmaa & Ress, 2005).

Apesar do metabolismo energético dos animais mantidos em hipoxia ou anoxia ser alterado para a via anaeróbica, existem dois fatores limitantes para que produzam energia: a reserva de glicogênio e o excesso de ácido láctico. Porém alguns peixes possuem adaptações que reverter esse quadro. O fígado de tais animais pode chegar a ser 15% da massa corpórea e 30% de massa deste fígado pode ser composta de glicogênio. Outra adaptação é a produção de etanol a partir do ácido láctico impedindo que o peixe sofra de acidez metabólica. O ácido láctico produzido no cérebro e em outros tecidos é secretado para o sangue e transportado para os miócitos, onde é convertido no citosol a piruvato, que é descarboxilado na mitocôndria até acetaldeído e CO<sub>2</sub> pela catálise da piruvato desidrogenase. Nos vertebrados o acetaldeído é convertido em acetil-CoA e usado no ciclo do ácido cítrico, mas nos *Carassius* o acetaldeído migra para o citosol onde é rapidamente convertido em etanol pela álcool desidrogenase, uma enzima muito expressa nos *Carassius*. O etanol produzido cai na corrente sanguínea e é excretado para o ambiente pelas brânquias. Essa habilidade de produzir etanol, em combinação com o grande estoque de glicogênio, permite os *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 & Nilsson, 1997).

Embora a energia produzida pela anaerobiose seja suficiente para a sobrevivência dos animais em baixas concentrações de oxigênio, ela é insuficiente para manter o animal em plena atividade. Sendo assim, os animais precisam diminuir a taxa locomotora, o anabolismo e a atividade neuronal. A redução da atividade locomotora é comumente utilizada para

conservar a 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 & Zenteno Savín, 2002). No entanto, tilápias mantidas em hipoxia por aproximadamente 5 h não apresentaram mudanças na atividade locomotora (Xu *et al.*, 2006).

Os animais também apresentam redução da síntese de proteínas sob hipoxia. 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 & 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 & Nilsson, 1997).

Os animais também podem ter seu tamanho reduzido devido à hipoxia causar falta de apetite. Além de espécies de peixes como o linguado (*Pleuronectes platessa*), que reduz de tamanho em 25-30%, e o salmão vermelho (*O. nerka*), que pouco cresce quando submetido à hipoxia, espécies de moluscos, equinodermas e poliquetas também apresentam crescimento reduzido quando mantidos em hipoxia (Wu, 2002).

### 1.2.2 HIF: regulador de adaptações a hipoxia

Nas células de mamíferos submetidos à hipoxia ocorre ativação de alguns fatores de transcrição que regulam a expressão gênica. Nos teleósteos os fatores de controle ainda não estão completamente esclarecidos. Contudo, as respostas à hipoxia, tanto em mamíferos como em teleósteos, parecem ser controladas pelo fator induzido por hipoxia (hypoxia-inducible factor, HIF) (Nikinmaa & Renshaw, 2005; Rytönen *et al.*, 2008).

O HIF foi descoberto em estudos de controle da expressão de eritropoietina pelo hepatoma Hep3B. Este fator de transcrição possui duas subunidades:  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  mostra-se em três isoformas: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ . A subunidade  $\beta$  é um translocador nuclear do receptor de hidrocarbonetos arila (ARNT) que também pode atuar no metabolismo

de xenobióticos ao se ligar a compostos aromáticos. Apesar das duas subunidades serem expressas constitutivamente na célula, a subunidade  $\alpha$  apresenta um domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) e em normoxia é destruída rapidamente via ubiquitinação no proteossoma, mas, em hipoxia, o fator HIF-1 $\alpha$  é estabilizado, podendo então se ligar a elementos de resposta à hipoxia (HRE) (Nikinmaa & Rees, 2005; Rytönen *et al.*, 2008). Em muitas células tumorais o HIF1- $\alpha$  também fica ativado podendo servir de ferramenta para a aplicação de terapias gênicas ligadas a expressão da CarbE, devido a enzima ter um papel importante no combate a tumores e ser regulada pelo HIF-1 $\alpha$  (Matzow *et al.*, 2007).

Os peixes possuem homólogos ao HIF- $\alpha$  e HIF- $\beta$  que podem ter papéis similares aos fatores encontrados em mamíferos. Enquanto o HIF-  $\beta$  foi caracterizado em peixes no contexto de estresse de poluentes na década de 90, a primeira sequência de HIF- $\alpha$  em peixes foi relatada em truta arco-íris em 2001 (Soitamo *et al.*, 2001). Além disso, o HIF parece regular nos peixes uma variedade de adaptações à hipoxia, tais como: a eritropoese, a síntese de hemoglobina, a modificação das lamelas branquiais, a angiogênese, o transporte de glicose e a síntese de enzimas envolvidas na captação e metabolismo da glicose (Nikinmaa & Rees, 2005).

Embora várias espécies de peixes possam suportar diminuição do oxigênio dissolvido na água, muitas sucumbem aos incidentes de intensa floração de algas ou aumento da população de outros micro-organismos, pois estes crescem a expensas do O<sub>2</sub> dissolvido. Uma vez diminuídas as concentrações de oxigênio da água, é preciso determinar qual o grau de privação de O<sub>2</sub> em que se encontram os peixes antes que eles morram.

É de grande importância, tanto para que utilizemos peixes como cobaias, como para o manejo desses animais em atividades de piscicultura, de repovoamento e monitoramento ambiental, que seja estabelecido um biomarcador prático e pouco ofensivo, capaz de indicar com alta sensibilidade se um peixe está sofrendo hipoxia. Uma vez que estas são características dos numerosos biomarcadores enzimáticos já consagrados pela patologia clínica, visamos estabelecer se a diminuição da atividade da carboxilesterase do plasma poderia ser mais um eficiente biomarcador de hipoxia para peixes.

### 1.3 Animais estudados

#### 1.3.1 Characiformes: *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 e *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887

Figura 5: *Leporinus macrocephalus* (piavussu)



Figura 6: *Piaractus mesopotamicus* (pacu)



O *Piaractus mesopotamicus*, conhecido como pacu, e o *Leporinus macrocephalus*, conhecido como piavussu, são espécies de peixes neotropicais migratórias encontradas nas bacias dos rios Paraná e Paraguai no Pantanal. Essas espécies pertencem à ordem Caraciforme que inclui uma variedade de peixes que vivem na África e na América. São usadas na aquicultura e são importantes para o consumo. Adaptações morfológicas e fisiológicas permitem a alguns caraciformes sobreviverem em condições extremas de altas e baixas concentrações de oxigênio que ocorrem durante o pulso de inundação do pantanal. No Pantanal ocorrem anualmente ciclos de cheia e seca ocasionando o transbordamento de doze rios. Durante quatro a seis meses uma extensa área do pantanal permanece submersa em águas cuja profundidade pode variar de poucos centímetros até dois metros. Ao invadir as planícies

secas a água cobre grande parte da vegetação que morre e se decompõe. Dentre os fatores alterados, a concentração de oxigênio pode chegar a níveis de anoxia fazendo com que ocorra mortandade de grande quantidade de peixes. No entanto, espécies como o pacu se adaptam a essas condições e muitos conseguem sobreviver aos períodos de hipoxia ou anoxia (Calheiros *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2007; Leite, *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Cipriniformes: *Carassius auratus auratus* (Linnaeus, 1758) e *Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758

Figura 7: *Carassius auratus auratus* (peixe-dourado ou japonês)



Figura 8: *Cyprinus carpio carpio* (carpa colorida)



*Carassius auratus auratus* (peixe-dourado) e *Cyprinus carpio carpio* (carpa colorida), são espécimes da ordem dos cipriniformes que podem sobreviver a períodos de hipoxia ou anoxia por algumas horas ou mesmo até dias. O peixe-dourado é oriundo da Ásia e a carpa colorida da Europa, mas, atualmente, ambas as espécies estão distribuídas por todo o mundo.

1.3.3 Perciformes: *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) e *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758)

Figura 9: *Astronotus ocellatus* (apaiari)



Figura 10: *Oreochromis niloticus niloticus* (tilápia)



O apaiari, ou acará-açu, ou oscar (*Astronotus ocellatus*) é uma espécie da ordem dos perciformes que vive na Amazônia. A bacia Amazônica se caracteriza por apresentar pulsos de inundações cujo nível da água pode variar 13 metros. Durante o período de cheia, várias áreas, chamadas de várzeas, ficam alagadas e cobertas de macrófitas, condições nas quais a disponibilidade de oxigênio varia muito num período de 24 h. Para sobreviver às mudanças nos níveis de oxigênio em alta temperatura, os peixes da Amazônia desenvolveram adaptações ao longo da evolução. As espécies que respiram ar podem apresentar adaptações morfológicas e anatômicas, mas espécies que respiram dentro da água, como o apaiari, apresentam adaptações bioquímicas e fisiológicas para sobreviverem ao ambiente em hipoxia por 20 h ou anoxia por 6 h em 28 °C (Muusze *et al.*, 1998).

Os *Oreochromis niloticus niloticus* (tilápias) são peixes da ordem perciforme originários do rio Nilo, localizado na África, mas são encontrados em todos os países

tropicais. Sua alta taxa de conversão de alimento em carne fez deles os peixes de água doce de mais alto valor econômico. Esses animais são bastante territoriais, pois apresentam hierarquia de dominância e submissão estabelecida por confronto (Alvarenga & Volpato, 1995).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar se a hipoxia provocará alteração dos níveis de atividade da carboxilesterase no soro e no fígado de exemplares de espécies de peixes de diferentes ordens.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1) Analisar entre as espécies estudadas quais são as mais resistentes à hipoxia.
- 2) Analisar a atividade de carboxilesterase em soro e fígado dos exemplares de peixes submetidos à hipoxia em diferentes tempos.
- 3) Correlacionar a atividade de carboxilesterase entre as espécies.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Exemplares de pacu com tamanhos e pesos médios de 20 cm e 257 g e de peixe-dourado com 9 cm e 25 g foram coletados nos tanques de criação da Fazenda Morro Grande, localizada no município de Cachoeira de Macacu, Rio de Janeiro (RJ). Alguns pacus também foram trazidos da Fazenda Sol Nascente, localizada no município de Laje do Muriaé, RJ. Os exemplares de tilápias com 24 cm e 230 g em média foram coletados na Cooperativa dos Aquicultores do Sul Fluminense Peixesul Ltda., localizada no município de Piraí, RJ. As carpas coloridas com 17 cm e 122 g em média foram adquiridas em uma loja de animais localizada em Nova Iguaçu, RJ. Os piavussus com 41 cm e 888 g em média foram coletados em tanques de criação da piscicultura São João, localizada no município de Itaocara, RJ. Exemplares de apaiari com 19 cm e 298 g em média foram trazidos de cativeiros de Manaus, Amazonas.

#### 3.2 Equipamentos

Accutrend<sup>®</sup> Lactate da Roche; 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; Portable printing and logging dissolved oxygen meters HI 9141E-HI 91410, 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).

### 3.3 Experimentos de hipoxia

Dois grupos de três peixes de cada espécie foram aclimatados à temperatura ambiente em dois aquários de 250 L, baseado em Zhou *et al.* (2000). Os tanques estavam equipados com sistema de filtro biológico, aeração por bombas de aspiração e água filtrada em carvão ativado, por duas semanas.

No primeiro aquário, três animais foram mantidos em normoxia (animais controle com aproximadamente 5 ppm de O<sub>2</sub>) durante todo o experimento.

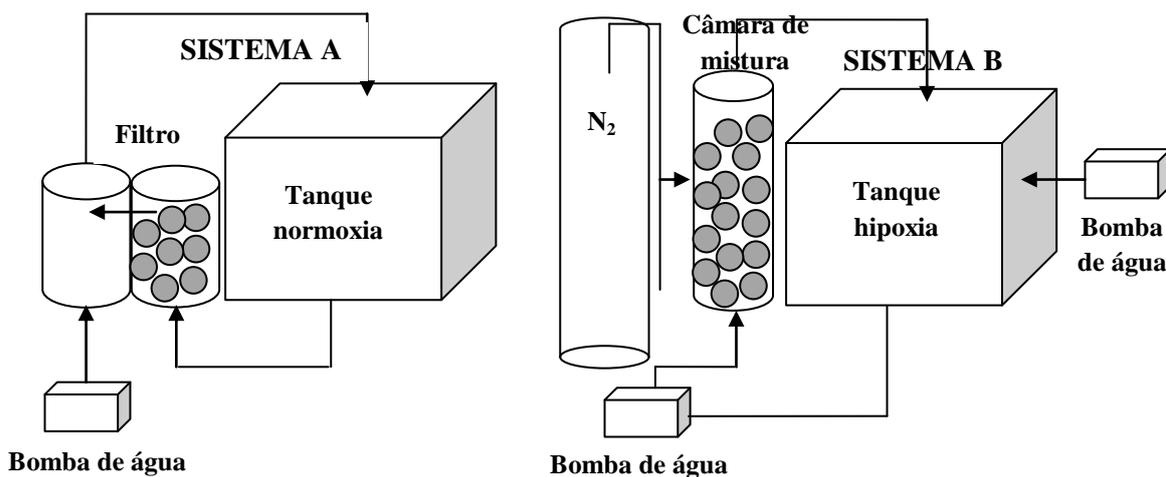
No segundo, três animais ensaio sofreram hipoxia por diminuição da concentração de oxigênio até 0,5 ppm, através de borbulhamento de nitrogênio na água ao longo de 5 h, e foram mantidos por 6, ou, no máximo, 42 horas nesta condição. Trata-se, portanto, de um ciclo normoxia-hipoxia com coleta de sangue e eutanásia dos animais ao fim do experimento, quando foram coletados tecidos. Este aquário foi coberto com lona plástica impedindo a troca de gases com o ambiente para dificultar a respiração na superfície aquática (ASR).

No caso das tilápias, após 12 h em hipoxia, o nível de O<sub>2</sub> foi elevado a 6 ppm durante 2 h, e elas permaneceram nesta nova situação (normoxia) por 6 h. Trata-se de um ciclo normoxia-hipoxia-normoxia com coleta de sangue após as primeiras 12 h (hipoxia), reposição dos animais ao aquário e, ao fim (20 h) do experimento, nova coleta de sangue e, agora também, retirada dos tecidos.

Ao todo foram realizados 12 experimentos de hipoxia nos peixes estudados. Com pacus foram realizados quatro experimentos de hipoxia por 42 h, em carpas foram realizados dois experimentos com 6 e 8 h de hipoxia, em tilápias foram realizados três experimentos com 6, 8 e 12 h, sendo que neste último, o tanque foi reoxigenado durante 2 h, para normoxia e os animais permaneceram nesta condição por mais 6 h. Foi realizado um experimento de hipoxia durante 24 h com piavussu, apaiari e carpa colorida.

O desenho experimental é mostrado na figura 11 abaixo.

Figura 11: 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: Zhou *et al.*, 2000.

### 3.4 Preparo de soro

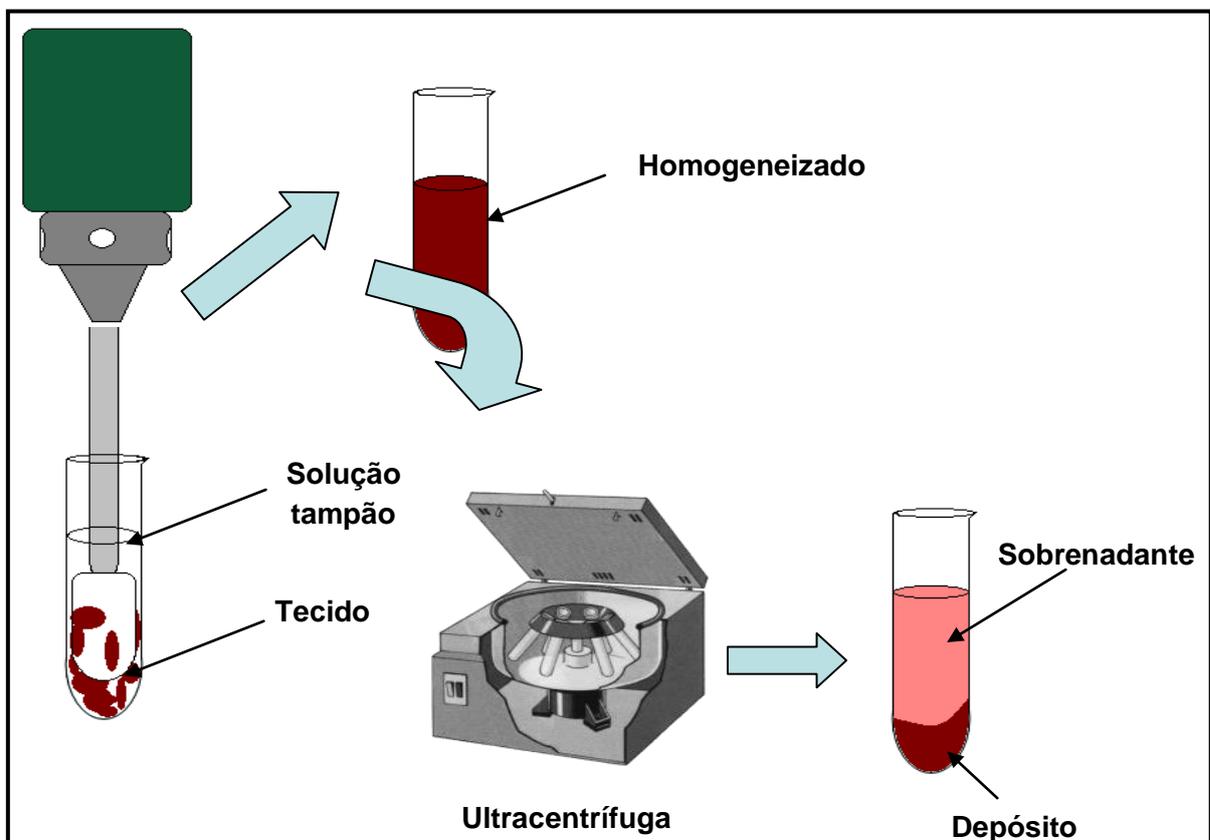
O sangue foi coletado pela punção com seringa e agulha de vasos que passam sob a porção caudal da coluna vertebral. No sangue coletado foram medidas a pCO<sub>2</sub>, a pO<sub>2</sub> (em apaiari e pacu) e o lactato plasmático (em pacu). Após a coleta, o sangue foi deixado primeiro à temperatura ambiente por 20 min. A seguir centrifugado a 3.500 rpm por 10 min sob refrigeração e o soro sobrenadante removido com pipeta Pasteur. Este soro foi conservado no congelador a - 20 °C até o momento dos ensaios.

### 3.5 Preparo dos homogeneizados teciduais

Após coleta de sangue, os animais foram sacrificados por ruptura da coluna vertebral. Seus fígados foram retirados e conservados em nitrogênio líquido até o momento do uso, quando foram descongelados. Após 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 &

Elvehjem, 1936), 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 microssômica foram obtidas por centrifugação do homogeneizado a  $800 \times g$  por 5 min, centrifugação do sobrenadante obtido a  $20.000 \times g$  por 30 min (fração mitocondrial) e por nova centrifugação do sobrenadante pós-mitocondrial a  $105.000 \times g$  por 90 min, produzindo o sobrenadante (fração citosólica) e o depósito (fração microssômica). Os sobrenadantes e os depósitos mitocondriais foram mantidos no freezer ( $- 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e os microssomos foram mantidos no nitrogênio líquido até o momento do ensaio. O processo é mostrado no esquema abaixo:

Figura 12: Esquema simplificado da homogeneização e centrifugação de fígado dos peixes para obter as frações



### 3.6 Determinação da quantidade de proteínas

A dosagem de proteínas dos soros e dos homogeneizados teciduais foi feita pelo método de Peterson (1977), usando solução de albumina de soro bovino na concentração de 1 mg/mL, com volumes de 10  $\mu$ L e 100  $\mu$ L desta solução para construção da curva de calibração.

### 3.7 Determinação de lactato no sangue

Os níveis de lactato no sangue do pacu foram determinados com o aparelho Accutrend® lactate com as tiras-teste BM-Lactate de acordo com as instruções do fabricante. O resultado é expresso em  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

### 3.8 Ensaio enzimático de carboxilesterase

A atividade de carboxilesterase foi ensaiada em 0,2 mL de solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,7, a 25 °C, segundo o método de Morgan *et al.* (1994). Usamos como substrato o p-nitrofenilacetato (p-NPA) em concentração final de 1,5 mM para pacu e peixe-dourado e 3 mM para as demais espécies. Determinamos o p-nitrofenol formado pela leitura da absorvância a 400 nm por 1 min. Usamos o coeficiente de absorvidade molar para o p-nitrofenol de  $13.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  a 400 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como 1  $\mu\text{mol}$  de produto formado por min. As atividades foram expressas em  $\text{U.mL}^{-1}$  de soro,  $\text{U.mg}^{-1}$  de proteínas e  $\text{U.g}^{-1}$  de tecido úmido.

### 3.9 Análises estatísticas

Em todos os resultados de atividade enzimática foram feitos testes não paramétricos "t" de Student e ANOVA "one-way" usando o programa Prism (GraphPad Software, San Diego, USA), todos com grau de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS

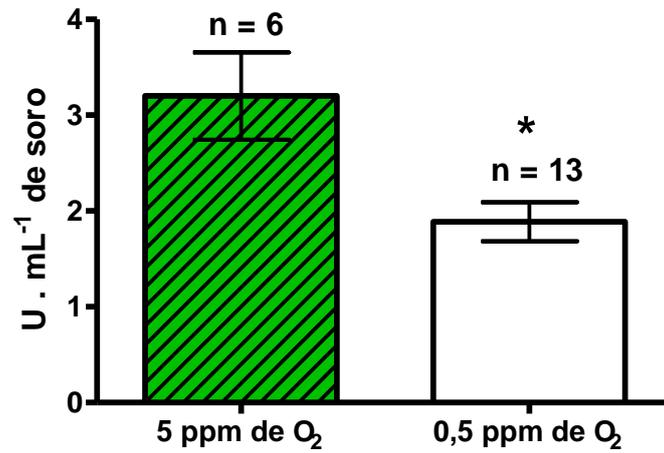
### 4.1 *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

A partir das primeiras dez horas de hipoxia, os animais aumentaram a locomoção, nadaram na superfície do tanque e aumentaram a frequência respiratória com o prolongamento do beijo inferior.

A pressão parcial de oxigênio no sangue dos pacus em hipoxia foi 96% menor do que a dos pacus 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) também foi menor (64%) do que a dos animais em normoxia ( $22,08 \pm 4,5$  mmHg). Entretanto os níveis de lactato não variaram estatisticamente, apresentando valores próximos a 4 mM.

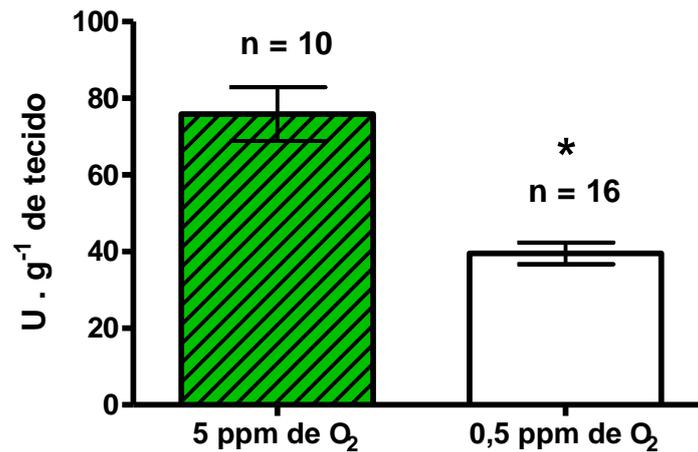
Apesar de a quantidade de proteínas do soro e do fígado não sofrerem alteração, a atividade de carboxilesterase por mL de soro dos pacus em hipoxia por 42 h apresentou queda de aproximadamente 40% (de  $3,2 \pm 0,45$  U.mL<sup>-1</sup> para  $1,88 \pm 0,20$  U.mL<sup>-1</sup>) em relação aos pacus em normoxia (figura 13). A atividade do homogeneizado de fígado caiu cerca de 50%, de  $75,84 \pm 6,99$  U.g<sup>-1</sup> de tecido para  $39,52 \pm 2,85$  U.g<sup>-1</sup> (figura 14). A atividade específica sobre pNPA encontrada na fração microsomal hepática ( $1,45 \pm 0,28$  U.mg<sup>-1</sup> de proteína, nos controles) foi cerca de 20 vezes maior do que a do soro ( $0,072 \pm 0,013$  U.mg<sup>-1</sup> de proteína, nos controles). Quando os pacus ficaram sob hipoxia a atividade da fração microsomal caiu para  $0,56 \pm 0,16$  U.mg<sup>-1</sup> (60% de queda) e a do soro para  $0,045 \pm 0,004$  U.mg<sup>-1</sup> (em torno de 40% de queda). Também observamos no homogeneizado de fígado ( $0,53 \pm 0,07$  U.mg<sup>-1</sup> nos controles e  $0,31 \pm 0,028$  U.mg<sup>-1</sup> na hipoxia) e na fração citosol de fígado ( $0,32 \pm 0,06$  U.mg<sup>-1</sup> controle e  $0,21 \pm 0,026$  U.mg<sup>-1</sup> hipoxia) queda da atividade da CarbE dos peixes sob hipoxia (figura 15).

Figura 13: Atividade de carboxilesterase do soro de *Piaractus mesopotamicus* submetidos à hipoxia por 42 h



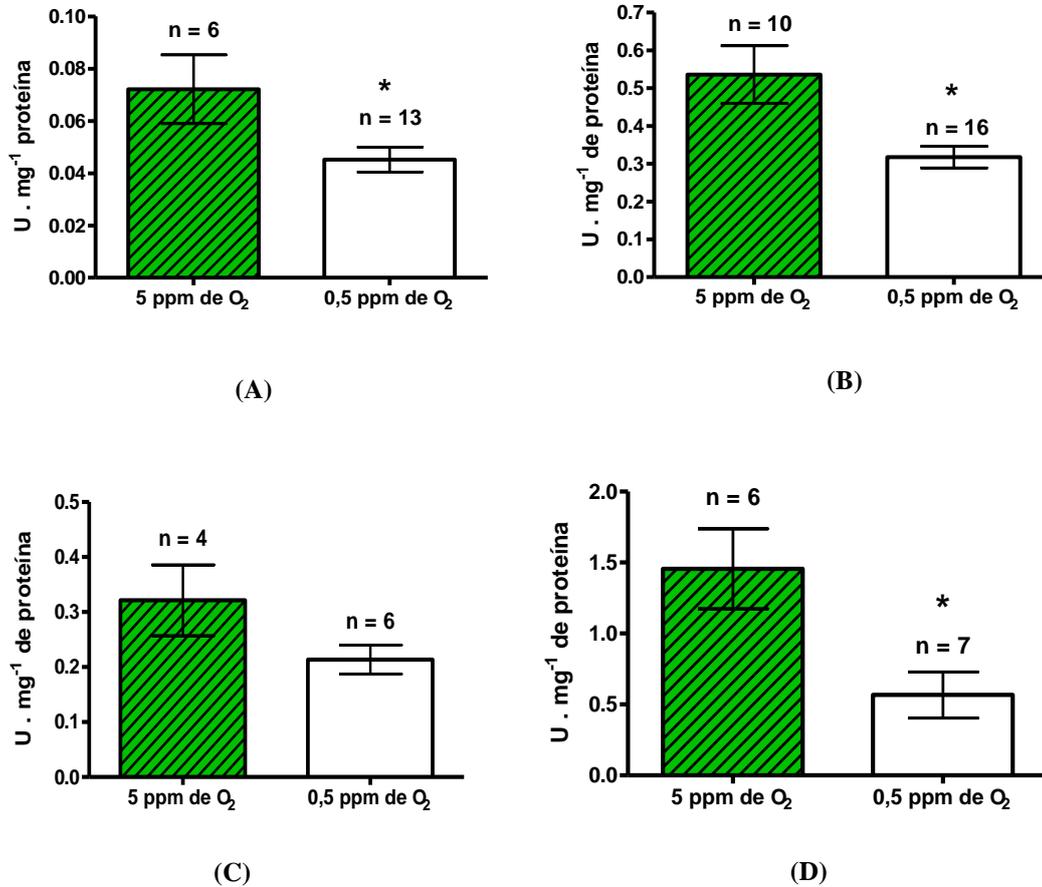
Legenda: Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (5 ppm de O<sub>2</sub>). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a quatro experimentos.

Figura 14: Atividade de carboxilesterase do homogeneizado de fígado de *Piaractus mesopotamicus* submetidos à hipoxia por 42 h



Legenda: Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (5 ppm de O<sub>2</sub>). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a quatro experimentos.

Figura 15: Atividade específica de carboxilesterase do soro (A), do homogeneizado (B), das frações citosólica (C) e microsomal (D) de fígado de *Piaractus mesopotamicus* submetidos à hipoxia por 42 h



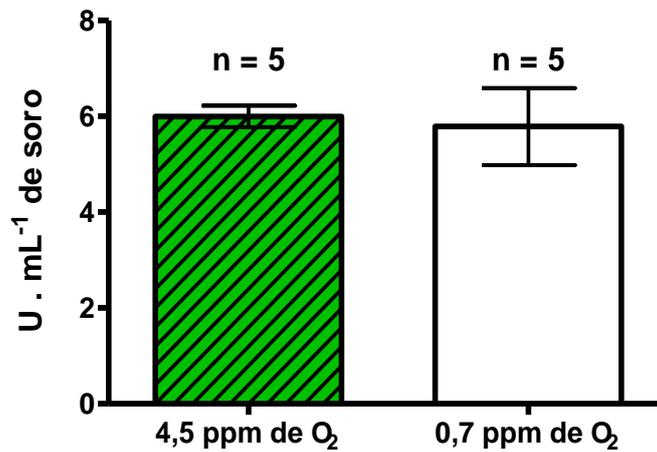
Legenda: Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (5 ppm de O<sub>2</sub>). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a quatro experimentos.

#### 4.2 *Carassius auratus auratus* (Linnaeus, 1758)

Os peixes-dourados, que também toleram a hipoxia (Lushchak *et al.*, 2001), foram postos em 0,7 ppm de O<sub>2</sub> por seis horas. Como mostra a figura 16, não houve mudança na atividade de carboxilesterase dos seus soros. Como especulamos que tal resultado se deveu ao pouco tempo de hipoxia, realizamos outro experimento com 8 h de hipoxia. Em oito horas de hipoxia os peixes dourados apresentaram diminuídas a atividade de carboxilesterase. As atividades de carboxilesterase do soro foram de  $6 \pm 0,22$  U.mL<sup>-1</sup> nos controles e  $3,8 \pm 0,18$

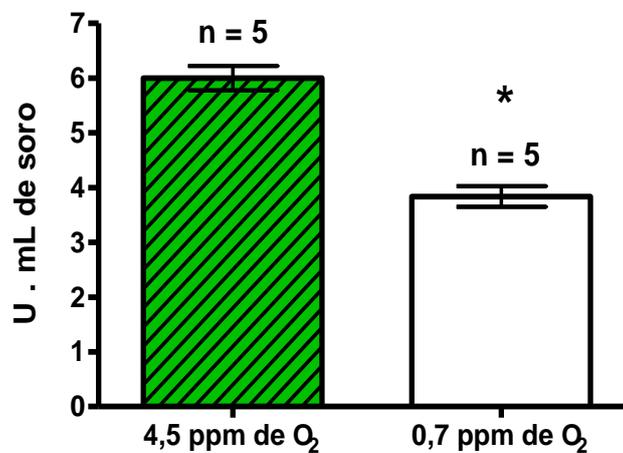
U.mL<sup>-1</sup> nos peixes em hipoxia (figura 17) e, por grama de fígado, foram de  $61,46 \pm 7,89$  U nos controles e de  $39,1 \pm 5,3$  U nos peixes em hipoxia, apresentando queda em torno de 40% (figura 18).

Figura 16: Atividade de carboxilesterase por mL de soro de *Carassius auratus auratus* submetidos à hipoxia por 6 h



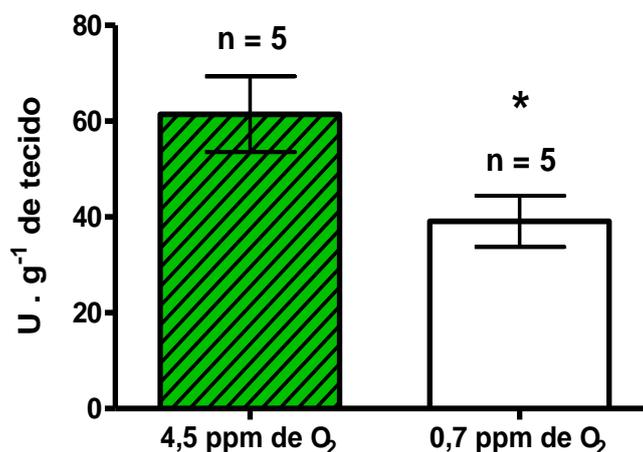
Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

Figura 17: Atividade de carboxilesterase por mL de soro de *Carassius auratus auratus* submetidos à hipoxia por 8 h



Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \*p < 0,05 em relação ao controle (4,5 ppm de O<sub>2</sub>). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

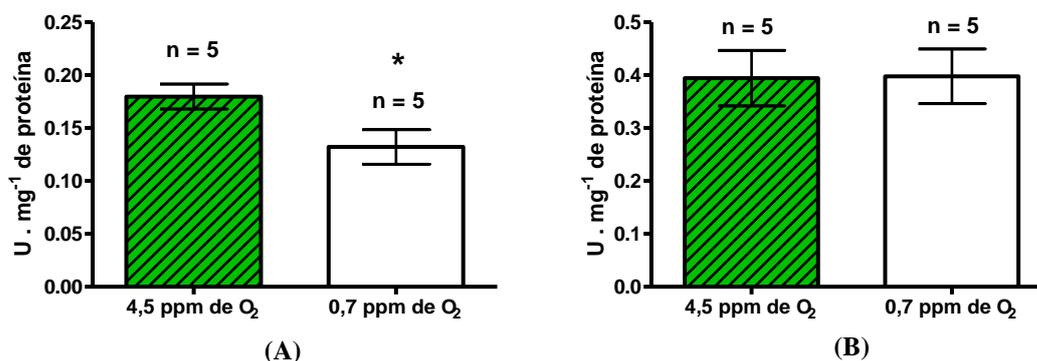
Figura 18: Atividade de carboxilesterase em homogeneizado de fígado de *Carassius auratus auratus* submetidos à hipoxia por 8 h



Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (4,5 ppm de O<sub>2</sub>). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

Embora a quantidade de proteínas do soro dos peixes dourados não apresentasse queda, ao contrário do que foi observado no fígado, a atividade específica de carboxilesterase do soro sofreu diminuição cujos níveis se alteraram de  $0,179 \pm 0,011$  U.mg<sup>-1</sup> de proteína nos controles para  $0,132 \pm 0,016$  U.mg<sup>-1</sup> de proteína nos peixes em hipoxia, mostrando 26% de redução da atividade enzimática (figura 19). Sendo assim, os resultados em mL de soro e grama de tecido dos *C. auratus auratus* mostram maiores quedas da carboxilesterase do que os resultados de atividades específicas.

Figura 19: Atividade específica de carboxilesterase em soro (A) e em homogeneizado de fígado (B) de *Carassius auratus auratus* submetidos à hipoxia por 8 h

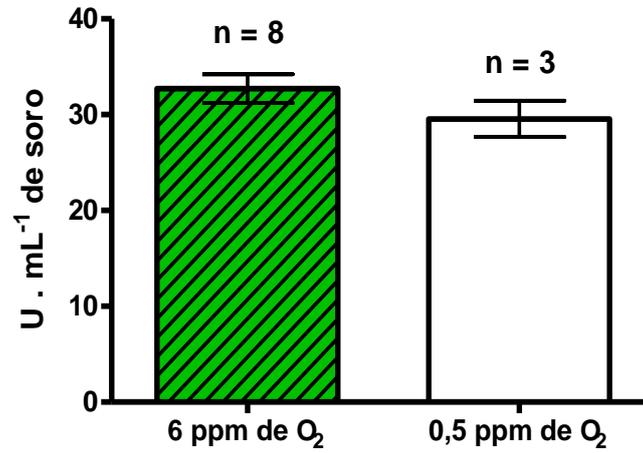


Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (4,5 ppm de O<sub>2</sub>). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

#### 4.3 *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758)

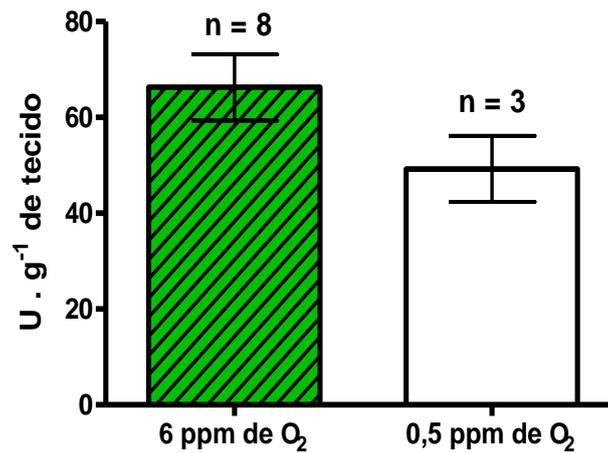
No primeiro experimento realizado com tilápias, elas foram mantidas em água contendo 0,5 ppm de O<sub>2</sub> por seis horas. Neste caso, somente a atividade específica de carboxilesterase em homogeneizado de fígado apresentou diferença significativa em relação aos animais controles (figuras 20, 21 e 22). Como não foram observadas diferenças nas atividades séricas, como visto para os pacus, realizamos um experimento por 17 h em hipoxia. Entretanto, logo após 10 h em hipoxia (0,5 ppm de O<sub>2</sub>) todos os espécimes morreram. Diante disto, optamos por um experimento em que observaríamos o limite de resistência da tilápia a hipoxia. Isto aconteceu após 12 h, quando coletamos o sangue dos peixes e os devolvemos ao tanque. Então, os tanques foram reoxigenados gradativamente durante 2 h até o nível de O<sub>2</sub> chegar a 6 ppm (normoxia). Os peixes permaneceram 6 h nesta nova condição quando, então, foram retirados para uma nova coleta de sangue e, em seguida, foram sacrificados.

Figura 20: Atividade de carboxilesterase do soro de *Oreochromis niloticus niloticus* submetidos à hipoxia por 6 h



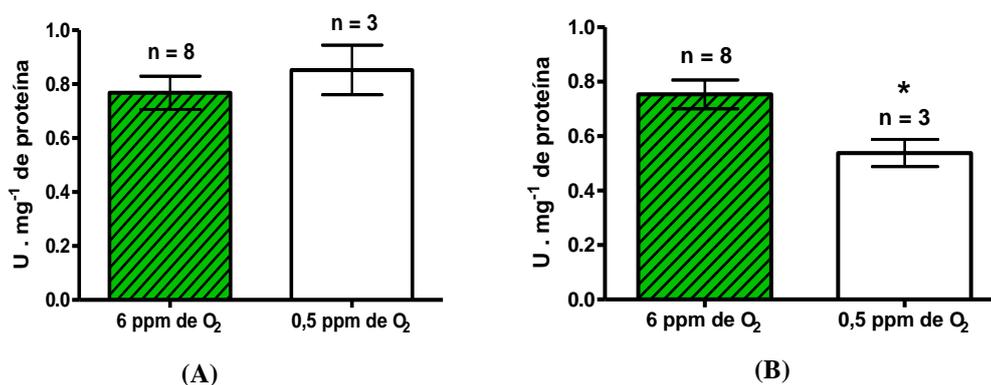
Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

Figura 21: Atividade de carboxilesterase em homogeneizado de fígado de *Oreochromis niloticus niloticus* submetidos à hipoxia por 6 h



Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

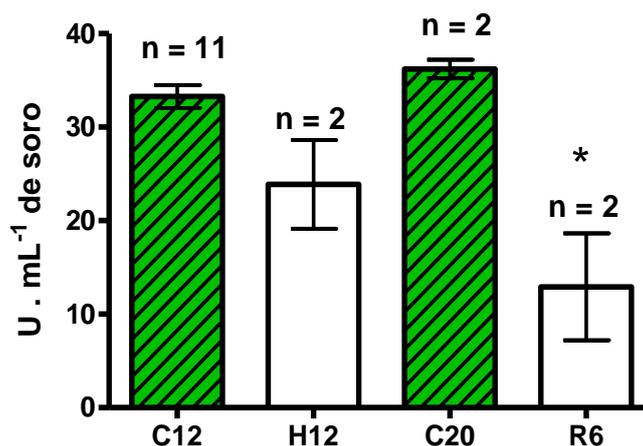
Figura 22: Atividade específica de carboxilesterase em soro (A) e em homogeneizado de fígado (B) de *Oreochromis niloticus niloticus* submetidos à hipoxia por 6 h



Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (6 ppm de O<sub>2</sub>). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

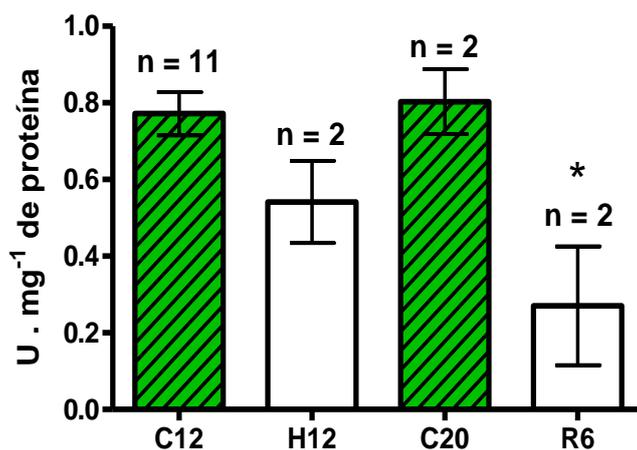
As atividades de carboxilesterase por mililitro e por proteínas de soro nas tilápias que ficaram em 0,5 ppm de O<sub>2</sub> por 12 horas e que depois foram recuperadas pela reoxigenação do tanque apresentaram queda estatisticamente significativa, mas a quantidade de proteínas, tanto no soro quanto no fígado, não sofreu alteração. Após a reoxigenação, a atividade de carboxilesterase no soro das tilápias continuou diminuindo em relação ao controle (Figuras 23 e 24).

Figura 23: Atividade de carboxilesterase do soro de *Oreochromis niloticus niloticus*



Legenda: As abreviações na abscissa significam: Controle durante 12 h em 6 ppm de O<sub>2</sub> ou normoxia (C12), 12 h em 0,5 ppm de O<sub>2</sub> ou hipoxia (H12), Controle durante 20 h (C20) e Recuperação por 6 h a 6 ppm de O<sub>2</sub>, após hipoxia (R6). Os resultados são expressos por média ± erro padrão da média. \*p < 0,05 em relação a C12 e C20. Análise estatística realizada com o teste ANOVA “one-way” e pós-teste “Tukey”. Resultados referentes a dois experimentos.

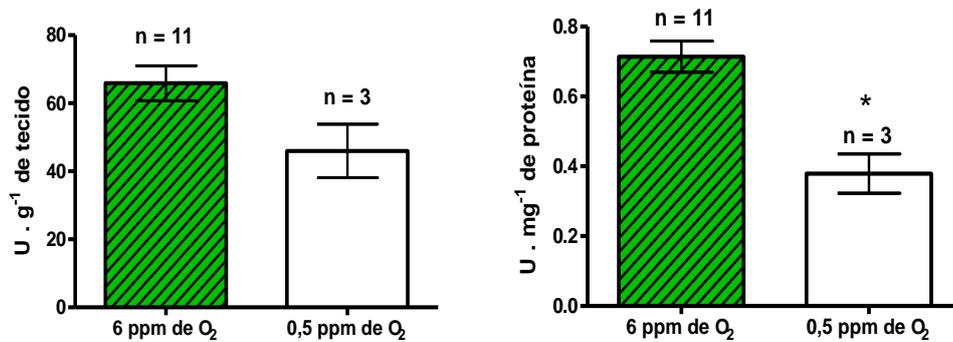
Figura 24: Atividade específica de carboxilesterase do soro de *Oreochromis niloticus niloticus*



Legenda: As abreviações na abscissa significam: Controle durante 12 em 6 ppm de O<sub>2</sub> ou normoxia (C12), 12 h em 0,5 ppm de O<sub>2</sub> ou hipoxia (H12), Controle durante 20 h (C20) e Recuperação por 6 h a 6 ppm de O<sub>2</sub>, após hipoxia (R6). Os resultados são expressos por média ± erro padrão da média. \*p < 0,05 em relação ao C12 e C20. Análise estatística realizada com o teste ANOVA “one-way” e pós-teste “Tukey”. Resultados referentes a dois experimentos.

A atividade específica sobre pNPA no homogeneizado de fígado das tilápias em hipoxia por 12 h apresentou diferença estatisticamente significativa com queda de 50% (Figura 25).

Figura 25: Atividade de carboxilesterase do homogeneizado de fígado de *Oreochromis niloticus niloticus* submetidos à hipoxia por 12 h



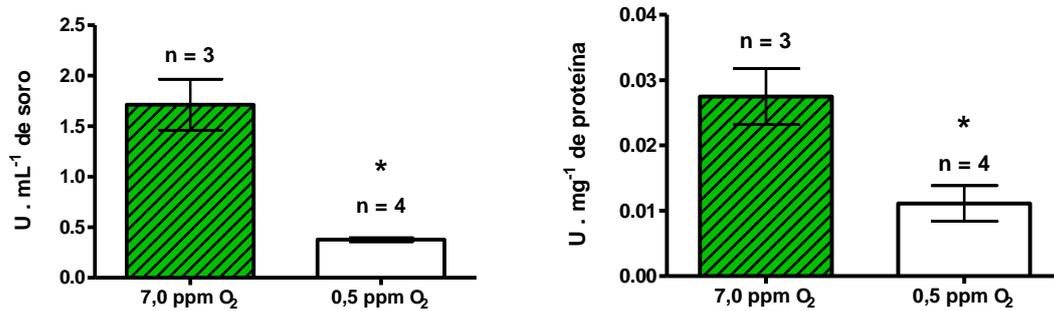
Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (6 ppm de O<sub>2</sub>). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a dois experimentos.

#### 4.4 *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988

Os piavussus foram mantidos em 0,5 ppm de O<sub>2</sub> por 24 h. Exceto por um animal, todos os demais piavussus do grupo hipoxia (com cinco animais) estavam nadando lentamente na superfície do tanque e movimentando constantemente a boca. Em aproximadamente 10 h de experimento, um dos animais do grupo hipoxia morreu, levando-nos a colher sangue de outro piavussu quando sob 12 e 18 h de hipoxia.

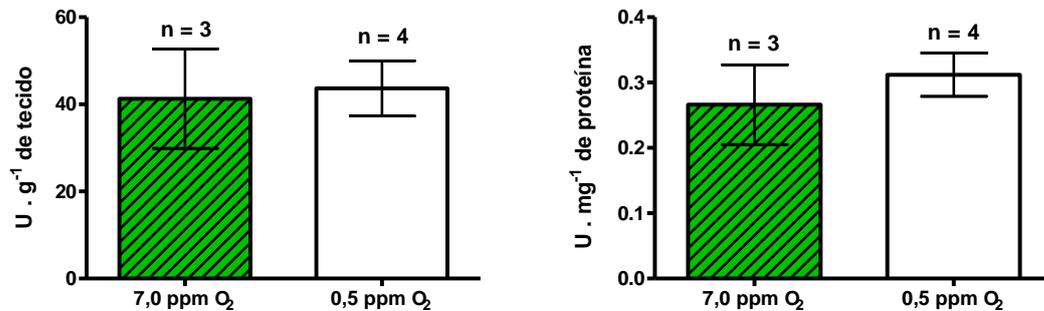
As atividades de carboxilesterase por mL e específica do soro dos piavussus foram reduzidas em 78% ( $1,71 \pm 0,25 \text{ U.mL}^{-1}$  nos controles para  $0,37 \pm 0,02 \text{ U.mL}^{-1}$  nos animais em hipoxia) e 60% ( $0,0274 \pm 0,004 \text{ U.mg}^{-1}$  nos controles para  $0,0111 \pm 0,002 \text{ U.mg}^{-1}$  nos peixes em hipoxia), respectivamente (figura 26). Entretanto, as atividades de carboxilesterase do fígado, tanto específica ( $0,26 \pm 0,06 \text{ U.mg}^{-1}$ ) quanto por grama de tecido ( $41,3 \pm 11,41 \text{ U.g}^{-1}$ ), não sofreram alteração (figura 27).

Figura 26: Atividade de carboxilesterase por mL e específica do soro de *Leporinus macrocephalus* submetidos à hipoxia por 24 h



Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (7 ppm O<sub>2</sub>). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

Figura 27: Atividade de carboxilesterase por grama de tecido e específica do homogeneizado de fígado de *Leporinus macrocephalus* submetidos à hipoxia por 24 h.



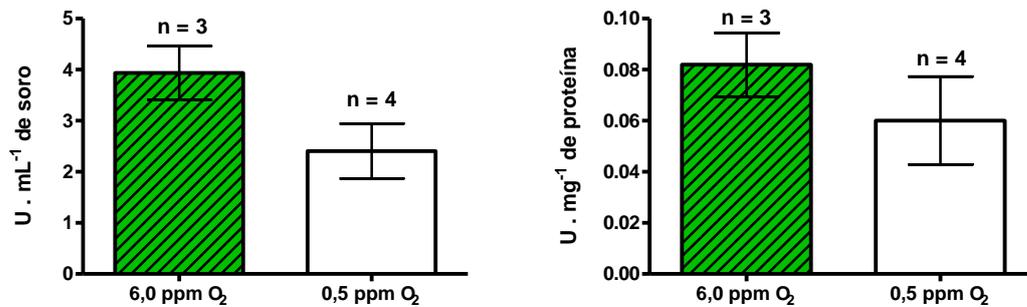
Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

#### 4.5 *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)

Os apaiaris também foram mantidos em hipoxia por 24 h. Porém, ao contrário do que foi visto nos outros teleósteos, eles não mostraram mudança comportamental. Os animais mantidos em 0,5 ppm de oxigênio estavam ativos durante todo o experimento, nadando normalmente. Em nenhum momento os apaiaris foram até a superfície do tanque para tentar obter oxigênio. Os níveis de CarbE no soro (figura 28) e no fígado (figura 29) desses animais e a quantidade de proteínas nestes tecidos não ficaram diferentes do ponto de vista estatístico.

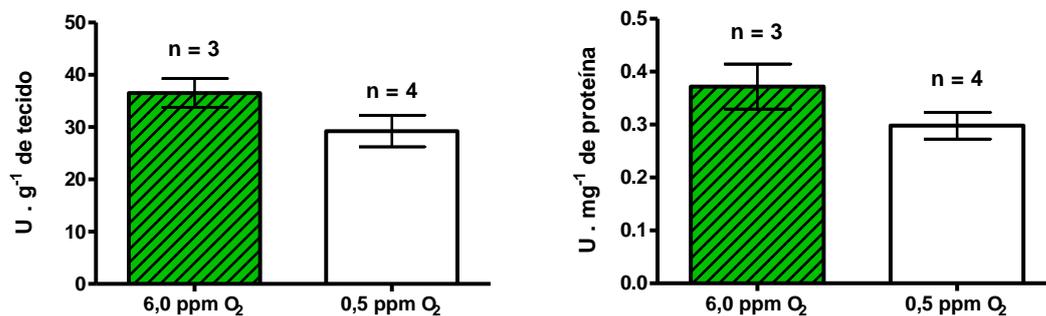
Entretanto, a pressão parcial de oxigênio no sangue dos animais em hipoxia foi menor ( $18,0 \pm 2,0$  mm Hg) do que nos peixes em normoxia ( $65,0 \pm 9,0$  mm Hg). Porém a pressão parcial de gás carbônico não variou entre dois grupos ( $20,0 \pm 0,5$  mm Hg).

Figura 28: Atividade de carboxilesterase por mL e específica do soro de *Astronotus ocellatus* submetidos à hipoxia por 24 h



Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

Figura 29: Atividade de carboxilesterase por grama de tecido e específica do homogeneizado de fígado de *Astronotus ocellatus* submetidos à hipoxia por 24 h



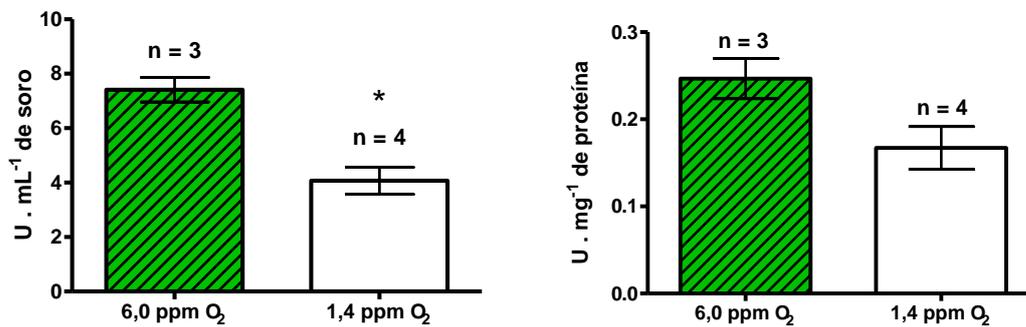
Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

#### 4.6 *Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758

As carpas foram os únicos peixes mantidos em hipoxia em concentração de oxigênio diferente dos demais experimentos. Dos cinco animais colocados no tanque de hipoxia, três

ficaram praticamente imóveis e um deles morreu (em aproximadamente 4 h de hipoxia) fazendo com que elevássemos a concentração de  $O_2$  de 0,5 ppm para 1,4 ppm. Os outros dois animais estavam bastante ativos durante o experimento, mas sempre buscando a superfície do tanque e movimentando a boca. A figura 30 mostra queda estatisticamente significativa na atividade de carboxilesterase no soro das carpas (de  $7,41 \pm 0,44 \text{ U.mL}^{-1}$  nos controles para  $4,06 \pm 0,49 \text{ U.mL}^{-1}$  nos peixes em hipoxia). Além disso, a quantidade de proteínas do soro destes animais também sofreu diminuição.

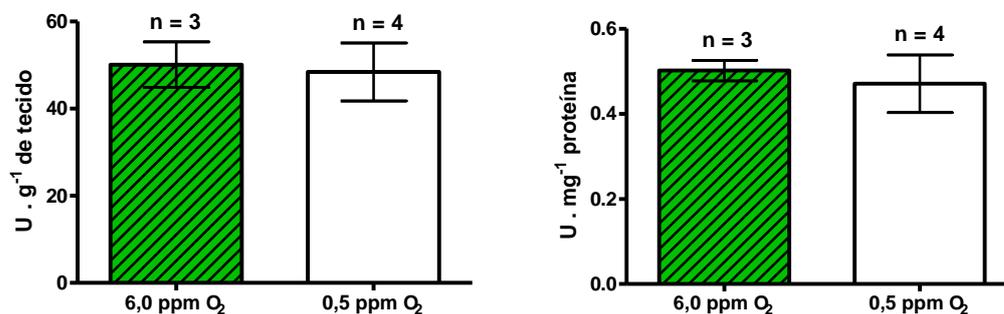
Figura 30: Atividade de carboxilesterase por mL e específica do soro de *Cyprinus carpio* submetidos à hipoxia por 24 h



Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (6 ppm  $O_2$ ). Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

A atividade de carboxilesterase e a quantidade de proteínas no homogeneizado de fígado das carpas mantidas em hipoxia por 24 h não sofreu alteração apresentando médias em torno de  $50 \text{ U.g}^{-1}$  de tecido e  $0,48 \text{ U.mg}^{-1}$  de proteína (figura 31).

Figura 31: Atividade de carboxilesterase por grama de tecido e específica do soro de *Cyprinus carpio* submetidos à hipoxia por 24 h



Legenda: Os resultados são expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Análise estatística realizada com o teste não paramétrico “t” de Student. Resultados referentes a um experimento.

#### 4.7 Comparação entre as atividades de carboxilesterase

As tabelas abaixo mostram a atividade de CarbE no soro e no fígado dos animais estudados. As tilápias apresentam, significativamente, os maiores níveis de atividade de CarbE no soro. A atividade da enzima nas tilápias controle é cerca de cinco vezes maior do que a da carpa colorida e em torno de 19 vezes maior do que a do piavussu (tabela 1). Mesmo que as tilápias controle apresentem os maiores níveis de atividade de CarbE no soro, a atividade da enzima no fígado não se mostrou estatisticamente diferente de outros animais controle (tabela 2). Os piavussus apresentam os menores níveis de atividade de CarbE no soro (tabela 1), mas a atividade da enzima no fígado é semelhante a das outras espécies, com exceção da atividade da enzima dos pacus que apresentam significativamente os maiores níveis de atividade no fígado (tabela 2).

Assim como nas tilápias controle, aquelas em hipoxia apresentaram, significativamente, os maiores níveis de atividade de CarbE no soro (em torno de 64 vezes maior do que a dos piavussus em hipoxia). Além disso, os soros da carpa colorida e do peixe-dourado apresentaram diferença significativa em relação ao dos piavussus (tabela 1).

As atividades de carboxilesterase no fígado apresentaram diferença significativa apenas entre os pacus controle e os apaiaris controle.

Tabela 1: Comparação entre as atividades de carboxilesterase do soro dos animais estudados.

<b>Espécies estudadas</b>	<b>n</b>	<b>Controle</b>	<b>n</b>	<b>Hipoxia</b>
Tilápia	11	33,33 ± 1,50*	2	23,89 ± 4,72*
Carpa colorida	5	7,41 ± 0,45	4	4,06 ± 0,49 <sup>#</sup>
Peixe-dourado	5	6,00 ± 0,22	5	3,83 ± 0,18 <sup>#</sup>
Apaiari	5	3,93 ± 0,52	4	2,40 ± 0,53
Pacu	6	3,20 ± 0,44	13	1,88 ± 0,20
Piavussu	5	1,71 ± 0,25	4	0,37 ± 0,02

Legenda: Os resultados são expressos por média ± erro padrão da média. A atividade é expressa em U.mL<sup>-1</sup> de soro. *n* = nº de amostras. \* *p* < 0,05 em relação a todas as espécies. # *p* < 0,05 em relação ao piavussu. Análise estatística realizada com o teste ANOVA “one-way” e pós-teste “Tukey”.

Tabela 2: Comparação entre as atividades de carboxilesterase do fígado dos animais estudados.

<b>Espécies estudadas</b>	<b>n</b>	<b>Controle</b>	<b>n</b>	<b>Hipoxia</b>
Pacu	10	75,84 ± 6,99*	16	39,52 ± 2,85
Tilápia	11	65,91 ± 5,14	3	45,98 ± 7,87
Peixe-dourado	5	61,46 ± 7,90	5	39,10 ± 5,30
Carpa colorida	5	50,10 ± 5,23	4	48,43 ± 6,63
Piavussu	5	41,30 ± 11,41	4	43,65 ± 6,32
Apaiari	5	36,53 ± 2,74	4	29,24 ± 3,01

Legenda: Os resultados são expressos por média ± erro padrão da média. A atividade é expressa em U.g<sup>-1</sup> de tecido. *n* = nº de amostras. \* *p* < 0,05 em relação ao apaiari. Análise estatística realizada com o teste ANOVA “one-way” e pós-teste “Tukey”.

## 5 DISCUSSÃO

Desconhecemos na literatura qualquer trabalho mostrando que a atividade de CarBE de peixes possa ser afetada por hipoxia, embora tenha sido mostrado que em hepatócitos humanos (HEPG2) mantidos em hipoxia por 24 h ocorra a diminuição da expressão gênica de várias proteínas, dentre elas a carboxilesterase (Sonna *et al.*, 2002). Também alguns experimentos realizados com células tumorais humanas mostram diminuição da expressão das carboxilesterases (Guichard *et al.*, 1999).

As respostas comportamentais que encontramos nos experimentos realizados com o pacu estão de acordo com aquelas descritas por Saint-Paul & Bernardino (1988) e por Rantin *et al.* (1998). Esses animais aumentaram a atividade locomotora, buscando mais a superfície para superar a falta de oxigênio. Quando a concentração de O<sub>2</sub> está abaixo de 0,4 mg.L<sup>-1</sup> pacus adultos e suas larvas são capazes de utilizar a camada da superfície da água rica em oxigênio para obter mais oxigênio para as suas brânquias, fenômeno conhecido como respiração na superfície aquática (ASR). Além de observarmos a locomoção dos pacus, presenciemos a formação de uma extensão dérmica no beijo inferior que facilita obterem oxigênio na camada da superfície. Os piavussus também aumentaram a atividade locomotora em direção a superfície do tanque onde provavelmente aumentaram a ASR, mas estes animais não apresentam modificações na boca, como o pacu. No entanto, as carpas e os peixes dourados diminuíram a atividade locomotora podendo ser uma possível resposta de depressão metabólica devida a redução do oxigênio disponível. Experimentos realizados por Zhou *et al.* (2000) com carpas comuns mantidas em hipoxia (0,5 mg/L de O<sub>2</sub>) durante 168 h também mostraram redução da atividade locomotora. Tal fato sugere que uma considerável parte da energia é usada para a atividade locomotora dos peixes (Lutz & Nilsson, 1997). Não observamos mudanças na atividade locomotora das tilápias, ao contrário do que foi encontrado por Xu *et al.* (2006). Também os apaiaris não mostraram nenhuma alteração do comportamento nos períodos em que os mantivemos em hipoxia.

De acordo com os dados da literatura relativos à permanência de peixes em hipoxia (Zhou *et al.*, 2000) os experimentos foram programados para 42 h. Entretanto, um dos experimentos com pacu mostrou os animais em mau estado após 17 h de hipoxia. Isto nos levou a sacrificá-los. Ainda assim, observamos uma queda significativa na atividade de carboxilesterase destes pacus. Nos três outros experimentos com pacus os animais ficaram no máximo 42 h sob hipoxia. Uma vez que os resultados obtidos nestes quatro experimentos não

apresentaram variação significativa entre eles, foram agrupados. Panepucci *et al.* (2001) mostraram que após quatro horas em hipoxia os níveis de lactato no sangue de pacu aumentam significativamente, sem mudança da atividade da lactato desidrogenase. Tais níveis diminuem após seis horas de hipoxia, pois os pacus migram em direção a superfície para fazer captação de oxigênio na superfície da água. Em nossos experimentos em que os pacus foram mantidos sob hipoxia por no mínimo 17 h, não observamos nenhuma diferença na concentração de lactato plasmático quando comparados com os pacus controle. Os peixes dourados, na ausência de oxigênio, são capazes de converter lactato em etanol, que é então excretado pelas brânquias (Lushchak *et al.*, 2001). Talvez os pacus apresentem o mesmo mecanismo de adaptação. Em humanos, as CarbE do tipo 1 do fígado também podem catalisar reações de transesterificação sintetizando ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE) a partir do etanol e do ácido graxo da acil-coenzima A. Os FAEE são muito tóxicos em vários tecidos por desacoplarem a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (Redinbo & Potter, 2005) e estão relacionados com deficiências por consumo crônico de álcool. Se considerarmos 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.

Em dois experimentos dos três realizados com as tilápias, vimos que os animais não se adaptaram ao ambiente hipóxico com 0,5 ppm de O<sub>2</sub> por mais do que 10 h. Entretanto, em estudos feitos por Delaney & Klesius (2004) as tilápias foram mantidas sob 0,3 ppm de O<sub>2</sub> por 48 h. Estudos feitos por van Ginneken *et al.* (1999) mostraram que tilápias mantidas sob 0,5 ppm de O<sub>2</sub> por pelo menos 3 h apresentam diminuição do seu metabolismo e que seus músculos vermelhos acumulam mais lactato do que os músculos brancos, mesmo durante o período de recuperação. Apesar de não termos medido os níveis de lactato nas tilápias, tais estudos podem vir de encontro às alterações da carboxilesterase, pois o tempo durante o qual mantivemos tilápias em hipoxia provavelmente foi suficiente para alterar o seu metabolismo. As tilápias são animais territoriais, que combatem por dominância de espaço, mas, quando sofrem algum tipo de estresse, os ataques entre elas tendem a diminuir. Por exemplo, o ambiente com baixas concentrações de O<sub>2</sub> faz com que as tilápias não ataquem umas as outras, pois elas precisam diminuir o seu metabolismo para poupar energia (Alvarenga & Volpato, 1995). Em nossos experimentos as tilápias mantidas em hipoxia não se atacaram, provavelmente porque reduziram seu metabolismo. Quando tilápias foram submetidas a hipoxia por 6 h, a atividade de carboxilesterase no seu soro e fígado não variou. A partir de

10 h de hipoxia vimos queda da atividade de carboxilesterase no soro e no fígado e, mesmo após a recuperação dos animais, quando aumentamos a concentração de oxigênio para 6 mg/L no tanque e os deixamos nessa condição por mais 6 horas, a atividade da enzima no soro continuou diminuída.

A atividade de carboxilesterase nos piavussus mantidos em hipoxia por 24 h apresentou diferença estatística no soro e é a atividade mais baixa em relação aos demais teleósteos usados neste estudo. Isso indica que os piavussus, assim como os seres humanos (Li *et al.*, 2005), não devem apresentar a proteína CarbE no soro. Além disso, estudos de nosso laboratório por Salles *et al.* (2006) mostraram que a atividade predominante no soro do piavussu é a da butirilcolinesterase. Entretanto, aqui cabe destacar que em nossos estudos com pacus mantidos em hipoxia, a atividade de butirilcolinesterase não mudou (dados não mostrados).

Ao contrário das atividades de carboxilesterase do soro, cuja queda não foi estatisticamente significativa, a atividade específica no homogeneizado de fígado dos apaiaris mantidos em hipoxia durante 24 h mostrou queda estatisticamente significativa. Além disso, esses animais não mostraram nenhuma mudança de comportamento durante o tempo em que permaneceram em 0,5 ppm de O<sub>2</sub>. Mesmo sendo animais territoriais, como as tilápias, eles não se atacaram. As carboxilesterases podem ter atividade de lipases em adipócitos por estímulos adrenérgicos (Soni *et al.*, 2004; Okazaki *et al.*, 2006). Embora 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 apresentam variação nos níveis de glicose e de ácidos graxos livre no plasma em relação aos controles. Haman *et al.* (1997) também 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 cause diminuição da mobilização e, conseqüentemente, da taxa de oxidação dos ácidos graxos não esterificados. A hiperglicemia também pode inibir a mobilização dos ácidos graxos independente de controle hormonal. Como a carboxilesterase é a principal lipase do tecido adiposo (Soni *et al.*, 2004), a diminuição do fluxo de ácido graxo livre e a diminuição de seus níveis podem estar associadas com a queda da atividade enzimática nos animais mantidos em hipoxia. Ainda falta medir os níveis de ácidos graxos livres e de glicose no sangue dos animais aqui estudados.

É interessante destacar que a quantidade de proteínas (mg/mL) no soro das carpas e piavussus em hipoxia apresentou queda estatisticamente significativa em relação aos animais controle. Porém, nos demais animais não vimos diferença estatística quanto à concentração de proteínas. Além disso, o peixe-dourado foi à única espécie que apresentou queda na quantidade de proteínas do fígado. Como a atividade de CarbE em  $\text{U.g}^{-1}$  de tecido no fígado dos peixes dourados em hipoxia sofreu queda e a atividade expressa por  $\text{U.mg}^{-1}$  de proteína não sofreu alteração (figura 19), talvez a queda da quantidade de proteínas tenha encoberto a diminuição da atividade enzimática quando expressa por mg de proteína.

As CarbE são muito estudadas também em animais expostos a xenobióticos. Estudos feitos por Gaustad *et al.* (1991) mostraram a inibição da atividade de CarbE no plasma, fígado e pulmão de porquinho da índia quando injetaram DFP (diisopropilfosforidato) ou paraoxon. A inibição dessa enzima mostra o seu papel protetor no organismo, pois ela remove fosfatos tóxicos que circulam no sangue que podem inibir as acetilcolinesterases (AChE), enzimas essenciais para manutenção dos impulsos nervosos colinérgicos (Massoulié *et al.*, 1993). Além disto, a CarbE de plasma de ratos tratados com DFP e paraoxon comporta-se de maneira diferente. No caso do paraoxon ela se reativa a cada apresentação ao paraoxon, reduzindo a toxicidade desde organofosforado a AChE, levando a uma tolerância. No caso de organofosforados menos tóxicos para a AChE, como o DFP, isto não acontece, isto é, não há reativação da CarbE. Desta maneira, a CarbE parece ser mais eficiente contra os organofosforados mais tóxicos para AChE do que para aqueles menos tóxicos para esta enzima (Dettbarn *et al.*, 1999). Clorpirifós, outro pesticida organofosfato usado na agricultura, também é um composto tóxico que inibe a atividade tanto da CarbE quanto da AChE em mamíferos (Chanda *et al.*, 1997). Trabalhos realizados com salmões e truta arco-íris expostos a clorpirifós mostraram inibição da atividade CarbE (Wheelock *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2007). Portanto, é possível que o ambiente hipóxico, ao diminuir os níveis de CarbE, torne os peixes mais susceptíveis aos organofosforados. Em nosso estudo, as tilápias apresentaram maiores níveis de carboxilesterase no soro (em torno de  $33 \text{ U.mL}^{-1}$ ) do que as demais espécies (tabela 1). Provavelmente as tilápias são menos susceptíveis à contaminação por organofosforados do que os outros teleósteos estudados, embora os níveis da atividade da enzima que observamos no fígado das espécies sejam semelhantes, com exceção dos pacus. Talvez esta semelhança na atividade de CarbE no fígado das espécies estudadas, deva-se a síntese de novo da enzima no fígado. Como a quantidade de proteínas no fígado variou apenas nos peixes dourados e somente as carpas e os piavussus apresentaram queda na

quantidade de proteínas no soro, é provável que ocorra uma diminuição da atividade da enzima tanto no soro quanto no fígado.

A hipoxia induz uma família de fatores de transcrição chamada de HIF (fatores induzidos por hipoxia) que se ligam a elementos de resposta a hipoxia (HRE) para traduzir proteínas e regular genes que estão associados à eritropoietina, fatores de crescimento vascular endotelial, transporte de glicose, enzimas glicolíticas, bem como enzimas envolvidas no metabolismo do ferro e na sobrevivência das células (Huang & Bunn, 2003; Guzi & Schumaker, 2006). A ativação dos HIF também é aumentada em muitos tumores e, em muitos casos, mesmo sem estar relacionado aos níveis de oxigenação. Talvez a diminuição da atividade de carboxilesterase possa ser regulada pelos HIF que priorizam a transcrição de proteínas antioxidantes, pois é possível que a hipoxia diminua a expressão gênica de certas proteínas devido à competição entre os HIF ou fatores acessórios.

Kolios *et al.* (2002) encontraram atividade de carboxilesterase em epitélio do cólon e na população de macrófagos na lâmina própria e sua atividade foi amplamente reduzida em pacientes com úlcera no cólon, uma das doenças inflamatórias do intestino (IBD). As possíveis explicações seriam que, tanto os macrófagos como a expressão e a síntese da carboxilesterase estariam diminuídos na doença, mesmo que os macrófagos sejam as células que predominam no processo inflamatório. Esses achados são ainda especulações, mas a associação de carboxilesterase com as células epiteliais do cólon vista por Kolios *et al.*, (2002) sugere que a enzima está relacionada com a produção de muco e mucinas que são mecanismos de defesa contra uma variedade de fatores abrasivos. Além disso, as carboxilesterases devem hidrolisar inibidores intracelulares, protegendo o organismo, e a sua falta nos macrófagos da lâmina própria indica deficiência da sua secreção (Kolios *et al.*, 2002). Como os peixes que mantivemos em hipoxia também apresentaram queda significativa de atividade de CarbE no soro e no fígado, e, já que em células tumorais humanas, normalmente em hipoxia devido a alta demanda de oxigênio, a atividade da enzima é também baixa, talvez a queda da CarbE ocorra em quaisquer células de vertebrados que forem submetidos à baixas concentrações de O<sub>2</sub> por determinado tempo.

A hipoxia também pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) que induzem danos às células ao reagirem com lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (Bokov *et al.*, 2004). O termo ERO inclui os radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical hidroxil (•OH), oxigênio singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), ozônio, peróxidos de lipídio, os óxido nítrico (NO) e peroxinítrico (ONOO<sup>•</sup>). Os radicais oxigênio singlet, hidroxil e peroxinítrico são os agentes químicos que mais induzem dano oxidante nos sistemas biológicos. As defesas

antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas são cruciais no controle do dano oxidante causado pelas ERO. Quando a concentração de moléculas oxidantes é maior do que a de moléculas antioxidantes ocorre o fenômeno conhecido como estresse oxidante (Hermes-Lima & Zenteno Savín, 2002). Em estudos realizados por Suto *et al.* (2007) ficou demonstrado que o oxigênio singlet é um forte inibidor de cisteína e serino-proteases. As serino-proteases possuem sua tríade catalítica composta dos resíduos serina, histidina e aspartato. O resíduo de histidina é o centro catalítico das serino e cisteíno-proteases e alvo preferencial do oxigênio singlet. A formação de compostos oxigenados na histidina deve quebrar a estrutura da tríade catalítica, inibindo a atividade da enzima (Suto *et al.*, 2007). Como a carboxilesterase apresenta os resíduos de serina e histidina, pode ser que a queda de sua atividade, nos peixes em que mantivemos em hipoxia, também se deva a produção do radical oxigênio singlet.

Como vimos que os níveis da atividade de carboxilesterase diminuíram significativamente em peixes mantidos em hipoxia, especulamos que se esses animais estiverem num ambiente com baixos níveis de O<sub>2</sub> provavelmente estarão mais susceptíveis a intoxicação por organofosforados, uma vez que os níveis de CarbE de seu soro poderão estar diminuídos por baixa expressão durante a hipoxia. Além disso, o soro, provavelmente, é o melhor tecido para analisar se um animal está sofrendo hipoxia, visto que a atividade de CarbE em fígado não variou em todos os animais estudados. Com isso, o piscicultor que usa organofosforados para diminuir a população de organismos indesejáveis dentro dos seus tanques deve sempre verificar o teor de O<sub>2</sub> presente na água, para evitar que peixes em hipoxia não consigam superar os efeitos tóxicos de tais xenobióticos e o criador venha a ter mortandade com prejuízo.

## CONCLUSÕES

Os peixes mais resistentes a hipoxia foram os apaiaris e os pacus;

Os peixes mantidos em hipoxia sofrem queda na atividade de carboxilesterase do soro;

Provavelmente a atividade e não a síntese da CarbE esteja diminuída nos animais submetidos a hipoxia, visto que a quantidade de proteínas só sofreu alteração nos soros da carpa e do piavussu;

O tempo para que ocorra a queda de tal atividade é diferente de espécie para espécie;

Será possível indicar se um peixe está em hipoxia pelo nível de atividade de carboxilesterase presente em seu soro. Tal atividade deve ser expressa em  $\text{U.mL}^{-1}$  de soro, uma vez que a variação da quantidade de proteínas pode encobrir o resultado;

Possivelmente os peixes que têm a atividade da carboxilesterase diminuída num ambiente em hipoxia fiquem mais susceptíveis à intoxicação por xenobióticos. Portanto, a atividade da CarbE pode ser útil na escolha da dosagem do pesticida no tanque;

As tilápias devem ser mais resistentes à intoxicação por agrotóxicos organofosfatos do que os outros animais estudados, devido os altos níveis de atividade de CarbE presentes em seu soro;

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. H.; MORAES, G.; AVILEZ, I. *et al.* Metabolical effects of Folidol 600 in the neotropical freshwater fish matrinxã, *Bricon cephalus*. *Environmental Research*, v. 95, p. 224-230, 2004.
- ALDRIGDE, W. N. Two types of esterase (A and B) hydrolyzing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemie Journal*, v. 53, p. 110-119, 1953.
- ALVARENGA, C. M. D.; VOLPATO, G. L. Agnostic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiology & Behavior*, v. 57 (1), p. 75-80, 1995.
- BASTOS, V. L. F. C.; SALLES, J. B.; VALENTE, R. H. *et al.* Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia tolerant fish of the Pantanal. *Biochemie*, v. 89, p. 1332-1342, 2007.
- BECKEMEIER, M. E.; BORA, P. S. Fatty acid ethyl ester: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 30, p. 2487-2494, 1998.
- BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of Aging and Development*, v. 125 (10-11), p. 811-826, 2004.
- 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*, v. 49, p. 445-455, 2004.
- CALHEIROS, D. F.; SEIDL, A. F.; FERREIRA, C. J. A. Participatory research methods in environmental science: local and scientific knowledge of a limnological phenomenon in the Pantanal wetland of Brazil. *Journal of Applied Ecology*, v. 37, p. 684-696, 2000.
- CHAHINIAN, H.; NINI, L.; BOITARD, E. *et al.* Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl ester and TAG. *Lipids*, v. 37 (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*, v. 38 (2), p. 148-157, 1997.
- CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-Biological Interactions*, v. 157-158, p. 277-283, 2005.
- DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature*, v. 4, p. 131-138, 2003.
- DELANEY, M.; KLESZIUS, P. H. Hypoxic conditions induce Hsp 70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, v. 236, p. 633-644, 2004.

DETTBARN, W-D.; YANG, Z. P.; MILATOVIC, D. Different role of carboxylesterases in toxicity and tolerance to paraoxon and DFP. *Chemico-Biological Interactions*, v. 119-120, p. 445-454, 1999.

DIAZ, R. J.; ROSENBERG, R. Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioral responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, v. 33, p. 245-303, 1995.

DUYSEN, E. G.; LI, B.; DARVESH, S. *et al.* Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-) huperzine A and donepezil suggests human with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. *Toxicology*, v. 233, p. 60-69, 2007.

ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. *Chemistry of Plant Protection*, v. 6, p. 65-107, 1990.

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*, v. 88, p. 134-142, 2007.

GAUSTAD, R.; JOHNSEN, H.; FONNUM, F. Carboxylesterases in guinea pig : A comparison of the different isoenzymes with regard to inhibition by organophosphorus compounds *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, v. 42 (7), p. 1335-1343, 1991.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry*, v. 264, p. 672-686, 1999.

GUICHARD, S.; TERRET, C.; HENNEBELLE, I. *et al.* CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase I activities in tumour and normal colon and liver tissues. *British Journal of Cancer*, v. 80 (3/4), p. 364-370, 1999.

GUZI, R. D.; SCHUMAKER, P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental Physiology*, v.91 (5), p. 807-819, 2006.

HAMAN, F.; ZWINGELSTEIN, G.; WEBER, J. Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading. *The American Journal of Physiological – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 273, p. 2046-2054, 1997.

HANNAN, M. L.; HAGGER, J. A.; JONES, M. B. *et al.* Characterisation of esterases as potential biomarkers of pesticide exposure in the lugworm *Arenicola marina* (Annelida: Polychaeta). *Environmental Pollution*, v. 152, p. 342-350, 2008.

HEFFRON P. F.; HOBBIKER, P. Relationship between inhibition of acetylcholinesterase and response of the rat phrenic nerve-diaphragm preparation to indirect stimulation at higher frequencies. *British Journal of Pharmacology*, v. 66(2), p. 323-329, 1979.

- HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 133, p. 537-556, 2002.
- HOLMES, R. S.; COX, L. A.; VANDEBERG, J. L. Mammalian carboxylesterase 5: Comparative biochemistry and genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, v. 3, p. 195-204, 2008.
- HUANG, L. E.; BUNN, H. F. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *The Journal of Biological Chemistry*, v.28 (22), p. 19575-19578, 2003.
- HYATT, J. L.; TSURKAN, L.; MORTON, C. L. *et al.* Inhibition of acetylcholinesterase by anticancer prodrug CPT-11. *Chemico-Biological Interactions*, v. 157-158, p. 247-252, 2005.
- JOKANOVIĆ, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, v. 166, p. 139-160, 2001.
- KOLIOS, G.; VALATAS, V.; PSILOPOULOS, D. *et al.* Depletion of non specific esterase activity in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 32, p. 265-273, 2002.
- KÜSTER, E. Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquatic Toxicology*, v. 75, p. 75-85, 2005.
- LAGUERRE, C.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; KÖHLER, H. R. *et al.* B-type esterases in the snail *Xeroptica derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. *Environmental pollution*, v. 157, p. 199-207, 2009.
- LAYER, P. G.; ALLEBRANDT, K.; ANDERMANN, P. *et al.* On the multifunctionality of cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*, v. 157-158, p. 37-41, 2005.
- LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L. *et al.* Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 193, p. 1001-1011, 2007.
- LEJUS, C.; BLANLOEIL, Y.; BURNAT, P. *et al.* Les cholinestérases. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation*, v. 17, p. 1122-1135, 1998.
- LENZ, D. E.; YENG, D.; SMITH, J. R. *et al.* Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. *Toxicology*, v. 233, p. 31-39, 2007.
- LI, B.; SEDLACEK, M.; MANOHARAN, I. *et al.* Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but no carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology*, v. 70, p. 1673-1684, 2005.
- LUND-PERO, M.; JEPPSON, B.; PERO, R. W. Reduced nonspecific steroidal esterase activity in human malignant tumor tissue from liver, colon and breast when compared to peritumoral and normal tissue levels. *Anticancer Research*, v. 14(68), p. 2747-53, 1994.

- 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*, 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*, 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*, v. 200, p. 411-419, 1997.
- MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I. Human serum paraoxonase. *General Pharmacology*, v. 31 (3), p. 329-339, 1998.
- MASSOULIÉ, J.; PERRIER, N.; NOUREDDINE, H. *et al.* Old and new questions about cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*, v. 175, p. 30-44, 2008.
- MASSOULIÉ, J.; PEZZMENTI, L.; BON, S. *et al.* Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, v. 41, p. 31-91, 1993.
- MATZOW, T.; COWEN, R. L.; WILLIAMS, K. J. *et al.* Hypoxia-targeted over-expression of carboxylesterase as a means of increasing tumour sensitivity to irinotecan (CPT-11). *The Journal of Gene Medicine*, v. 9, p. 244-252, 2007.
- 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*, v. 315, p. 495-512, 1994.
- MUNGER, J. S.; SHI, P.; MARK, E. A. *et al.* A serine esterase released by human alveolar macrophages is closely related to liver microsomal carboxylesterases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266 (28), p. 18832-18838, 1991.
- 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*, v. 120, p. 151-156, 1998.
- NIKINMAA, M. Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. *Respiration Physiology*, v. 128, p. 317-329, 2001.
- NIKINMAA, M.; REES, B. B. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *The American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 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*, v. 207, p. 3131-3139, 2004.

- OLIVEIRA, M. M.; FILHO, M. V. S.; BASTOS, V. L. F. *et al.* Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. *Marine Environmental Research*, v. 63, p. 303-312, 2007.
- 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.
- PANEPUCCI, R. A.; PANEPUCCI, L.; FERNANDES, M. N. *et al.* The effect of hypoxia and recuperation on carbohydrate metabolism in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Brazilian Journal of Biology*, v. 61 (4), p. 547-554, 2001.
- PATHIRATNE, A.; GEORGE, S. G. Toxicity of malathion to Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and modulation by other environmental contaminants. *Aquatic Toxicology*, v. 43, p. 261-271, 1998.
- PETERSON, G.L.A. Simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, v. 83, P. 346-356, 1977.
- POTTER, V. R.; ELVEHJEM, C. A. A modified method for the study of tissue oxidations. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 114, p. 495-504, 1936.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*, 4 ed., Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2001.
- 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*, v. 119, p. 991-997, 1998.
- REDINBO, M. R.; POTTER, P. M. Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug discovery Today (DDT)*, v. 10, p. 313-325, 2005.
- RYTKÖNEN, K. T.; RYYNÄNEN, H. J.; NIKINMAA, M. *et al.* Variable patterns in the molecular evolution of the hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) gene in teleost fishes and mammals. *Gene*, v. 420, p. 1-10, 2008.
- SAINT-PAUL, U.; BERNARDINO, G. Behavioural and ecomorphological responses of the neotropical pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalmodae) to oxygen-deficient waters. *Experimental Biology*, v. 48 (1), p. 19-26, 1988.
- SALLES, J. B.; BASTOS, V. L. F. C.; FILHO, M. V. S. *et al.* A novel butyrylcholinesterase from serum of *Leporinus macrocephalus*, a Neotropical fish. *Biochimie*, v. 88, p. 59-68, 2006.
- SATOH, T. Toxicological implications of esterases - From molecular structures to functions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 207, p. S11-S18, 2005.
- SATOH, T.; HOSOKAWA, M. Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. *Toxicology Letters*, v. 82/83, p. 439-445, 1995.

SATOH, T.; HOSOKAWA, M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*, v. 162, p. 195-211, 2006.

SOITAMO, A. J.; RABERGH, C. M. I.; GASSMANN, M. *et al.* Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1) from rain-bow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 19699-19705, 2001.

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*, v. 279 (39), p. 40683-40689, 2004.

SONNA, L. A.; CULLIVAN, M. L.; SHELDON, H. K. *et al.* The effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HEPG2). *Physiological Genomics*, v. 12 (3), p. 195-207, 2003.

STADNYK, A. W.; BEFUS, A. D.; GAULDIE, J. Characterization of nonspecific esterase activity in macrophages and intestinal epithelium of the rat. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 38 (1), p. 1-6, 1990.

STEDMAN, E.; STEDMAN, E.; EASSON, L. Choline-esterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse Choline-esterase. *Biochemical Journal*, v. 26, p. 2056-2066, 1932.

SUTO, D.; IUCHI, Y.; IKEDA, Y. *et al.* Inactivation of cysteine and serine proteases by singlet oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 461, p. 151-158, 2007.

VAN GINNEKEN, V. J. T.; VAN DEN THILLART, G. E. E. J. M.; MULLER, H. J. *et al.* Phosphorylation state of red and white muscle in tilapia during graded hypoxia: an in vivo <sup>31</sup>P-NMR study. *The American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 277, p. 1501-1512, 1999.

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*, v. 74, p. 172-192, 2005.

WU, R. S. S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, 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*, v. 35, p. 207-217, 2006.

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*, v. 57, p. 1160-1171, 2000.