

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS DO INSETICIDA ORGANOFOSFORADO METIL
PARATION (FOLISUPER 600 BR[®]) SOBRE BIOMARCADORES DO
ESTRESSE OXIDANTE NO TELEÓSTEO DE ÁGUA DOCE
MATRINXÃ *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) E O PAPEL DA
SUPLEMENTAÇÃO DE SELÊNIO NA DIETA**

DIANA AMARAL MONTEIRO

SÃO CARLOS

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS DO INSETICIDA ORGANOFOSFORADO METIL
PARATION (FOLISUPER 600 BR[®]) SOBRE BIOMARCADORES DO
ESTRESSE OXIDANTE NO TELEÓSTEO DE ÁGUA DOCE
MATRINXÃ *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) E O PAPEL DA
SUPLEMENTAÇÃO DE SELÊNIO NA DIETA**

DIANA AMARAL MONTEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

SÃO CARLOS

2006

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

M775ei

Monteiro, Diana Amaral.

Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR[®]) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água doce matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta / Diana Amaral Monteiro. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

163 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Peixe - fisiologia. 2. Metil parathion. 3. Estresse oxidativo. 4. Matrinxã. 5. Selênio. I. Título.

CDD: 597.01 (20^a)

Orientadora

Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin

“There is no final experiment. Nature, like a miracle, constantly challenges our perception. Science, at best, is really an art of partial truths.”

RAJENDRA RAGHOW

**A minha mãe por todo amor, dedicação,
incentivo e pelos valores que norteiam
a minha vida e ao Maurício
que viveu esta e outras
tantas histórias, ao meu lado, me
motivando sempre com seu amor,
carinho e paciência.**

DEDICO

**A minha orientadora, Profa. Ana Lúcia Kalinin,
pela confiança depositada cegamente
em mim, pelo exemplo, competência
profissional, caráter e generosidade.
Minha eterna gratidão,
todo meu respeito e a
minha admiração.**

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À amiga Ana Lúcia Kalinin, que além da dedicada orientação e paciência, sempre se fez presente com seu zelo, carinho, incansável estímulo e com seus “*Oi tiança feliz, zuzu bem?*” capazes de arrancar um sorriso mesmo numa segunda-feira chuvosa às 7:15 da manhã.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Cleoni dos Santos Carvalho e Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto, por terem gentilmente aceitado analisar este trabalho e pelas grandes colaborações que fizeram.

À Universidade Federal de São Carlos pela infra-estrutura e facilidades proporcionadas, mais uma vez.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, particularmente àqueles professores que eu tive a oportunidade de conviver mais de perto cursando suas disciplinas oferecidas na Pós-Graduação e ao querido Seu Nelson (*in memoriam*).

À secretaria da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) pelo atendimento aos pedidos e solicitações.

A todos os amigos do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa: Ana Carolina, André, Cheila, Cláudia, Cláudio, Cleo, Cleoni, Cleverson, Daniela, Danilo, Eliane, Ellen, Fábio, Fernanda, Guilherme, Hugo, Jeane, Kátia, Laila, Lenise, Lyandra, Marise, Mônica, Patrícia, Thiago, Tiago, Vanessa, Vinícius e Wagner.

Ao Prof. Francisco Tadeu Rantin pela total disponibilidade do seu laboratório e por seu pronto auxílio sempre que precisei.

À Profa. Marisa Narciso Fernandes que permitiu a utilização de diversos equipamentos em seu laboratório.

À Profa. Keico Okino Nonaka pelos inestimáveis ensinamentos e palavras de apoio, sempre me mostrando o caminho a seguir, além do exemplo do que é ser um(a) professor(a) de uma Universidade Federal e de sua agradável companhia numa mesa repleta de Bohemias.

Ao professor Luiz Edivaldo Pezzato da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP (Botucatu- SP) por disponibilizar seu laboratório para o preparo das rações.

Ao Prof. Francisco R.M. Laurindo e ao seu orientado Célio X. Santos do Instituto do Coração (INCOR) da Faculdade de Medicina de São Paulo – USP pelas análises de HPLC realizadas em seu laboratório.

À Piscicultura Águas Claras (Mococa-SP) da família Martinho Colpani pela gentil doação dos exemplares de matrinxã.

À Supremais - Nutrição Animal (Valinhos-SP) pela doação do premix livre de selênio e do selenito de sódio.

Aos amigos Moniquete, Binho, Cléo ♀, Katchaça, Claudinho, Dedé, Fer e Cleo ♂ pelas agradáveis companhias, pelo apoio, pelos momentos engraçados e claro, por aquelas bem geladas.

As amigas Karine (Mané), Juliana (Juju) e Fabiana (Bia), por todo carinho, pela amizade e força nos momentos difíceis.

A todos os professores da graduação do curso de Ciências Biológicas da UFSCar, responsáveis por grande parte do que sou hoje, em especial aqueles que foram muito mais que simples professores Gilberto Moraes, Marco A. Del Lama, Julio C. Garavello, Nivaldo Nordi e Manoel M.D. Filho.

A todos aqueles que, apesar de não citados nominalmente, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro, sem o qual este trabalho não seria realizado.

"De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre começando;
a certeza de que precisamos continuar;
a certeza de sermos interrompidos antes de terminar.

Portanto, devemos:
fazer da interrupção um novo caminho;
da queda, um passo de dança;
do medo, uma escada;
do sonho, uma ponte;
da procura, um encontro."

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	01
1.1.1 Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$).....	04
1.1.2 Radical hidroxil (OH^{\cdot}).....	05
1.1.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	06
1.1.4 Oxigênio “singlet” (1O_2).....	06
1.2 Estresse Oxidante.....	07
1.3 Peroxidação de Lipídios ou Lipoperoxidação (LPO).....	10
1.4 Defesas Antioxidantes.....	15
1.4.1 Antioxidantes enzimáticos.....	17
1.4.1.1 Superóxido dismutase (SOD – E.C. 1.15.1.1).....	17
1.4.1.2 Catalase (CAT – E.C.1.11.1.16).....	19
1.4.1.3 Glutaciona peroxidase (GPx – E.C. 1.11.1.9).....	21
1.4.1.4 Glutaciona S-transferase (GST – E.C. 2.5.1.18).....	25
1.4.2 Antioxidantes não-enzimáticos.....	26
1.4.2.1 Glutaciona (GSH).....	26
1.4.2.2 Selênio (Se).....	29
1.4.2.3 Outros antioxidantes não-enzimáticos.....	34
1.5 Defesas Antioxidantes em Peixes.....	37
1.6 Pesticidas e Estresse Oxidante.....	39
1.7 Metil Paration (MP).....	43
1.7.1 Modo de ação do metil paration.....	45
1.8 Biomarcadores do Estresse Oxidante.....	48
1.9 A Espécie <i>Brycon cephalus</i>	50
1.10 Objetivos Gerais.....	53
1.10.1 Objetivos específicos.....	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Reagentes e Drogas.....	54
2.2 Animais.....	54
2.3 Delineamento Experimental I.....	54
2.4 Delineamento Experimental II.....	57
2.5 Coleta de Amostras.....	60
2.6 Determinação das Características Físicas e Químicas da Água.....	60
2.6.1 pH e Alcalinidade.....	60

2.6.2 Dureza total.....	61
2.6.3 Nitrito.....	61
2.6.4 Amônia.....	61
2.6.5 Oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura.....	62
2.6.6 Concentração de metil paration na água.....	62
2.7 Procedimentos Bioquímicos.....	62
2.7.1 Preparação do hemolisado.....	63
2.7.2 Determinação de proteína total.....	63
2.7.3 Determinação de hemoglobina total (Hb).....	63
2.7.4 Determinação dos níveis de hidroperóxido de lipídios (HP)	64
2.7.5 Determinação da atividade da superóxido total (SOD).....	64
2.7.6 Determinação da atividade da catalase (CAT).....	65
2.7.7 Determinação da atividade da glutaciona peroxidase (GPx).....	66
2.7.8 Determinação da atividade da glutaciona S-transferase (GST).....	66
2.7.9 Determinação do conteúdo glutaciona reduzida (GSH) no sangue e nos tecidos.....	67
2.7.10 Determinação da concentração de selênio (Se)nos tecidos e na ração.....	68
2.8 Tratamento estatístico dos dados.....	69
3 RESULTADOS	71
3.1 Protocolo Experimental I.....	71
3.2 Protocolo Experimental II.....	79
3.3 Protocolo Experimental I e II (Resultados da Interação).....	90
4 DISCUSSÃO	98
4.1 Protocolo Experimental I.....	98
4.2 Protocolo Experimental II.....	108
4.3 Interação entre Se e MP (Efeito do selênio na resposta ao metil paration).....	119
5 CONCLUSÕES	127
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	128
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
8 APÊNDICES	158

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADROS

Quadro 1: Produção do radical hidroxil a partir de peróxido de hidrogênio (reação de Fenton) ou do ânion superóxido (reação de Haber-Weiss).....	05
Quadro 2: Reações da cadeia de propagação da peroxidação lipídica.....	13
Quadro 3: Desintoxicação do ânion superóxido ($O^{\bullet-}$), produzido durante o metabolismo celular, pela enzima superóxido dismutase (SOD).....	17
Quadro 4: Desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido durante o metabolismo celular, pela enzima catalase (CAT).....	20
Quadro 5: Oxidação da GSH a GSSH, pela ação da GPx, utilizando H_2O_2 como substrato.....	21
Quadro 6: Oxidação da GSH a GSSH, pela ação da GPx, utilizando hidroperóxido de lipídio (LOOH) como substrato. Onde: LOOH - hidroperóxido lipídico; LOH - álcool não-tóxico derivado do LOOH.....	22
Quadro 7: Redução da glutatona oxidada (GSSG) a glutatona reduzida (GSH) pela ação glutatona redutase (GR), uma flavoenzima NADPH – dependente.....	22
Quadro 8: Conjugação da glutatona reduzida (GSH) com substrato eletrofílico tóxico (xenobiótico) pela ação glutatona S-transferase (GST).....	25

FIGURAS

Figura 1: Redução tetravalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água. Várias espécies reativas de O_2 são formadas neste processo.....	02
Figura 2: Representação esquemática do estresse oxidante como resultado do desbalanço entre os níveis de antioxidantes (AOX) e das espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidante ocorre quando o equilíbrio é perturbado pelo excesso das espécies reativas ou pela redução das defesas antioxidantes.....	09
Figura 3: Esquema mostrando alguns iniciadores de geração das ERO e as conseqüências biológicas do estresse oxidante que originam uma variedade de disfunções que podem resultar em morte celular.....	10
Figura 4: Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia.....	12
Figura 5: Danos celulares causados pelas ERO. As ERO iniciam a peroxidação lipídica nas membranas celular, mitocondrial, nuclear e do retículo endoplasmático.....	12
Figura 6: Representação das fases do processo de peroxidação lipídica.....	14
Figura 7: Mecanismo catalítico da enzima GPx selênio-dependente sobre a GSH.....	24
Figura 8: Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os principais mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante.....	27

Figura 9: Estrutura e representação da molécula de glutathiona reduzida (GSH).....	28
Figura 10: Inter-relação entre as ERO, componentes celulares e sistema antioxidante. Destaque para a atuação de antioxidantes não-enzimáticos exógenos (vitamina E e minerais como o Se, Cu e Fe) como possíveis focos de intervenção através da suplementação na dieta.....	35
Figura 11: Esquema representando o sistema de defesa antioxidante (enzimático e não-enzimático) em células de mamíferos.	38
Figura 12: Estrutura química do metil paration.....	44
Figura 13: Representação de um exemplar de <i>Brycon cephalus</i>	51
Figura 14: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados em fígado de <i>Brycon cephalus</i> dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutathiona peroxidase (GPx); D: glutathiona S-transferase (GST); E: glutathiona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.....	74
Figura 15: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados em músculo branco de <i>Brycon cephalus</i> dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutathiona peroxidase (GPx); D: glutathiona S-transferase (GST); E: glutathiona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.....	75
Figura 16: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados em brânquias de <i>Brycon cephalus</i> dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutathiona peroxidase (GPx); D: glutathiona S-transferase (GST); E: glutathiona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.....	76
Figura 17: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados nos eritrócitos de <i>Brycon cephalus</i> dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutathiona peroxidase (GPx); D: hidroperóxido de lipídio (HP); E: glutathiona reduzida sanguínea (GSH). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.....	77
Figura 18: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados no plasma de <i>Brycon cephalus</i> dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: glutathiona peroxidase (GPx); C: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.....	78
Figura 19: Concentração de selênio no fígado, músculo branco e brânquias de matrinxãs arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg ⁻¹ de ração por 60 dias. * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.....	80

- Figura 20:** Comparação entre os diferentes parâmetros analisados em fígado de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutaciona peroxidase (GPx); D: glutaciona S-transferase (GST); E: glutaciona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M..... 82
- Figura 21:** Comparação entre os diferentes parâmetros analisados em músculo branco de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutaciona peroxidase (GPx); D: glutaciona S-transferase (GST); E: glutaciona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M..... 84
- Figura 22:** Comparação entre os diferentes parâmetros analisados nas brânquias de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutaciona peroxidase (GPx); D: glutaciona S-transferase (GST); E: glutaciona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M..... 85
- Figura 23:** Comparação entre os diferentes parâmetros analisados nos eritrócitos de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutaciona peroxidase (GPx); D: hidroperóxido de lipídio (HP); E: glutaciona reduzida sanquímica (GSH). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M..... 88
- Figura 24:** Comparação entre os diferentes parâmetros analisados no plasma de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: glutaciona peroxidase (GPx); C: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M..... 89
- Figura 25:** Diagrama mostrando as possíveis vias de ação do metil paration e do selênio no metabolismo oxidante celular de *Brycon cephalus*..... 125

TABELAS

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio (ERO) e suas respectivas meias-vidas.....	03
Tabela 2: ERO e antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.....	37
Tabela 3: Níveis de garantia por Kg do produto segundo fabricante (Fri-Acqua 35, Rações Fri-Ribe S.A.).....	56
Tabela 4: Composição percentual e química e análise bromatológica das dietas utilizadas no experimento com variação de níveis de selênio (Protocolo experimental II).....	58
Tabela 5: Programa de aquecimento utilizado na mineralização das amostras de ração e de tecidos de matrinxã em forno de microondas.....	68
Tabela 6: Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de Se em de amostras de ração e de tecidos de matrinxã.....	69
Tabela 7: Características físicas e químicas da água controle e com 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] , medidas ao longo do período experimental. Os valores são médias \pm EPM das quatro amostras de água coletadas a cada 24 horas de experimento.....	71
Tabela 8: Valores médios \pm EPM dos parâmetros biométricos de matrinxãs do grupo controle e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®]	72
Tabela 9: Razão HP/CAT+GPx para os diferentes tecidos de <i>Brycon cephalus</i> dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (MP, n = 10) por 96 h.....	73
Tabela 10: Valores médios \pm E.P.M. da concentração de selênio ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) em fígado (n = 6), músculo branco (n = 4) e brânquias (n = 6) de <i>Brycon cephalus</i> alimentados com dietas contendo 0 ou 1,5 mg Se.Kg ⁻¹ de ração durante 60 dias.....	80
Tabela 11: Valores médios \pm E.P.M. dos parâmetros biométricos de matrinxãs do grupo controle e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg ⁻¹ de ração por 60 dias.....	81
Tabela 12: Razão HP/CAT+GPx para os diferentes tecidos de <i>Brycon cephalus</i> dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg ⁻¹ de ração por 60 dias.....	87
Tabela 13: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg proteína ⁻¹), SOD (U.mg proteína ⁻¹), CAT (U.B..mg proteína ⁻¹), GPx (U.mg proteína ⁻¹), GST (nmol.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹) e GSH (nmol.mg proteína ⁻¹) em fígado de matrinxãs arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg ⁻¹ de ração) por 60 dias expostos (n = 10) ou não (n = 10) a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (mg.L ⁻¹). Análise Two-Way.....	93
Tabela 14: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg proteína ⁻¹), SOD (U.mg proteína ⁻¹), CAT (U.B..mg proteína ⁻¹), GPx (U.mg proteína ⁻¹), GST (nmol.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹) e GSH (nmol.mg proteína ⁻¹) em músculo branco de matrinxãs arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg ⁻¹ de ração) por 60 dias expostos (n = 10) ou não (n = 10) a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (mg.L ⁻¹). Análise Two-Way.....	94

Tabela 15: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg proteína ⁻¹), SOD (U.mg proteína ⁻¹), CAT (U.B..mg proteína ⁻¹), GPx (U.mg proteína ⁻¹), GST (nmol.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹) e GSH (nmol.mg proteína ⁻¹) nas brânquias de matrinxãs arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg ⁻¹ de ração) por 60 dias expostos (n = 10) ou não (n = 10) a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (mg.L ⁻¹). Análise Two-Way.....	95
Tabela 16: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg Hb ⁻¹), SOD (U.mg Hb ⁻¹), CAT (U.B..mg Hb ⁻¹), GPx (U.mg Hb ⁻¹) e GSH sanguínea (mmol.L ⁻¹) nos eritrócitos de matrinxãs arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg ⁻¹ de ração) por 60 dias expostos (n = 10) ou não (n = 10) a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (mg.L ⁻¹). Análise Two-Way.....	96
Tabela 17: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg proteína ⁻¹), SOD (U.mg proteína ⁻¹) e GPx (U.mg proteína ⁻¹) no plasma de matrinxãs arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg ⁻¹ de ração) por 60 dias expostos (n = 10) ou não (n = 10) ao a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] (mg.L ⁻¹). Análise Two-Way.....	97
Tabela 18: Quadro sinóptico das respostas observadas nos diversos parâmetros analisados em <i>Brycon cephalus</i> expostos a 2 ppm de Folisuper 600 BR [®] e arraçoados com 0; 0,22 e 1,50 mg Se.Kg ⁻¹ de ração, quando comparados à condição dos controles.....	126

APÊNDICES

Apêndice 1: Curva-padrão de metil paration (Folisuper 600 BR [®]).....	158
Apêndice 2: Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos de HPLC e espectrofotometria para a determinação de GSH nos tecidos dos animais do protocolo experimental I.....	159
Apêndice 3: Correlação observada nos eritrócitos dos animais expostos ao MP e arraçoados com dieta contendo 1,5 mg Se.Kg ⁻¹	160
Apêndice 4: Correlações observadas no músculo branco dos animais expostos ao MP em função dos diferentes tipos de arraçoamento (0, 0,22 e 1,5 mg Se.Kg ⁻¹). A: HP <i>versus</i> GPx; B: HP <i>versus</i> GSH; C: GPx <i>versus</i> GSH; D: GPx <i>versus</i> CAT.....	161
Apêndice 5: Correlações observadas nas brânquias dos animais expostos ao MP em função dos diferentes tipos de arraçoamento (0, 0,22 e 1,5 mg Se.Kg ⁻¹). A: HP <i>versus</i> GPx; B: HP <i>versus</i> GSH; C: GPx <i>versus</i> GSH.....	162
Apêndice 6: Correlações observadas nos eritrócitos dos animais expostos ao MP em função dos diferentes tipos de arraçoamento (0, 0,22 e 1,5 mg Se.Kg ⁻¹). A: HP <i>versus</i> GPx; B: HP <i>versus</i> GSH; C: GPx <i>versus</i> GSH.....	163

ABREVIATURAS

ERO = Espécies reativas de oxigênio

O₂ = Oxigênio molecular

O₂^{•-} ou O₂^{-•} ou O₂⁻ = Radical superóxido ou ânion superóxido

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

HO[•] = Radical hidroxil

LOO[•] = Radical Peroxil

LO[•] = Radical alcoxil

LOH = Álcool derivado de ácido graxo

¹O₂ = Oxigênio “Singlet”

HO₂[•] = Radical hidroperoxil

LOOH = Hidroperóxido orgânico

LPO = Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica

NBT = “*Nitro blue tetrazolium*”

FOX = Ferrous

NADPH = Nicotinamida de adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NADP⁺ = Nicotinamida de adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)

OP = Pesticida organofosforado

MP = Metil paration

Se = Selênio

CuZn SOD = Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

Mn SOD = Superóxido dismutase dependente de manganês

CAT = Catalase

GPx = Glutaciona peroxidase

GST = Glutaciona S-transferase

GR = Glutaciona redutase

HP = Hidroperóxido de lipídio

GSH = Glutaciona reduzida

GSSG = Glutaciona oxidada

PDG = Glutaminase dependente de fosfato

PC = Ciclo das pentoses fosfato

IHS = Índice hepático-somático

MDA = Malondialdeído

TBARS = Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

LDL = Lipoproteínas de baixo peso molecular

AChE = Acetilcolinesterase

ACh = Acetilcolina

EEAs = Aminoácidos excitatórios

G6PDH = Glicose 6-fosfato desidrogenase

NMDA = *N*-metil-D-aspartato

GCL = Glutamato-cisteína ligase

GT = γ -glutamyltransferase

GMPc = guanosina monofosfato cíclico

Ser = Serina

Gly ou Gli = Glicina

Cys ou Cis = Cisteína

Glu = Glutamato

RESUMO

O metil paration (MP) é um organofosforado amplamente utilizado na agricultura e na aquicultura devido a sua elevada atividade inseticida. Seu emprego tanto na agricultura e no armazenamento de alimento quanto em tanques de cultivo de peixes para combater os estágios larvais de insetos predadores pode resultar em diferentes tipos de contaminação ambiental. O efeito da exposição a 2 ppm da formulação comercial do MP (Folisuper 600 BR[®], metil paration 600 g.L⁻¹) nas atividades da catalase (CAT), da glutaciona peroxidase (GPx), da superóxido dismutase (SOD) e da glutaciona S-transferase (GST), bem como nos níveis de glutaciona reduzida (GSH) e de peroxidação lipídica (LPO) no fígado, músculo branco, brânquias, eritrócitos e plasma do peixe de água doce, matrinxã, *Brycon cephalus*, foi avaliado após 96 horas de tratamento. A exposição ao MP resultou na indução significativa da atividade da SOD e da CAT em todos os tecidos, exceto no plasma. Entretanto, a atividade de GPx diminuiu significativamente no músculo branco e nas brânquias enquanto que nenhuma alteração foi observada nas atividades hepática, plasmática e eritrocitária da GPx. A exposição ao MP também induziu um aumento significativo na atividade da GST em todos os tecidos e uma simultânea diminuição nos níveis de GSH do sangue e dos tecidos. Além disso, os valores de LPO no músculo branco, nas brânquias e no plasma aumentaram significativamente enquanto que no fígado e nos eritrócitos não foi observada nenhuma alteração significativa. Os resultados do presente trabalho sugerem que o MP é um potente indutor de estresse oxidante em *B. cephalus* e que as brânquias e o músculo branco são os órgãos mais sensíveis e com um baixo potencial antioxidante. Os parâmetros analisados no presente estudo constituem bons biomarcadores de exposição ao MP. O efeito antioxidante do selênio (Se) em reduzir o estresse oxidante induzido pelo MP, neste modelo experimental, foi avaliado em matrinxãs alimentados durante 60 dias, antes da exposição a 2 ppm do MP, com dietas contendo 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração (grupo MP 1,5Se) ou com dieta livre deste mineral (grupo MP 0Se). Os peixes que receberam dieta sem Se e expostos ao MP exibiram, em todos os tecidos, a mesma resposta dos matrinxãs do primeiro experimento, os quais receberam ração comercial contendo 0,22 mg Se. Kg⁻¹ de ração (grupo MP 0,22Se). A suplementação com Se reverteu este padrão. Não houve aumentos significativos nos níveis de LPO e nem concomitantes diminuições da atividade da GPx nas brânquias e no músculo branco do grupo MP 1,5Se. Similarmente, a diminuição nos níveis de GSH, em todos os tecidos, não foi observada neste grupo. Além disso, a atividade de GPx nos eritrócitos e no plasma aumentou significativamente no grupo MP 1,5Se, acompanhada de redução e/ou manutenção dos níveis de LPO. Estes resultados sugerem que a suplementação da dieta com Se oferece proteção contra o estresse oxidante induzido pelo MP, sendo que a prevenção do aumento dos níveis da LPO e da diminuição no conteúdo de GSH e da atividade da GPx nos tecidos de *B. cephalus*, durante a exposição ao MP, reforçam esta idéia. De acordo com estes resultados, a suplementação da dieta com Se representa uma importante ferramenta para neutralizar os danos oxidantes induzidos pelo MP em *B. cephalus*.

ABSTRACT

Methyl parathion (MP) is an organophosphorus insecticide worldwide used in agriculture and aquaculture due to its high activity against a broad spectrum of insect pests. It is employed as pesticide in agriculture and in food storage shelters, as well as in fish culture tanks to kill aquatic larval stages of insects. The effect of exposure to 2 ppm of a commercial formulation of MP (Folisuper 600 BR[®], methyl parathion 600 g.L⁻¹) on catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LPO) of the liver, white muscle, gills, erythrocytes and plasma of the freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*, was evaluated after 96 h of treatment. MP exposure resulted in a significant induction of SOD and CAT activity in all tissues, except in plasma, when compared with controls. However, the GPx activity decreased significantly in the white muscle and gills, whereas no alterations were observed in hepatic, plasma and erythrocyte GPx activity. MP also induced a significant increase in GST activity in all tissues and a concurrent decrease in blood and tissue GSH levels. In addition, LPO values in the white muscle, gills and plasma increased significantly after MP exposure whereas hepatic and erythrocyte LPO levels did not show any significant alteration. The current data suggest that MP has oxidative-stress-inducing potential in *B. cephalus*, and that the gills and white muscle are the most sensitive organs with poor antioxidant potentials. The parameters studied in this investigation can also be used as biomarkers of exposure to MP. The antioxidant effect of selenium (Se) in reducing the MP-induced oxidative stress in this experimental model was evaluated in fish fed during 60 days, before exposure to 2 ppm of MP, with diets containing 1.5 mg Se.Kg⁻¹ ration (group MP 1,5Se) or Se-free ration (group MP 0Se). Group MP 0Se exhibited, in all tissues, the same response presented by fish of the first experimental protocol, fed with commercial ration (group MP 0,22Se). Selenium supplementation reversed this trend. Significant increases in LPO levels and concurrent decreases in GPx activity in gills and white muscle were not observed in group MP 1,5Se. Similarly, decreases in GSH levels were not observed in any tissue of this experimental group. In addition, erythrocyte and plasma GPx activity also increased significantly in group MP 1,5Se, with a concomitant reduction and/or maintenance of LPO levels. These results suggest that dietary Se supplementation may protect cells against MP-induced oxidative stress, preventing increases in LPO levels and decreases in GSH content and GPx activity in *B. cephalus* tissues. According to these data Se supplementation is important to counteract the oxidative damage induced by MP in *B. cephalus*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

O oxigênio (O_2) é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido, o que resulta na formação de vários agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode produzir Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), a partir do oxigênio (OGA, 2003).

As ERO, comumente conhecidas como radicais livres, são átomos, moléculas ou íons que possuem um ou mais elétrons não-pareados em seus orbitais mais externos, o que as tornam extremamente reativas, sendo capazes de combinar-se inespecificamente com diversas moléculas integrantes das estruturas celulares e derivadas de cada uma delas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). As ERO, em geral, são formadas por absorção de radiação, por reações redox ou por processos de catálise enzimática (SLATER, 1984). ERO é um termo freqüentemente usado para incluir também espécies que não são radicais livres, por exemplo, algumas moléculas derivadas do O_2 , que são capazes de gerar radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2000).

Estas espécies químicas, formadas por elétrons livres ou não-pareados têm uma instabilidade elétrica muito grande, e por esta razão, mesmo tendo meia vida curta, apresentam grande capacidade reativa. A fim de captar um elétron para sua estabilização, estes radicais podem reagir com qualquer composto que esteja próximo, como açúcares, proteínas, lipídios, DNA entre outros e, a partir daí, ocorrem reações em cadeia que podem culminar em lesão e morte celular (SLATER, 1984; HALLIWELL, 1987; JORDÃO JUNIOR et al., 1998).

A geração contínua das ERO é um processo fisiológico característico do ciclo respiratório celular (SIES, 1991; STOREY, 1996). Os organismos obtêm o ATP da redução completa do O_2 na membrana mitocondrial. Aproximadamente, em torno de 95 a 98% de todo o O_2 utilizado pelas mitocôndrias é reduzido, formando água. Durante o processo de fosforilação oxidativa, o sistema enzimático citocromo oxidase é o responsável pela redução tetravalente do O_2 , fornecendo simultaneamente quatro elétrons ao oxigênio, que se reduz diretamente à água (**Figura 1**).

Entretanto, esse O_2 pode ser reduzido incompletamente (receber menos de quatro elétrons), originando intermediários altamente reativos e danosos às células, resultando no acúmulo destas ERO (FLOYD, 1984). Durante este processo, são formados intermediários reativos como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxil (HO_2^{\cdot}) e hidroxil (OH^{\cdot}) e o peróxido

de hidrogênio (H_2O_2). Em mamíferos, estima-se que de 1 a 4% do O_2 consumido seja convertido a $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 devido às falhas fisiológicas na mitocôndria, que permitem que os elétrons escapem sem que sejam transferidos para o oxigênio (BOVERIS & CHANCE, 1973). A formação destes intermediários reativos se deve às características estruturais da molécula de O_2 , que favorecem sua redução em etapas seqüenciais (monoeletrônicas), como segue na **Figura 1**.

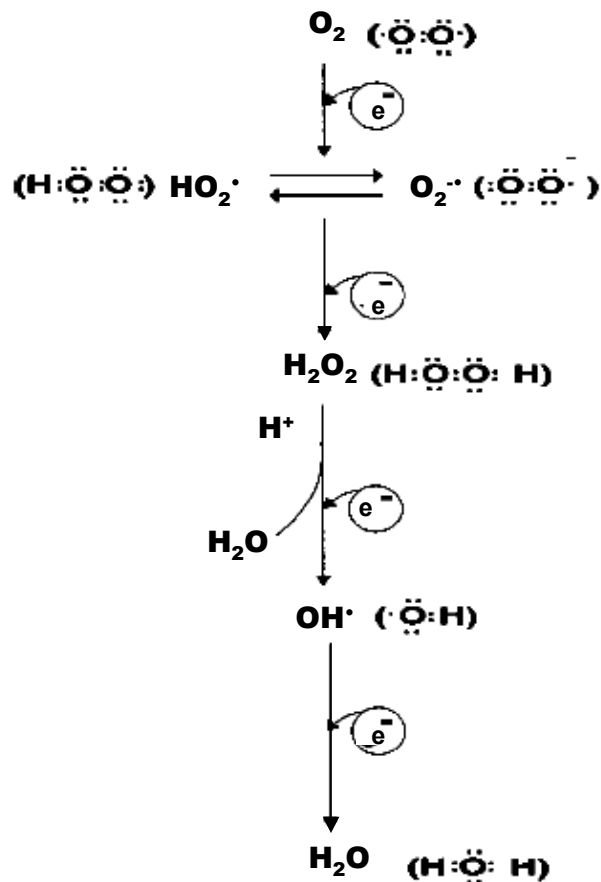


Figura 1: Redução tetraeletrônica do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água. Várias espécies reativas de O_2 são formadas neste processo. Adaptado de COHEN, 1989.

Conforme HALLIWELL & GUTTERIDGE (1989), aproximadamente 85 a 90% do oxigênio que respiramos são utilizados pelas mitocôndrias, através da cadeia de transporte de elétrons como descrito anteriormente. Os 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases, oxigenases e também por reações químicas de oxidação direta.

As principais fontes endógenas geradoras das ERO, além das mitocôndrias, incluem as atividades de algumas enzimas como: xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidases, as enzimas envolvidas na via de produção de prostaglandinas e tromboxanos e a NADPH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos, que produzem uma grande quantidade de ERO em resposta ao estímulo fagocitário (ROVER JÚNIOR et al., 2001). As células também produzem ERO por outras fontes: auto-oxidação de pequenas moléculas como catecolaminas, flavinas e hidroquinonas, sistema de carregadores de elétrons microssomais e das membranas nucleares, entre outras (YU, 1994).

Desta maneira, embora a maior parte do O_2 consumido pelos organismos aeróbicos possa sofrer redução completa pela citocromo oxidase, várias reações enzimáticas e não-enzimáticas resultam na redução parcial do O_2 , gerando as ERO. Estas espécies reativas de oxigênio incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas: o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (OH^{\cdot}), o oxigênio “singlet” (1O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroperoxil (HO_2^{\cdot}), entre outros (**Tabela 1**).

O superóxido e o peróxido de hidrogênio são menos reativos, mas a transformação destes radicais (via reações espontâneas ou catalisadas) em radicais hidroxil, os torna altamente danosos para os sistemas biológicos (HALLIWELL, 1996). As ERO podem ser geradas no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas e seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos, DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997).

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio (ERO) e suas respectivas meias-vidas.

Espécie Reativa de Oxigênio (ERO)		Meia-vida (segundos)
$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido ou radical superóxido	variável
HO_2^{\cdot}	Radical hidroperoxil	10^{-8}
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio	variável
OH^{\cdot}	Radical hidroxil	10^{-9}
LO^{\cdot}	Radical alcóxil	10^{-6}
LOO^{\cdot}	Radical peroxil	7
$LOOH$	Hidroperóxido orgânico (ex.: lipoperóxido)	variável
1O_2	Oxigênio “singlet”	10^{-5}

Obs: L é um lipídio, por exemplo, o linoleato (SIES, 1991).

Entre os radicais livres listados na **Tabela 1**, destacam-se:

1.1.1 Radical superóxido (O_2^- ou $O_2^{\cdot-}$ ou O_2^{\cdot})

Este radical é o mais comum e abundante na célula (BOVERIS, 1998) e pode ser gerado em eventos de transporte de elétrons que ocorrem nas mitocôndrias e em microsossomos do retículo endoplasmático ou por reações de auto-oxidação do oxigênio molecular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986). É formado após a primeira redução do O_2 , principalmente através da cadeia de transporte de elétrons ou por ação de células fagocitárias (neutrófilos, monócitos e macrófagos) para defesa bactericida (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1990). Estas células fagocitárias produzem quantidades significativas de radical superóxido durante a fagocitose, devido à ativação da enzima NADPH oxidase que está presente na membrana dessas células (DIAZ et al., 1998).

O radical $O_2^{\cdot-}$, gerado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron, é um radical livre pouco reativo devido à pequena capacidade de atravessar as membranas celulares e, portanto, fica preso no compartimento onde foi produzido. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. É também produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Apesar do radical superóxido possuir baixa capacidade de oxidação sendo pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de $O_2^{\cdot-}$, seja enzimático, fagocítico ou químico (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1990). As reações desencadeadas pelo radical superóxido podem gerar os radicais hidroxil e peroxil (RAMOS et al., 2005). Assim, o radical superóxido é responsável também pela geração de espécies detentoras de maior reatividade química.

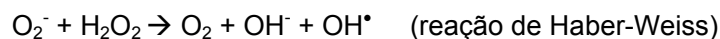
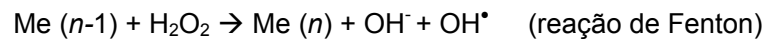
Entre as substâncias de interesse biológico, que se auto-oxidam gerando o radical superóxido incluem-se a hemoglobina, a mioglobina e catecolaminas. Estas auto-oxidações são, geralmente, reações em cadeia nas quais o radical superóxido pode atuar como iniciador e propagador das cadeias radicalares. Apesar do nome sugerir que este radical tenha alto poder oxidante, o superóxido atua na maioria das reações como um agente redutor (OGA, 2003).

1.1.2 Radical hidroxil (OH[•])

É considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, ou seja, uma vez formado, tem uma meia-vida extremamente curta, reagindo rápido e inespecificamente com os alvos celulares mais próximos, podendo lesar DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001). Este radical mostra uma pequena capacidade de difusão e um alto potencial na indução de lesões nas moléculas celulares, sendo capaz de causar mais danos que qualquer outra espécie reativa de oxigênio, já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra o radical hidroxil (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Por isso, a melhor defesa da célula contra este radical é a preventiva, ou seja, evitar que o mesmo seja gerado.

A combinação extremamente rápida do OH[•] com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o hidroxil for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, as radicais hidroxil podem inativar várias proteínas e enzimas ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS), além de reagir amplamente com os fosfolípidios da membrana celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Segundo FRIDOVICH (1998), a via de produção do radical hidroxil é iniciada pela redução do oxigênio em diferentes processos celulares. O superóxido é convertido em H₂O₂, cuja redução por metais de transição como ferro ou cobre gera radicais OH[•] na reação de Fenton. Além disso, a interação do H₂O₂ com o radical superóxido, através da reação de Haber-Weiss, também gera radicais OH[•] (**Quadro 1**).



onde: Me = metal, n = número de valências.

Quadro 1: Produção do radical hidroxil a partir de peróxido de hidrogênio (reação de Fenton) ou do ânion superóxido (reação de Haber-Weiss).

Este radical também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). O OH[•] reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares pela separação de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados presentes na mesma. Este processo

leva à geração de radicais lipídicos (peróxidos de lipídios), que então se combinam com o oxigênio molecular propagando assim, a cadeia de reações da peroxidação dos lipídios.

A maioria dos fosfolipídios componentes da membrana é rico em ácidos graxos poli-insaturados e, por isso, são susceptíveis ao ataque do radical hidroxil (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; NORDBERG & ARNER, 2001).

1.1.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente danoso por participar da reação que produz o radical OH^\bullet .

O H_2O_2 tem meia-vida longa, sendo capaz de atravessar as camadas lipídicas e reagir com as membranas eritrocitárias e com as proteínas ligadas ao Fe^{2+} (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNER, 2001). Assim, é altamente tóxico para as células e esta toxicidade pode ser aumentada de 10 para 1000 vezes na presença de ferro (reação de Fenton gerando OH^\bullet), como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional. Além disso, o H_2O_2 é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

1.1.4 Oxigênio “singlet” (1O_2)

É a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada, não sendo assim um radical livre. Nesta forma, a restrição “spin” do O_2 desaparece, conferindo-lhe um maior poder oxidante (BECKMAN & AMES, 1998), causando danos às proteínas devido à oxidação de grupos essenciais de aminoácidos, principalmente do triptofano, metionina, histidina e resíduos de cisteína (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Sua meia-vida em tecidos é menor que 0,5 μ seg (PATTERSON et al., 1990).

O 1O_2 tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1990; DROGE, 2002). Entretanto, o oxigênio “singlet” é capaz de modificar diretamente o DNA. Além disso, pode ser gerado pelos fagócitos, por indução luminosa, por reações catalisadas por peroxidases, entre outros (CADENAS, 1989; EPE, 1991).

1.2 Estresse Oxidante

Componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA são alvos do dano oxidante mediado pelas ERO (NORDBERG & ARNER, 2001). Diversos efeitos associados às espécies reativas podem ser desencadeados no organismo, como modificação de aminoácidos, alteração de atividades enzimáticas, quebra de ligações peptídicas, modificações em glicoproteínas, perda de metal em metaloproteínas, aumento na suscetibilidade a proteólise, oxidação de grupos tióis para pontes dissulfeto e alterações nos receptores e no material genético, dentre outros (STADTMAN, 1992; SIES, 1993; KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004).

As ERO podem interagir com todas as biomoléculas celulares, a fim de se estabilizar e, conseqüentemente, acabam lesando diferentes estruturas celulares. Ao oxidá-las, podem fazer com que estas biomoléculas percam total ou parcialmente sua função, o que por sua vez, pode afetar o metabolismo celular. A oxidação do DNA pode provocar quebra da dupla fita e modificações de bases nitrogenadas, o que pode acarretar processos mutagênicos e carcinogênicos (SIES, 1986; LIVINGSTONE, 2001). A ação dos radicais livres sobre as membranas biológicas promove alterações em cadeia, gerando radicais lipídicos que podem desestabilizar a membrana (MOSLEN, 1995; STOREY, 1996; LIMA et al., 2002).

Através dos processos descritos acima, as ERO estão implicadas na etiologia de um grande número de doenças, alterações degenerativas, lesões teciduais e toxicidade decorrente da exposição a xenobióticos (POLLACK & LEEUWENBURG, 1999; BRAY, 2000), sendo continuamente produzidas pelos organismos como resultado de um processo metabólico normal, ou como resultado de estímulos ambientais (FEILLET-COUDRAY et al., 1999).

Embora as ERO possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é danosa. A presença dos radicais é fundamental para a manutenção de vários processos fisiológicos normais (POMPELLA, 1997). Na defesa contra a infecção, os neutrófilos são estimulados a produzir espécies reativas com a finalidade de destruir microorganismos (FILHO & NOVELLI, 2005). Os radicais superóxido, o peróxido de hidrogênio e o hidroperóxido de lipídio podem regular a atividade de várias quinases e fatores de transcrição e o mecanismo de morte celular ou apoptose (THANNICKAL & FANBURG, 2000).

Várias citocininas, fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores usam as ERO como segundos mensageiros. Por exemplo, as ERO podem estimular a produção de outros segundos mensageiros como o GMPc e o óxido nítrico (NO), que agem no

relaxamento da musculatura lisa vascular e na inibição da adesão plaquetária (DROGE, 2002).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidantes para limitar os níveis intracelulares destes radicais e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes oxidantes e o sistema de defesa antioxidante. A produção das ERO, em condições fisiológicas normais, está em equilíbrio com a ação destes sistemas de defesas para a manutenção da homeostase redox, o que é essencial para a integridade e a saúde dos organismos (SIES, 1986; CADENAS, 1989; STOREY, 1996; SCANDALIOS, 2005; VALAVANIDIS et al, 2005).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e/ou redução das lesões causadas pelas ERO nas células (CERUTTI, 1991; 1994). Os radicais livres formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos de defesa celulares. O estresse oxidante ocorre quando há uma falha no equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes, levando a danos celulares. Assim, na diminuição desses sistemas antioxidantes, no excesso da produção de ERO ou na conjugação das duas situações, o meio celular fica sujeito ao estresse oxidante que, por sua vez, pode levar à morte celular (BIESALSKI, 2000) (**Figura 2**).

Segundo MARCON (1997), a intensidade dos danos oxidantes depende tanto da natureza como da quantidade das ERO as quais as células estão expostas, bem como das proteções antioxidantes que estas células dispõem. A eficácia do sistema antioxidante depende de qual tipo de molécula é geradora do estresse oxidante e da localização intra ou extracelular dessa molécula (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998). Qualquer distúrbio na relação entre as concentrações basais de ERO e os níveis das proteções antioxidantes pode resultar em estresse oxidante.

Processos endógenos e exógenos são conhecidos como promotores das ERO, sendo potencialmente capazes de levar ao estresse oxidante (**Figura 3**). Conforme já mencionado, diversos componentes celulares contribuem para a geração das ERO, como as mitocôndrias (respiração celular), retículo endoplasmático, hemoproteínas, flavinas, hidroquinonas, catecolaminas, granulócitos polimorfonucleares, e diversas enzimas como a xantina oxidase, NADH oxidases, entre outras.

Além disso, vários agentes externos como poluentes (biotransformação de xenobióticos), drogas terapêuticas, etanol, radiação ionizante e ozônio podem estimular a produção das ERO através de reações de oxi-redução (CADENAS, 1989). As ERO podem

causar danos a todos os tipos de biomoléculas, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual (**Figura 3**).

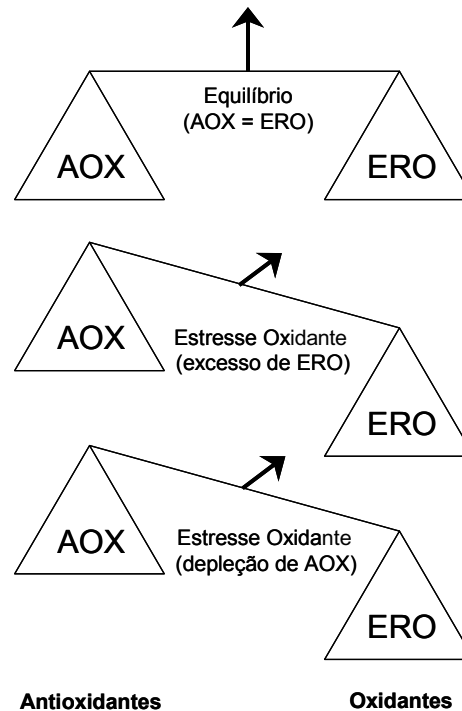


Figura 2: Representação esquemática do estresse oxidante como resultado do desbalanço entre os níveis de antioxidantes (AOX) e das espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidante ocorre quando o equilíbrio é perturbado pelo excesso das espécies reativas ou pela redução das defesas antioxidantes. Adaptado de SCANDALIOS (2005).

O alvo celular primário das ERO pode variar, dependendo do tipo de estresse imposto e de quão severo é este estresse na célula (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; NORDBERG & ARNÉR, 2001). Distúrbios no equilíbrio entre a formação e a remoção das ERO são associados a uma série de processos patológicos como, por exemplo, câncer, isquemia, arteriosclerose, diabetes, mal de Alzheimer entre outras desordens neurológicas e não-patológicas, incluindo o envelhecimento (HERMES-LIMA & STOREY, 1998; PAWLAK et al., 1998; BECKMAN & AMES, 1998 revisado por SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

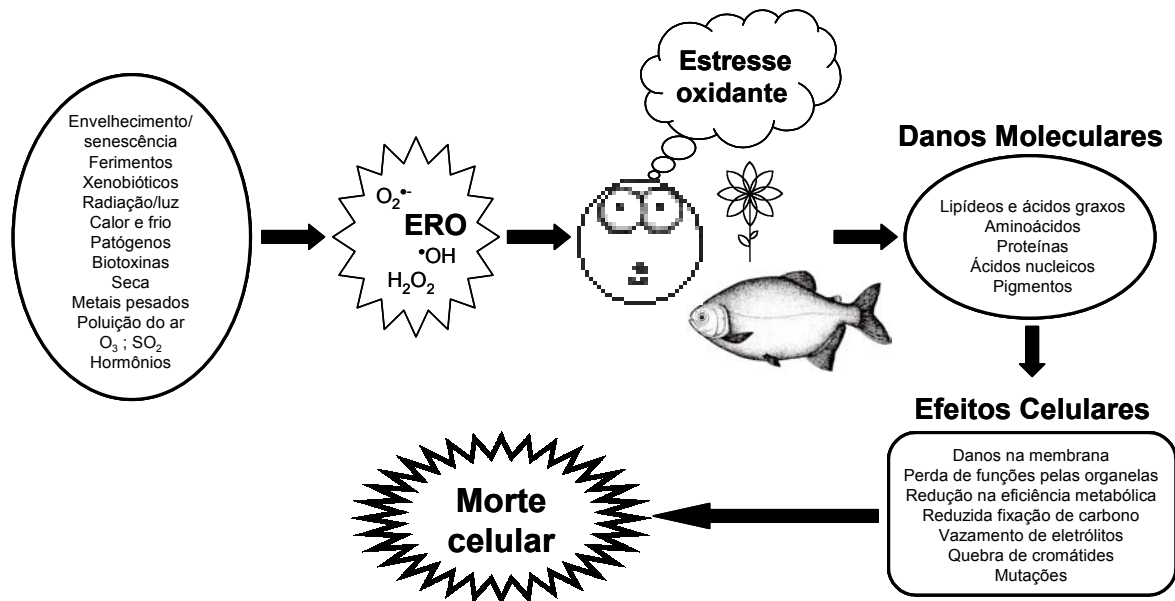


Figura 3: Esquema mostrando alguns iniciadores de geração das ERO e as conseqüências biológicas do estresse oxidante que originam uma variedade de disfunções que podem resultar em morte celular. Adaptado de SCANDALIOS (2005).

1.3 Peroxidação de Lipídios ou Lipoperoxidação (LPO)

Um dos principais mecanismos de lesão é a peroxidação de lipídios ou lipoperoxidação, ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular. A LPO é uma reação em cadeia, pois se propaga continuamente, levando a formação de lipoperóxidos e à destruição e morte celular (HOGG & KALYANARAMAN, 1998).

A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação das ERO sobre os lipídios das membranas celulares, gerando principalmente radicais alcoxil e peroxil, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca metabólica e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). A LPO constitui o evento citotóxico primário que desencadeia as injúrias mediadas por diferentes agentes (LIMA et al., 2002).

A LPO pode ser resumidamente definida como a “deteriorização oxidativa de lipídios poli-insaturados”. Os lipídios poli-insaturados são aqueles constituídos de ácidos graxos que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono (H₂C = CH₂). Os ácidos graxos poli-insaturados são, devido a suas múltiplas duplas ligações, excelentes alvos para

o ataque dos radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; NORDBERG & ARNÉR, 2001). As membranas que rodeiam as células e as organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados. Por isso, tais membranas constituem um dos componentes celulares mais atingidos pelas ERO. Ácidos graxos com uma ou nenhuma dupla ligação são mais resistentes ao ataque das ERO que os ácidos graxos poli-insaturados. Os principais ácidos graxos que sofrem peroxidação lipídica na célula são o linoléico e o araquidônico, entre outros (YU, 1994).

A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol e, conseqüentemente, danos nesta camada lipídica tendem a diminuir esta fluidez. O ataque das ERO, que seqüestram um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, inicia o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Os radicais de carbono formados desta maneira podem reagir espontaneamente com o oxigênio formando radicais peroxil, que propagam a cadeia de peroxidação lipídica seqüestrando átomos de hidrogênio de outros lipídios para formar hidroperóxidos e novos radicais de carbono, levando à oxidação de muitas moléculas de ácidos graxos (JIALAL & GRUNDY, 1992) (**Figura 4**).

A LPO implica em alterações na estrutura das membranas celulares resultando em transtornos de permeabilidade, alteração do fluxo iônico e de outras substâncias, perda de seletividade para a entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alteração do DNA e oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além do comprometimento dos componentes da matriz extracelular como proteoglicanos, colágeno e elastina (BABER & HARRIS, 1994). A perda da seletividade iônica, a liberação do conteúdo de organelas e a formação de produtos citotóxicos podem culminar em morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

A oxidação de lipídios de membranas por radicais de O_2 altera a fluidez da membrana e pode levar ao seu rompimento (HALLIWELL, 1992). O rompimento de membranas de determinadas organelas pode provocar a liberação de proteases e íons Ca^{2+} , podendo induzir mutações no DNA e a degradação celular. Além disso, os lipídios oxidados podem ser quebrados em moléculas menores, como determinados aldeídos, que por si só são tóxicas às células (FULLER, 1988; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989) (**Figura 5**).

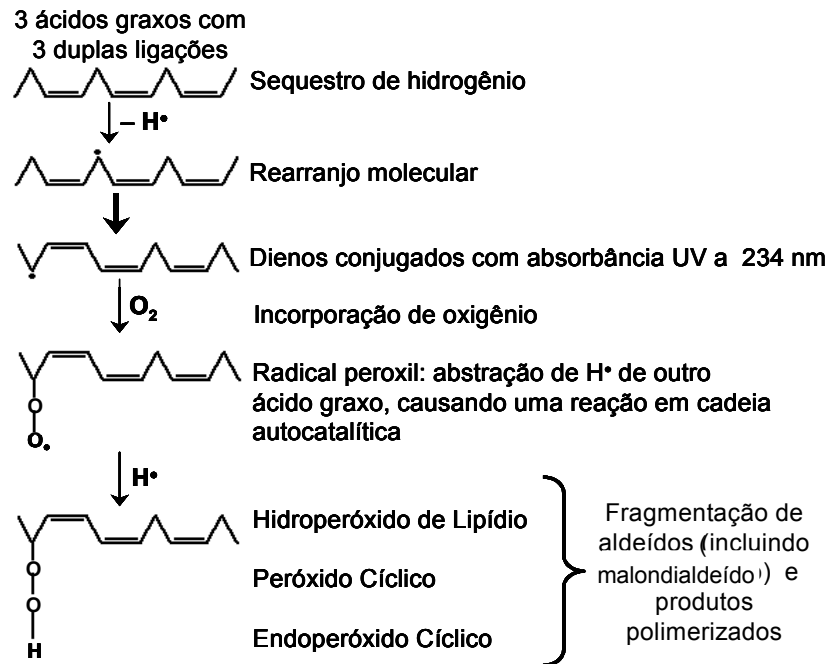


Figura 4: Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia (HALLIWELL & GUTTRIDGE, 1989).

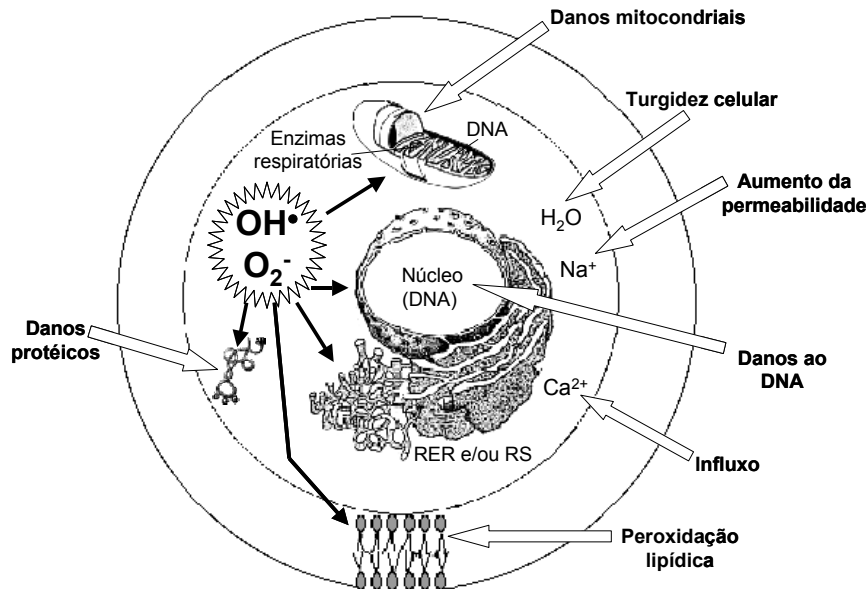
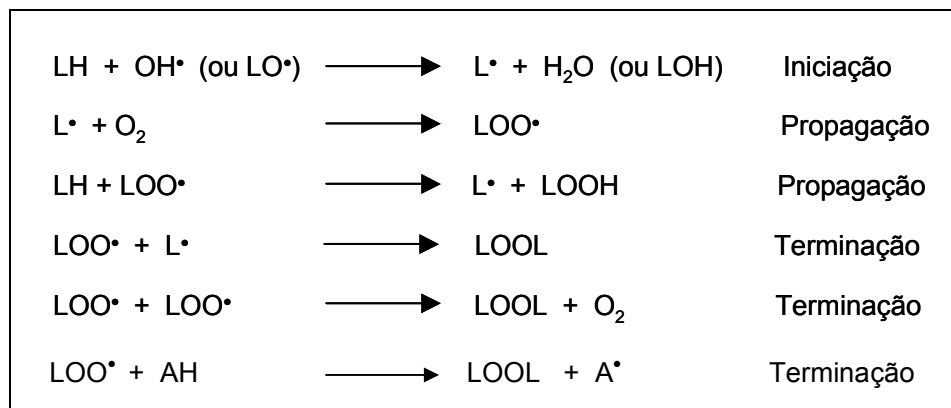


Figura 5: Danos celulares causados pelas ERO. As ERO iniciam a peroxidação lipídica nas membranas celular, mitocondrial, nuclear e do retículo endoplasmático. Adaptado de MARKS et al. (1996).

A peroxidação dos lipídios é uma reação em cadeia que passa pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão representadas no **Quadro 2**.



Quadro 2: Reações da cadeia de propagação da peroxidação lipídica. L representa um lipídio. Fonte: FERREIRA & MATSUBARA (1997).

A reação acima se inicia com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH^\bullet (radical hidroxil) ou pelo LO^\bullet (radical alcóxil), com conseqüente formação do L^\bullet (radical lipídico).

Na primeira equação de propagação, o L^\bullet reage rapidamente com o O_2 , resultando na formação do LOO^\bullet (radical peróxil), que, por sua vez, seqüestra um novo hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, formando novamente o radical L^\bullet na segunda equação de propagação. Este pode, posteriormente, reagir com um átomo de hidrogênio de uma cadeia lateral de um ácido graxo e desencadear uma reação auto-catalítica que converte muitos lipídios das membranas em hidroperóxidos de lipídio (LOOH). A decomposição dos LOOH é o principal passo metabólico da LPO, gerando radicais que propagam a peroxidação lipídica e produtos não-radicalares. Estes produtos secundários como aldeídos, cetonas e epóxidos, entre outros, são mais estáveis do que os radicais livres que iniciam a LPO ou que os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação. Conseqüentemente, eles podem atingir pontos distantes do local em que se formam (LIMA et al., 2002).

O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais alcóxil e peróxil (L^\bullet e LOO^\bullet), produzidos nas etapas anteriores propagam-se, até destruírem a si próprios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). A seqüência é interrompida quando um radical livre formado se encontra com outro, levando à estabilização dos dois radicais, pois os elétrons isolados pareiam-se na última camada. Outro mecanismo de finalização ocorre na presença de antioxidantes, que neutralizam a ação do radical livre (**Figura 6**).

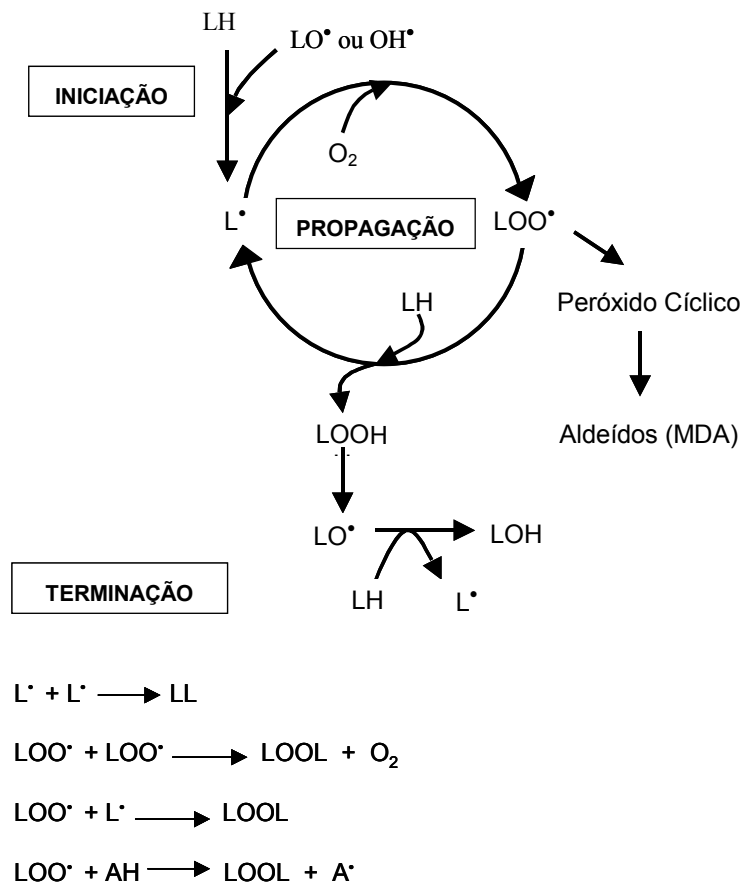


Figura 6: Representação das fases do processo de peroxidação lipídica. LH – ácido graxo insaturado; LOOH - hidroperóxido de lipídio; LOO• - radical peróxido; AH - antioxidante; LO• - radical alcoxil; OH• - radical hidroxil; MDA – malondialdeído; LOH – álcool não-tóxico derivado do ácido graxo; L• - radical lipídico; LOOL – peróxido lipídico. Adaptado de SERGENT et al. (1999).

A iniciação da peroxidação é causada pelo ataque a um lipídio de qualquer espécie de ERO que tenha reatividade suficiente para seqüestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂). O radical hidroxil é reconhecido como a espécie iniciadora da peroxidação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Os peróxidos lipídicos possuem poder de ação maior do que as outras espécies tóxicas primárias de O₂ (O₂^{•-}, H₂O₂, OH•, O₂), atingindo facilmente alvos mais distantes. A LPO deve ter, também, um papel muito importante na proliferação celular, especialmente em células tumorais. GONZALEZ (1992) sugere que os produtos da lipoperoxidação estão envolvidos no controle da divisão celular, sendo que este processo está inversamente relacionado com o crescimento tumoral.

O aumento da LPO, como uma consequência da deterioração oxidativa dos lipídios das membranas pelas ERO, é geralmente utilizado como referência de índice de estresse oxidante no organismo (KAPPUS & SIES, 1981). Entretanto, a peroxidação de lipídios é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelas ERO, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são susceptíveis à oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

1.4 Defesas Antioxidantes

As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos para proteger seus constituintes e manter seu estado redox. Sob condições fisiológicas normais, os efeitos nocivos das ERO são efetivamente neutralizados pelo sistema celular de defesa antioxidante, que geralmente consiste de enzimas e de pequenas moléculas antioxidantes (DANDAPAT, 2000). Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Conforme mencionado anteriormente estes agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O₂ e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O₂.

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir os processos de oxidação, mesmo quando presente em baixas concentrações (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Isto implica que os diferentes antioxidantes podem atuar em diferentes níveis e com modos de ação distintos. Os antioxidantes podem, teoricamente, prolongar a fase de iniciação ou então inibir a fase de propagação, mas não podem prevenir completamente a oxidação (ANDRADE JUNIOR et al., 2005).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com sua função biológica em duas categorias: a) sistema primário - inibidores preventivos que retardam a fase de iniciação, impedindo a geração de espécies reativas ou que seqüestram estas espécies, impedindo sua interação com os alvos celulares; b) sistema secundário - bloqueadores da etapa de propagação da cadeia radicalar ("*chain breaking*") que efetivamente removem os radicais intermediários, como o radical peróxil ou alcóxil (ABDALLA, 1993).

Os inibidores do sistema primário (inibidores preventivos) podem induzir a decomposição de hidroperóxidos para produtos inativos. São exemplos de inibidores

preventivos os tióis, a catalase, a superóxido dismutase e as glutathionas peroxidase e transferase. A superóxido dismutase, os supressores do oxigênio “singlet” como o β -caroteno e a vitamina E e os agentes quelantes, como peptídeos, ácidos orgânicos e certos fosfatos orgânicos ou inorgânicos, são considerados antioxidantes preventivos (BONORDEN & PARIZA, 1994).

Os antioxidantes do sistema secundário, aqueles que bloqueiam a propagação da cadeia radicalar, interrompem a seqüência de auto-oxidação em cadeia, reagindo com os radicais livres para produzir produtos estáveis. Um inibidor da propagação em cadeia é rapidamente modificado a um produto inativo ou a um produto primário com uma atividade antioxidante residual (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998). Destacam-se como bloqueadores do sistema secundário as vitaminas E e A e a glutathiona reduzida.

Podemos ainda considerar um sistema terciário de defesa antioxidante, que seria constituído pelos sistemas de reparo do DNA, pelas proteases e fosfolipases, que removem as lesões oxidativas do DNA, das proteínas e dos lipídios, respectivamente (HALLIWELL, 1987).

Os sistemas de defesa antioxidante podem também ser classificados, de acordo com sua estrutura biológica, em: a) sistema enzimático, onde se destacam as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST) e b) sistema não-enzimático, exemplificado pela ação da GSH, do selênio (Se), das vitaminas A, C e E, a metalotioneína, entre outros (HALLIWELL, 1996; SCHLENK et al., 1999).

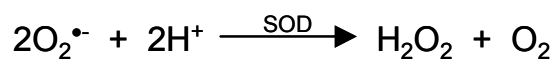
O sistema de defesa enzimático consiste tipicamente de pequenas moléculas que são solúveis em qualquer meio aquoso ou como em alguns exemplos, em meios lipídicos. De maneira geral, elas agem neutralizando os radicais e as substâncias oxidadas pelas ERO e, assim, removem os oxidantes da solução (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Já o sistema não-enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo como glutathiona reduzida, bilirrubina, ceruloplasmina, melatonina, ubiquinona (coenzima Q), metalotioneína, ácido úrico, e outros ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), selênio, cobre e zinco (microminerais), β -caroteno (precursor da vitamina A), cisteína e flavonóides (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

A importância dos processos oxidantes, causados pelos radicais livres, pode ser mensurada pela quantidade e diversidade de antioxidantes biológicos presentes nas células. Isto comprova a produção contínua de radicais livres em condições normais e a necessidade de controlar seus níveis adequadamente para garantir a sobrevivência celular.

1.4.1 Antioxidantes enzimáticos

1.4.1.1 Superóxido dismutase (SOD – E.C. 1.15.1.1)

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes, existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco (Cu-Zn SOD) está presente principalmente no citosol e nos fluidos extracelulares, enquanto que a SOD-manganês (Mn SOD) está localizada primariamente nas mitocôndrias (TARHAN & TUZMEN, 2000; SCANDALIOS, 2005). Esta enzima tem papel antioxidante importante, já que catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (**Quadro 3**). A taxa de dismutação da SOD é aproximadamente 10^4 vezes maior do que a dismutação química (FRIDOVICH, 1975). A sua atividade é limitada pelo H_2O_2 , produto de sua ação, uma vez que longos períodos de exposição ou altas concentrações de peróxido de hidrogênio podem ocasionar alterações cúpricas (Cu^{2+}) e cuprosas (Cu^{1+}) em sua estrutura, levando a uma inativação irreversível (TARHAN & TÜZMEN, 2000).



Quadro 3: Desintoxicação do ânion superóxido ($O^{\bullet-}$), produzido durante o metabolismo celular, pela enzima superóxido dismutase (SOD).

A SOD, juntamente com a catalase e a glutathione peroxidase, constituem uma das principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). É possível, ainda, que a SOD contribua com efeitos de anti-envelhecimento reais, podendo atuar positivamente sobre todos os processos degenerativos (BECKMAN & AMES, 1998).

A SOD desempenha papel fundamental na defesa do organismo contra as ERO por atuar na remoção do radical superóxido (McCORD & FRIDOVICH, 1969). Antes da sua descoberta, a SOD já havia sido descrita como uma proteína que contém cobre, mas nenhuma atividade catalítica lhe havia sido atribuída. Após o trabalho de McCORD & FRIDOVICH (1969), com a determinação de sua função na dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), seu papel foi estabelecido e, até hoje, apesar de inúmeras pesquisas realizadas com esta enzima, nenhum outro substrato foi descrito, mostrando a sua especificidade para o ânion superóxido (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A forma Cu-Zn SOD (PM = 32-kDa) é muito estável e parece estar presente em praticamente todas as células eucarióticas (plantas ou animais), sendo constituída de duas subunidades protéicas idênticas, com um átomo de cobre e um de zinco em cada uma delas. O Zn, ao contrário do Cu, não funciona como sítio catalítico, mas aparece para estabilizar a enzima. Esta conclusão foi extraída de experiências nas quais os metais foram removidos dos sítios ativos e recolocados em outros, sozinhos ou em conjunto (McCORD & FRIDOVICH, 1969; FRIDOVICH, 1974, 1975, 1995; BABIOR, 1997).

A Mn SOD (PM = 40-kDa), uma proteína que contém manganês nos sítios ativos, tem sua atividade diminuída em pH alcalino mas não é inibida pelo cianeto nem pelo di-etil-di-hidrocarbonato. Porém, é destruída em presença de clorofórmio + etanol, o que implica que os métodos típicos de purificação para a Cu-Zn SOD não podem ser empregados. A atividade da Mn SOD em relação a Cu-Zn SOD depende do tecido e das espécies onde atuam. A remoção do Mn dos sítios ativos causa perda da atividade catalítica, não podendo ser repostos por nenhum íon de transição perdendo, assim, a sua atividade funcional (FRIDOVICH, 1974, 1975, 1995; BABIOR, 1997).

A Cu-Zn SOD é a principal enzima envolvida na remoção dos ânions superóxido do citoplasma e do peroxissoma (GRALLA & KOSMAN, 1992; JAMIESON et al., 1994), enquanto que a função fisiológica da Mn SOD parece ser responsável em proteger a mitocôndria dos superóxidos gerados durante a respiração celular (COSTA et al., 1997; GUIDOT et al., 1993; JAMIESON et al., 1994). Porém, também existem evidências funcionais de que a Cu-Zn SOD desempenhe importante função protetora contra ânions superóxidos derivados da respiração celular (AYUB et al., 1992). Por exemplo, as células mutantes, nulas de SOD1 (Cu-Zn SOD), deixam de crescer em meios contendo lactato como única fonte de carbono, um fenótipo típico de células respiratórias deficientes (GRALLA & KOSMAN, 1992). Atualmente, é evidente que a Cu-Zn SOD pode ter função no tamponamento da concentração de cobre intracelular. Entretanto, esta função não aparece relatada como um mecanismo de proteção contra o estresse oxidante (CULOTTA et al., 1995).

As seqüências de aminoácidos da Mn SOD são parecidas em todas as espécies e não estão relacionadas com aquelas da Cu-Zn SOD. A forma Cu-Zn SOD apresenta-se mais resistente às variações de temperatura e à desnaturação por substâncias como cloreto de guanidina, duodecil sulfato de sódio ou uréia e, em organismos superiores, é responsável por cerca de 90% da atividade total da SOD presente nas células (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Finalmente, há mais uma forma de SOD distinta das outras já descritas. Esta enzima possui peso molecular de 135-kDa, é um tetrâmero que contém Cu e Zn e possui um peptídeo sinalizador que direciona esta enzima exclusivamente para o espaço extracelular. Por estar presente principalmente em fluidos extracelulares como o plasma, foi denominada SOD extracelular. Sua atividade é pouco expressiva em comparação com as outras formas de superóxido dismutase (MARKLUND, 1982). O papel que a SOD extracelular desempenha, nos diferentes estados fisiológicos, está apenas começando a ser esclarecido (ZELKO et al., 2002).

Existem diferentes tipos de SOD, dependendo do metal que atua como co-fator em seu sítio catalítico, mas todas elas agem basicamente de acordo com a mesma reação descrita anteriormente (**Quadro 3**).

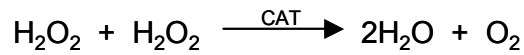
Entre as diversas espécies de peixes já estudadas, esta enzima demonstrou uma alta similaridade em suas propriedades funcionais e estruturais, inclusive em peixes antárticos com sangue destituído de hemoglobinas (BANNISTER et al., 1977; VIG et al., 1989; NATOLI et al., 1990).

1.4.1.2 Catalase (CAT – E.C. 1.11.1.16)

A catalase (PM = 240-kDa) é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 (**Quadro 4**) e, por isso, é considerada um dos maiores componentes da defesa antioxidante primária (GAETANI et al., 1989). A catalase possui um alto K_m para o H_2O_2 , decompondo-o a uma taxa extremamente rápida de cerca de $10^7 \text{ mol.L}^{-1}.\text{seg}^{-1}$ (SCANDALIOS, 2005).

Por apresentar um elevado K_m , a CAT dificilmente é saturada pelo H_2O_2 e a saturação pelo substrato ocorre na faixa de 5 mol.L^{-1} de H_2O_2 . Por outro lado, há uma rápida inativação da CAT em concentrações de aproximadamente de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, quando o complexo ativo enzima- H_2O_2 (complexo I) é convertido a complexos inativos (complexos II e III) (AEBI, 1984). Portanto, medidas da atividade enzimática por saturação de substrato são impossíveis.

A atividade catalítica desta enzima pode ser inibida por ânion superóxido, azida sódica, cianeto de hidrogênio (HCN), não sendo, entretanto, inibida por outros íons cianetos (CN^-) (CHANCE, 1952b; KONO & FRIDOVICH, 1982).



Quadro 4: Desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido durante o metabolismo celular, pela enzima catalase (CAT).

A CAT está localizada principalmente nos peroxissomos da maioria das células aeróbicas e, em animais, se encontra principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético contêm pequenas quantidades da enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Entretanto, a atividade desta enzima não tem sido constatada nos eritrócitos de diversas espécies de peixes (RABIE et al., 1972; SMITH, 1976; WILHELM-FILHO et al., 1993; WILHELM-FILHO & MARCON, 1996).

A catalase apresenta quatro subunidades, cadauma contendo um grupamento Fe^{3+} -protoporfirina ligado ao seu sítio ativo (WIEACKER et al., 1980). Com relação ao pH, pode-se observar uma diminuição da atividade da enzima em valores abaixo de 4,0 e acima de 8,5, sendo que na faixa de pH de 4,0 a 8,5, a atividade da catalase permanece constante e ideal (CHANCE et al., 1952a).

Além de seu papel como espécie reativa de oxigênio e, portanto, causador de estresse oxidante, o H_2O_2 em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio, o que pode acarretar infecções, formação de úlceras e até necrose (WIEACKER et al., 1980). Desta forma, é imprescindível o trabalho da CAT.

A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da glutatona reduzida mediada pelo H_2O_2 em eritrócitos humanos normais (SCOTT et al., 1991) e inibe as lesões oxidativas do DNA de timo de carneiros submetidos à sobrecarga de Fe^{3+} (ARUOMA et al., 1989). Em modelo de estresse oxidante decorrente de agressão térmica, os eritrócitos exibem diminuição da atividade da CAT durante o processo hemolítico termodependente (HATHERILL et al., 1991).

Segundo SCANDALIOS (2005), a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 pela CAT requer a presença de altas concentrações de H_2O_2 (**Quadro 4**). Desta forma, a CAT atuaria como um suporte para o sistema glutatona dependente (discutido em 1.4.1.3), o qual também apresenta como uma de suas funções a desintoxicação do H_2O_2 quando este se encontra em baixas concentrações. Assim, na presença de baixos níveis de H_2O_2 , os peróxidos seriam eliminados preferencialmente pela glutatona peroxidase (GPx) enquanto que, em altas concentrações de H_2O_2 , predominaria a ação da CAT.

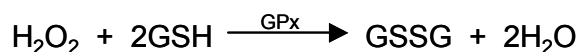
Em baixas concentrações de H_2O_2 , a CAT atua oxidando uma variedade de doadores de hidrogênio como etanol, metanol, ácido ascórbico, fenóis, ácidos fórmicos, com o consumo de 1 mol de peróxido e a uma velocidade muito menor de cerca de 10^2 a 10^3 $\text{mol.L}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$ (AEBI, 1984).

Ambos os sistemas parecem ter vantagens e desvantagens para o organismo. A GPx é mais eficiente (tem maior afinidade pelo substrato), é multifuncional (reduz H_2O_2 livre e também outros peróxidos), é lenta (limitada pela reciclagem do GSH) e metabolicamente dispendiosa, enquanto que a CAT possui baixa afinidade pelo substrato, mas é extremamente rápida (EATON, 1991). Assim, a CAT deve proteger as células de grandes quantidades de H_2O_2 enquanto que os baixos níveis endógenos devem ficar por conta da GPx, juntamente com o sistema enzimático dependente de GSH (EATON, 1991).

Entretanto, a CAT apresenta sítios de ligação ao NADPH e, quando estes sítios estão ocupados, a CAT opera catalisando a degradação do H_2O_2 a concentrações semelhantes àquelas em que o sistema glutatona dependente opera (GAETANI et al., 1996). É, portanto, provável que metade do H_2O_2 produzido na célula é destruído pela CAT (BABIOR, 1997). A ligação do NADPH à enzima poderia ser um mecanismo para proteger a CAT contra a inativação pelo H_2O_2 ou como fonte de NADPH para a GPx durante o estresse oxidante (KIRKMAN & GAETANI, 1984; KIRKMAN et al., 1999).

1.4.1.3 Glutationa peroxidase (GPx – E.C. 1.11.1.9)

A GPx é uma enzima antioxidante endógena que catalisa a redução do H_2O_2 e de hidroperóxidos de ácidos graxos (LOOH, onde L é um lipídio), convertendo-os em água e seus correspondentes alcoóis não-tóxicos, respectivamente (**Quadros 5 e 6**) (NORDBERG & ARNER, 2001), por oxidação da glutatona reduzida (GSH) à glutatona oxidada (GSSG) (SHAN et al., 1990). A GPx é extremamente específica para a GSH e é capaz de desintoxicar rapidamente o H_2O_2 e certos hidroperóxidos (LIEBLER & REED, 1997).

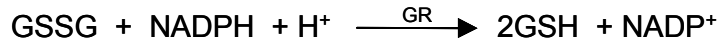


Quadro 5: Oxidação da GSH a GSSH, pela ação da GPx, utilizando H_2O_2 como substrato.



Quadro 6: Oxidação da GSH a GSSH, pela ação da GPx, utilizando hidroperóxido de lipídio (LOOH) como substrato. Onde: LOOH - hidroperóxido lipídico; LOH - álcool não-tóxico derivado do respectivo LOOH

A GPx, essencial à prevenção da acumulação de peróxidos de lipídios (LIEBLER & REED, 1997), é uma enzima constituída de quatro subunidades idênticas, cada qual com um átomo de selênio (Se), elemento relativamente raro da família do oxigênio e do enxofre. A GPx emprega a GSH para desintoxicar os peróxidos, liberando GSSG durante esse processo. A GSSG é reciclada pela glutathiona redutase (GR), voltando à forma GSH (**Quadro 7**). Para tanto, a GR emprega a riboflavina (vitamina B₂) como co-fator e NADPH como agente redutor (MEISTER & ANDERSON, 1983) estando, dessa forma, relacionada com a integridade da via das pentoses fosfato.



Quadro 7: Redução da glutathiona oxidada (GSSG) a glutathiona reduzida (GSH) pela ação da glutathiona redutase (GR), uma flavoenzima NADPH-dependente.

A ação enzimática da GPx é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos lipídicos oriundos do ataque de espécies radicalares (COHEN & HOCHSTEIN, 1963; MEISTER & ANDERSON, 1983). A GPx, descoberta por MILLS em 1959 em tecidos de mamíferos, possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima. O selênio foi caracterizado como um componente essencial da enzima (ROTRUCK et al., 1973) e a forma do selênio na enzima, em fígado de rato, foi identificada como uma selenocisteína (FORSTROM et al., 1978). PLECKO et al. (1999) determinaram por cromatografia líquida que as maiores frações de Se, em plasma humano, estavam associadas à enzima GPx e à albumina.

A selenocisteína é adicionada à proteína por um t-RNA especial que inicialmente carrega uma serina, mas que, após sofrer uma série de reações, é convertido em t-RNA^{selenoCys}. Este t-RNA, por sua vez, se liga ao “triplet” UGA do mRNA da GPx, que é

normalmente um “stop” códon mas, neste contexto, é o sítio de reconhecimento do t-RNA^{selenoCys} (CHAMBERS & HARRISON, 1987).

Embora possa ser encontrada em algumas algas e fungos, não foi observada a presença da GPx em plantas ou bactérias (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). As células animais contêm dois tipos de GPx, uma é Se-dependente enquanto a outro não. O primeiro tipo é capaz de reduzir H₂O₂ e qualquer hidroperóxido orgânico, possui peso molecular de 88-kDa, é uma proteína tetramérica e possui um átomo de selênio em cada subunidade em forma de selenocisteína (LIEBLER & REED, 1997). O segundo tipo, que não depende de selênio, chamado GPx5, tem peso molecular de 35-kDa, é uma proteína dimérica e é capaz de reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, menos o H₂O₂ (CIRIOLO et al., 1991; WILLIAMS et al., 1998).

A GPx apresenta alta atividade no fígado, moderada atividade no coração, pulmão e cérebro, e baixa atividade nos músculos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Na maioria dos animais, a enzima dependente de selênio é responsável pela maior parte da atividade da GPx, mas a proporção entre as duas formas varia muito entre as diferentes espécies, bem como entre os tecidos de uma mesma espécie.

Em relação ao tipo glutathiona peroxidase Se-dependente, são conhecidas quatro isoformas em mamíferos (GPx1 a GPx4), todas podendo catalisar a redução do H₂O₂ usando a GSH como substrato e também podendo reduzir peróxidos de lipídio a álcoois. A GPx1 e a GPx4, ambas citosólicas, são as formas mais abundantes na maioria dos tecidos (NORDBERG & ARNER, 2001).

A GPx4, também chamada de fosfolipídio hidroperóxido glutathiona peroxidase, promove a redução de hidroperóxidos a partir de complexos lipídicos como colesterol, mesmo quando estes peróxidos estão presos na membrana celular (MAIORINO et al., 1991; LEHMANN et al., 1998). O peróxido de ácido graxo de fosfolipídio deve ser liberado por uma fosfolipase como um ácido graxo livre antes de sua posterior desintoxicação para um álcool de ácido graxo pela GPx clássica (GPx1) ou por uma GST com atividade de peroxidase, como será visto a seguir (item 1.4.1.4). A GPx4 difere da GPx1 pela sua maior lipossolubilidade e capacidade de reagir diretamente com os peróxidos lipídicos ligados à membrana. É interessante notar que a fosfolipídio hidroperóxido glutathiona peroxidase pode reduzir peróxidos de colesterol (ChOOH), que é um importante lipídio das LDL, e, portanto, pode reduzir os principais lipídios oxidados das LDL, incluindo o fosfolipídio (PLOOH), o éster de colesterol (CEOOH), além do ChOOH (THOMAS et al., 1990).

O mecanismo catalítico da GPx envolve oxidação do sítio ativo selenolato (Ez-Se⁻) a um álcool selênico (Ez-SeOH) por meio da reação da GPx com o hidroperóxido, que

funciona como agente oxidante. O hidroperóxido é reduzido, dessa maneira, ao seu álcool correspondente. Com a adição de uma molécula de GSH, o álcool selênico é transformado no aduto selenossulfeto (Ez-SeSG), que pode ser regenerado ao selenolato ativo e à GSSG pela adição de uma segunda molécula de GSH (Figura 7).

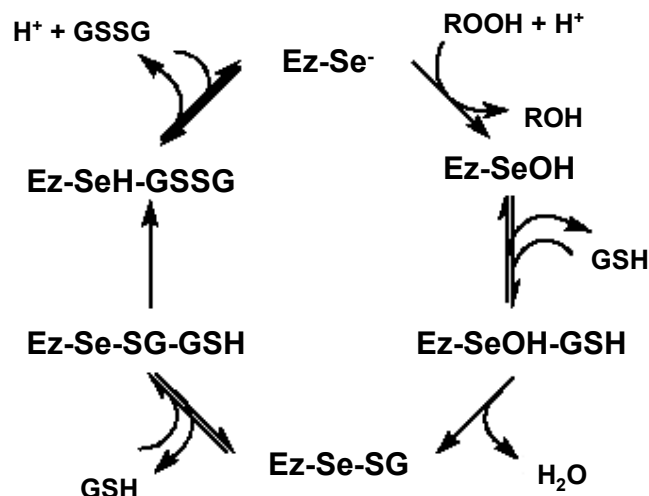


Figura 7: Mecanismo catalítico da enzima GPx selênio-dependente sobre a GSH (ROVER-JÚNIOR et al., 2001).

Em ratos, a distribuição da GPx tem sido extensamente estudada e, em hepatócitos, a GPx selênio-dependente está localizada principalmente no citosol e na matriz mitocondrial (MANNERVIK, 1985).

O pH ótimo para a GPx é próximo de 8,0, mas a enzima continua ativa em valores elevados. Sua atividade é mínima em pH abaixo de 6,0 (MILLS, 1959). A atividade da GPx é dependente da concentração de GSH (NAKAMURA et al., 1974). Neste sentido, um controle dos níveis de GSH torna-se importante, já que níveis normais de GSH em células de mamíferos estão na faixa de 0,5 a 10 mmol.L⁻¹ (MEISTER & ANDERSON, 1983). A atividade da GPx pode ser inibida pelo ânion $\text{O}_2^{\cdot-}$ (BLUM & FRIDOVICH, 1985).

Conforme citado anteriormente, a GPx atua em baixas concentrações de H_2O_2 , apresentando um K_m bem menor que o da CAT (PUCHEU et al., 1995).

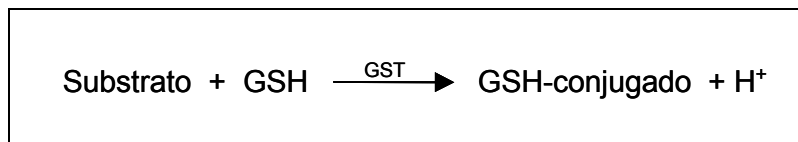
O papel central do Se na atividade da GPx oferece um foco para intervenção sendo que a suplementação de selênio pode aumentar a sua atividade. Em algumas regiões onde a deficiência de Se é grave, como na Nova Zelândia, China e Finlândia, a suplementação alimentar com selênio reverte prontamente doenças causadas pela sua deficiência em

animais (por exemplo, a doença dos músculos brancos nos carneiros) e no homem (doença de Keshan) (COMBS & COMBS, 1986). A deficiência de selênio no organismo acarreta uma diminuição na atividade desta enzima e tem sido associada a alterações no metabolismo celular (IP et al., 1991; FOSTER & SUMAR, 1997).

1.4.1.4 Glutathione S-transferase (GST – E.C. 2.5.1.18)

A GST faz parte de uma família de isoenzimas que desempenha um papel importante na resposta ao estresse oxidante. É considerada uma enzima de desintoxicação por metabolizar uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, como os xenobióticos, por meio da conjugação destes com a glutathione reduzida (GSH), formando conjugados solúveis em água, reduzindo sua toxicidade e facilitando sua excreção (WILCE & PARKER, 1994; VAN der OOST et al., 2003) (**Quadro 8**).

Assim, a GST é importante na defesa celular mesmo não atuando diretamente contra os radicais livres, pois está associada a biotransformação de xenobióticos como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos.



Quadro 8: Conjugação da glutathione reduzida (GSH) com substrato eletrofílico tóxico (xenobiótico) pela ação glutathione S-transferase (GST).

A GST também promove a conjugação da GSH a produtos endógenos causadores de danos oxidantes como radicais hidroxil citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação (DUDLER et al., 1991; BARLING et al., 1993). A suscetibilidade de diferentes espécies de peixes a químicos carcinogênicos pode ser modulada pela atividade da GST (VARANASI et al., 1987).

Com base na especificidade do substrato e na seqüência de aminoácidos da proteína, as GSTs solúveis são agrupadas em cinco classes: alfa (α), mi (μ), pi (π), teta (θ) e sigma (σ) (GEORGE, 1994). Estas isoenzimas, localizadas principalmente na fração citosólica do fígado (SIJM & OPPERHUIZEN, 1989), são proteínas diméricas com peso molecular variando em torno de 50-kDa de acordo com a combinação das quatro possíveis subunidades que podem compô-las (MEDH et al., 1991). Algumas GSTs também

apresentam atividade de GPx selênio-independente, por atuarem diretamente na desintoxicação de hidroperóxidos de lipídio (BARLING et al., 1993).

O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST) é importante para a manutenção da integridade celular (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). A ação integrada destas enzimas está ilustrada na **Figura 8**.

Além das enzimas descritas anteriormente, outros sistemas enzimáticos participam direta ou indiretamente do metabolismo oxidante, produzindo ou neutralizando as ERO ou desintoxicando xenobióticos. São exemplos: a glutatona redutase (GR), γ -glutamyl sintetase, glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), citocromo P-450 oxidase, xantina oxidase (XOD), entre outras.

1.4.2 Antioxidantes não-enzimáticos

1.4.2.1 Glutationa (GSH)

A glutatona, um elemento fundamental no sistema de defesa antioxidante, é um tripeptídeo (γ -glutamyl-cisteinil-glicina) que contém um grupo sulfidril (-SH) presente na cisteína (**Figura 9**), que confere a esta molécula grande capacidade redutora (MEISTER & ANDERSON, 1983). A GSH atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER & ANDERSON, 1983).

Sua forma varia entre o tiol reduzido (GSH) e oxidado (GSSG), na qual dois tripeptídeos de glutatona estão unidos por uma ligação dissulfeto. O grupo sulfidril interage com um radical livre para formar um radical glutatona, que dimeriza (se emparelha com outro radical glutatona) para formar a glutatona oxidada (GSSG). A glutatona oxidada é então reciclada (reduzida) outra vez em glutatona reduzida (GSH) para reutilização por meio da enzima glutatona redutase (GR). A GR (E.C. 1.6.4.2) depende de NADPH como fonte de elétrons, estando, dessa forma, relacionada com a integridade da via das pentoses (ou ciclo das pentoses – PC) (KRETZSCHMAR, 1996).

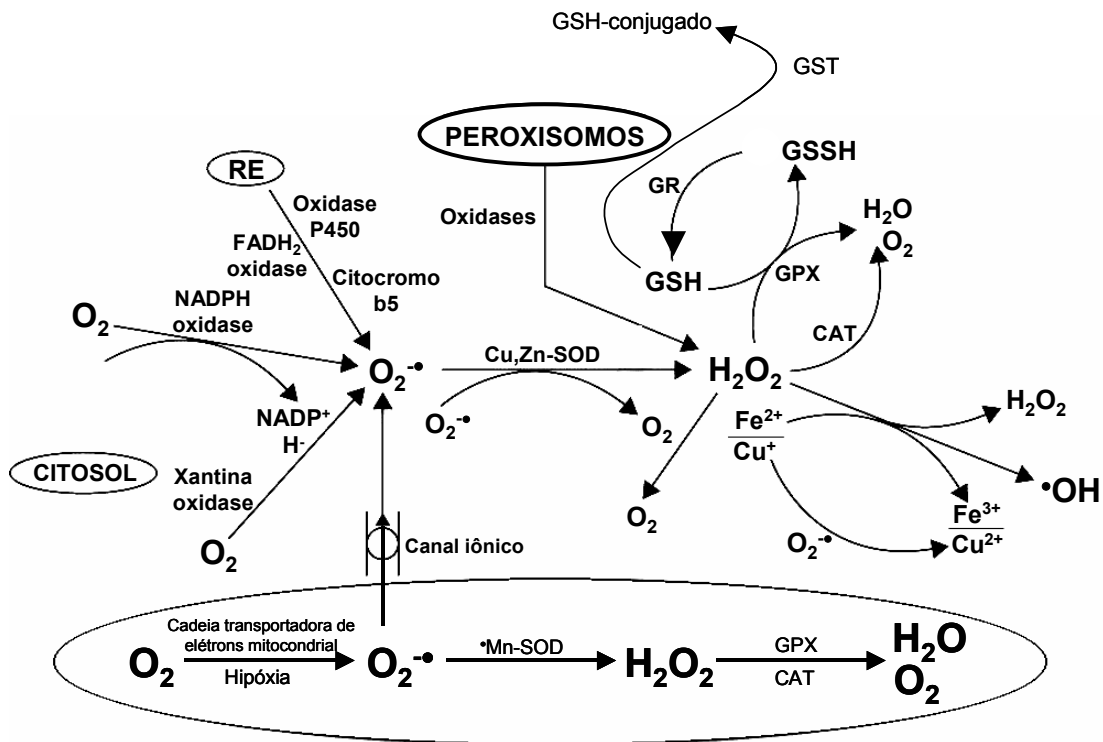


Figura 8: Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os principais mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante. Adaptado de MATES et al. (1999).

Apesar de ser sintetizada pelo fígado, a GSH, proveniente da dieta, pode ser absorvida intacta no intestino, sendo transportada e aumentando o conteúdo de GSH plasmático (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998).

Para que ocorra a síntese de GSH, deve haver disponibilidade de cisteína, o aminoácido sulfuroso precursor, e da enzima γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GluCisSH). O fígado, órgão que possui a maior quantidade de glutatona, é responsável pela biossíntese da molécula de GSH, convertendo a metionina em cisteína. A taxa de biossíntese de GSH no hepatócito é balanceada por sua taxa de exportação ao plasma, bile e mitocôndrias via sistemas distintos de transporte de glutatona (LU, 1999).

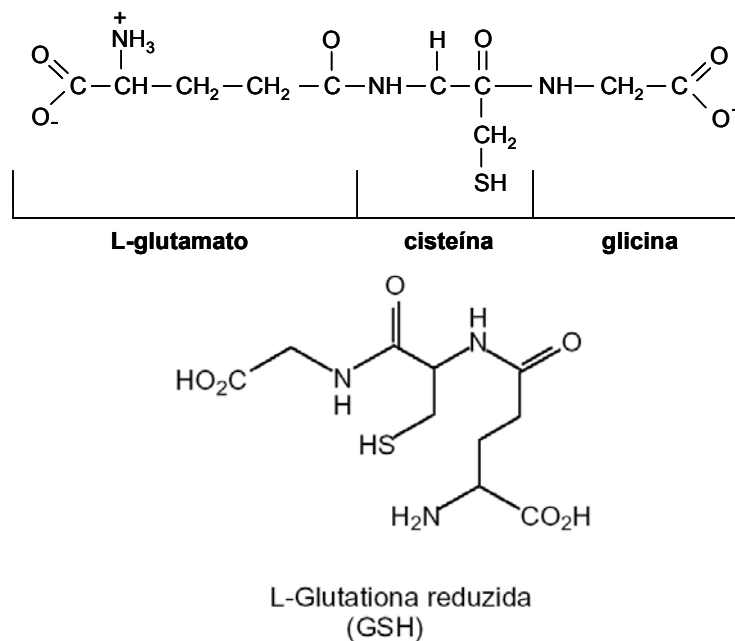


Figura 9: Estrutura e representação da molécula de glutationa reduzida (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Um dos principais determinantes da taxa de síntese de GSH é a disponibilidade de cisteína. A cisteína é normalmente derivada da dieta e, no fígado, da metionina. A cisteína difere dos outros aminoácidos por apresentar duas formas distintas: a forma sulfidrílica, predominante dentro da célula, e a forma dissulfídica, predominante fora da célula. Embora o glutamato e a glicina também sejam precursores da GSH, não há evidências de que influenciem na síntese de GSH, já que eles são sintetizados por vários caminhos metabólicos dentro dos hepatócitos (LU, 1999; SPADA & SILVA, 2004).

A atividade antioxidante da GSH pode ser associada a sua capacidade de reagir com H₂O₂ e peróxidos orgânicos (LOOH), convertendo-os em seus álcoois correspondentes, pela oxidação da GSH a GSSG, através da ação da GPx. Assim, a atividade da GPx depende da concentração de GSH (**Quadro 6**). De maneira semelhante, a atividade da GST também depende da concentração de GSH, uma vez que esta enzima utiliza a GSH na conjugação a compostos eletrofílicos no processo de desintoxicação de xenobióticos, permitindo a excreção dessas substâncias potencialmente nocivas (**Quadro 8**) (LIEBLER & REED, 1997; SIES, 1999).

Portanto, a GSH atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidante e na defesa contra xenobióticos (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998). A

versatilidade de suas propriedades químicas faz com que a GSH atue como um redutor eficiente, através da interação com numerosos componentes oxidantes como H_2O_2 e OH^\bullet (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005). Assim, a GSH também age como antioxidante neutralizando diretamente o radical OH^\bullet , restaurando moléculas alteradas pela doação de hidrogênio, promovendo a redução de peróxidos e mantendo grupos tióis das proteínas no estado reduzido (NOVELLI, 2005).

A GSH é o tiol mais abundante no meio intracelular, estando presente na maioria das células (MEISTER & ANDERSON, 1983; MARCHLER et al., 1993). É considerada uma das moléculas “sequestradoras-redox” mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula (SIES, 1999), protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO & PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (DENEKE & FANBURGO, 1989). Além disso, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão (SHAN et al., 1990); atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da desintoxicação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Também é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (DENEKE & FANBURGO, 1989).

1.4.2.2 Selênio (Se)

O Se é um antioxidante mineral constituinte de várias selenoproteínas como a glutathione peroxidase e a tioredoxina redutase. Estas proteínas contêm um ou mais resíduos de selenocisteína em seus sítios ativos, que são incorporados por um processo de co-tradução (BERRY et al., 1991; LEUNG, 1998).

O Se é um elemento não-metálico que está entre o enxofre (S) e o telúrio (Te) no Grupo VI da tabela periódica. Quimicamente, é classificado como um metalóide, com propriedades tanto de metais quanto de não-metais. Está intimamente relacionado ao enxofre em sua estrutura e função. O Se é raramente encontrado em seu estado natural, apresentando-se, geralmente, tanto na forma de compostos inorgânicos como orgânicos (REILLY, 1998).

O Se é um micronutriente essencial na nutrição humana e animal, incluindo os peixes (WATANABE et al., 1997). Possui três níveis de atividade biológica: 1) concentrações-traço são requeridas para o crescimento e desenvolvimento normais; 2) concentrações moderadas podem ser estocadas para manutenção das funções homeostáticas; e 3) concentrações elevadas podem resultar em efeitos tóxicos (HAMILTON,

2004). Assim, o Se pode ser tanto um elemento essencial quanto tóxico, dependendo da sua concentração.

O Se é co-fator da enzima GPx (ROTRUCK et al., 1973) e, por essa razão, protege o tecido celular dos danos causados pelas ERO, uma vez que a GPx faz parte do sistema de defesa antioxidante da célula. Apresenta versatilidade na capacidade de oxi-redução, uma característica fundamental para sua atuação no centro ativo da enzima GPx, responsável pela eliminação de peróxidos (ARTEEL & SIES, 2001). O nível de atividade desta enzima, no fígado ou no plasma, pode ser indicativo do suprimento de selênio do organismo (WATANABE et al., 1997). Aproximadamente 30% a 40% do conteúdo de Se em ratos está presente na estrutura da GPx e os 60% a 70% restantes estão distribuídos entre outras 30 selenoproteínas (BIELSTEIN & WHANGER, 1988).

Muitos autores descrevem uma estequiometria de aproximadamente 4 g-átomos de Se por mol de enzima GPx (COMBS & COMBS, 1986). Esta enzima não contém nenhum metal a não ser o selênio (FLOHÉ, 1973). WENDEL et al (1975) encontraram, por espectroscopia fotoelétrica de raios-X, que o sítio ativo da GPx inclui pontes de selênio. Subseqüentemente, FORSTROM et al (1978) mostraram que o sítio catalítico da GPx incluía selenocisteína.

Segundo HARPER (1973), o Se não protege os componentes teciduais ou celulares que estejam apresentando baixa concentração da enzima glutationa peroxidase. Segundo WATANABE et al. (1997), este mineral também apresenta função de proteção contra a toxicidade de metais pesados, como o mercúrio e o cádmio, pois é capaz de combinar-se com proteínas de alto peso molecular, produzindo complexos que exibem alta afinidade por tais metais.

O selênio também atua como parte integrante da enzima l-5'-iodotironina desiodinase, que converte o hormônio T_4 em uma forma mais ativa, o T_3 (triiodotironina) (MacDONALD et al., 2002). A baixa ingestão de selênio altera a função tireoideana, diminuindo os níveis de T_3 e aumentando os de T_4 (ARTHUR, 1997) o que, conseqüentemente, altera muitos aspectos do metabolismo celular.

REILLY (1998) evidencia que a deficiência de selênio é um fator importante de predisposição ao desenvolvimento de tumores. Estudos epidemiológicos mostraram uma relação inversa entre os níveis de selênio no plasma e a incidência de câncer (FIALA et al., 1998). Alguns efeitos da suplementação de selênio incluem diminuição da incidência de câncer (PATTERSON & LEVANDER, 1997; GANTHER, 1999). Sinais de deficiência de Se em animais incluem alterações vasculares, catarata, diminuição no crescimento, degeneração pancreática e falha reprodutiva (FOSTER & SUMAR, 1995).

O Se ainda apresenta um papel ativo no sistema imunológico e reduz o risco de infecções por vírus. A proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos são estimuladas pelo selênio (HUGHES, 2000). É também importante para o crescimento e para assegurar um metabolismo adequado. Além disso, melhora a contagem de espermatozóides e apresenta efeito cardioprotetor (REILLY, 1998).

Entretanto, os efeitos tóxicos do excesso de Se incluem redução do crescimento, letargia, diminuição das funções hepáticas, diminuição do peso do fígado, diminuição na performance reprodutiva, catarata, diminuição dos níveis de hemoglobina e aumento na incidência de câncer, entre outros (COMBS & COMBS, 1986).

Em animais, a quantidade de selênio necessária para causar toxicidade depende da fonte de selênio, do tipo de dieta, do ambiente bem como da própria espécie (FOSTER & SUMAR, 1995). São descritos três tipos clínicos de intoxicação por selênio em animais. 1) a selenose aguda, caracterizada pela exposição a altas doses de selênio dentro de um curto período de tempo, com sinais severos de toxicidade que são manifestados rapidamente; 2) a selenose sub-aguda, descrita como resultado de uma exposição a grandes doses de selênio por um longo período de tempo, resultando em manifestações de sinais neurológicos como ataxia e falência no sistema respiratório e 3) a selenose crônica, caracterizada pela exposição a níveis moderados de selênio por períodos de semanas ou meses, sendo que os maiores sinais de selenose crônica são lesões dérmicas, podendo haver também anorexia, com acentuada perda de peso (COMBS & COMBS, 1986).

A sua toxicidade também está relacionada à sua capacidade pró-oxidante, catalisando a oxidação dos tióis como a GSH e simultaneamente gerando radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (YAN & SPALLHOLZ, 1993; SPALLHOLZ, 1997).

Os peixes podem absorver o selênio da água através das brânquias, do trato digestório e do tegumento (EVANS, 1993; HAMILTON, 2004). Entretanto, a dieta é a via de captação de selênio dominante, uma vez que os peixes e outros animais ocupam níveis tróficos mais elevados na cadeia alimentar (DALLINGER et al., 1987). A incorporação do selênio na forma de selenito através das brânquias é freqüente, mesmo quando em pequenas concentrações na água. HODSON & HILTON (1983) relataram que o nível de selênio presente na água afeta a exigência alimentar deste mineral para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Segundo o National Research Council (NRC, 1993), a exigência nutricional deste mineral varia com a fonte de suplementação utilizada, com a concentração de ácidos graxos poli-insaturados e de vitamina E na dieta, bem como também com o teor existente na água.

A biodisponibilidade deste mineral está relacionada com a sua forma química - quanto mais reduzida menor será sua disponibilidade para os animais. GONZÁLEZ & SILVA (2003) descrevem que na deficiência deste elemento, há uma diminuição na atividade da GPx e, desta forma, a determinação de Se pode ser realizada para auxiliar no diagnóstico de enfermidades causadas pela deficiência deste mineral.

O selênio está presente em vários ingredientes e diversos compostos são considerados fontes de suplementação deste mineral. O selenito e o selenato são fontes inorgânicas de selênio, enquanto que o selenometionina, o selenocistina e o selenocisteína são compostos orgânicos desse mineral.

As farinhas de peixe e os produtos marinhos utilizados como ingredientes em rações para peixes são fontes de selênio, mas somente as dietas contendo acima de 15% de farinha de peixe apresentam concentrações adequadas de Se, não necessitando de suplementação. No entanto, rações formuladas predominantemente com produtos de origem vegetal necessitam de suplementação com Se (WANG & LOVELL, 1997), uma vez que a sua concentração varia em alimentos vegetais, estando diretamente ligada à presença desse mineral no solo. Poucos estudos foram conduzidos para avaliar a biodisponibilidade deste mineral nos alimentos.

Segundo COMBS & COMBS (1986) três métodos são utilizados para se estimar a biodisponibilidade do selênio, estas envolvem a utilização de diferentes tipos de critérios de respostas biológicas. A primeira é a metodologia preventiva que avalia a eficiência relativa de concentrações conhecidas de selênio em reduzir a incidência e/ou severidade de síndromes de deficiência de selênio. A segunda metodologia, avalia as concentrações de Se nos tecidos, determinando a eficiência relativa de uma quantidade conhecida de Se da dieta em manter a concentração de Se nos diferentes tecidos. A terceira metodologia, chamada "ensaio funcional", avalia a eficiência relativa de quantidades conhecidas de Se da dieta em manter a atividade da GPx em vários tecidos. A diminuição na taxa de crescimento de animais jovens parece ser o parâmetro mais sensível de intoxicação por selênio.

LORENTZEN et al. (1994), estudando o salmão-do-atlântico (*Salmo salar*), mostraram que tanto o Se proveniente do selenito de sódio como o Se proveniente da Selenometionina, em níveis de 1 ou 2 mg de Se.Kg⁻¹ de dieta, se comportam igualmente na promoção do crescimento e na manutenção da atividade da GPx. BELL & COWEY (1989) avaliaram a disponibilidade de selênio de diferentes fontes como Se-metionina, Se-cistina, selenito de sódio e farinha de peixe para *S. salar* e obtiveram coeficientes de disponibilidade de 92%; 53%; 64% e 47%, respectivamente. Estes autores não encontraram diferença significativa na atividade da GPx do fígado e do plasma para estas diferentes fontes.

Entretanto, a concentração de selênio no plasma foi maior quando utilizaram a S-metionina.

Em estudos, também com o salmão-do-atlântico, BELL et al. (1987) descreveram o selênio como o principal fator no mecanismo de proteção celular contra as injúrias oxidativas e mencionaram queda nos valores do hematócrito e aumento na taxa hemolítica quando os tecidos apresentavam diminuição nas concentrações de Se e vitamina E. Observaram, ainda, áreas de vacuolização no tecido pancreático e diminuição da atividade da glutathione peroxidase no fígado. Não encontraram diferença significativa entre os tratamentos para ganho de peso, entretanto os níveis de vitamina E e de Se no fígado e plasma foram significativamente menores na deficiência de selênio.

Segundo POSTON et al. (1976), BELL et al. (1986) e BELL & COWEN (1987), *S. salar*, quando alimentado com dieta deficiente em selênio, demonstrou um crescimento lento, uma baixa atividade da glutathione peroxidase, redução do hematócrito e ataxia. HILTON et al. (1980) estudaram os sintomas da deficiência de selênio em truta arco-íris, *O. mykiss*, e encontraram reduzida taxa de crescimento, decréscimo da eficiência alimentar e diminuição na atividade da GPx. GATLIN & WILSON (1984) observaram decréscimo no crescimento, baixa eficiência alimentar e reduzida atividade da GPx no bagre-do-canal, *Ictalurus punctatus*.

Segundo HILTON et al. (1980) e GATLIN & WILSON (1984), altos níveis de selênio na dieta apresentam efeitos tóxicos, resultando em crescimento reduzido, baixa eficiência alimentar e aumento na taxa de mortalidade, sendo que níveis acima de 13 a 15 mg de Se por Kg da dieta podem resultar em toxicidade. A ingestão prolongada acima de 3 mg de Se por Kg de dieta pode ser considerada tóxica, segundo HILTON et al. (1980). HODSON & HILTON (1983) encontraram calcinose renal em trutas arraçadas com níveis acima de 10 mg de Se por Kg de ração. HICKS et al. (1984) também identificaram nefrocalcinose em *O. mykiss* com alimentação deficiente em selênio, sendo que os túbulos renais revelaram degeneração e processo inflamatório.

Para o selênio da dieta, que é armazenado em sua forma orgânica, a margem entre a exigência nutricional e seu nível tóxico é muito estreita (HODSON & HILTON, 1983). Entretanto, muito pouco se conhece sobre a suplementação de antioxidantes na dieta, especialmente de Se em peixes, e tampouco se conhece os efeitos desses antioxidantes durante o estresse oxidante induzido por pesticidas que frequentemente contaminam ecossistemas aquáticos.

1.4.2.3 Outros antioxidantes não-enzimáticos

Como ilustrado na **Tabela 2**, existem vários outros compostos não-enzimáticos que podem atuar como antioxidantes intracelulares. Entre eles, podem ser citados as vitaminas A, C e E, a ubiquinona, carotenóides, os flavonóides, a ceruloplasmina, o ácido úrico, a melatonina e a metalotioneína, entre outros (MACHLIN & BENDICH, 1987; HALLIWELL, 1990; SIES, 1991). Além destes, há vários nutrientes essenciais de origem mineral que participam do processo antioxidante em associação com enzimas, como o zinco, cobre, manganês, selênio e ferro (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Os antioxidantes não-enzimáticos podem ainda ser classificados em endógenos, como a GSH e ubiquinona, e os exógenos, como as vitaminas A, C e E, carotenóides (licopeno e β -caroteno) e minerais, entre outros. Os antioxidantes exógenos, por serem obtidos da alimentação, fornecem focos de intervenção no sistema de defesa antioxidante da célula, através da suplementação da dieta (**Figura 10**). A utilização de agentes antioxidantes pode representar uma nova abordagem na inibição de danos provocados pelo excesso de radicais livres, uma vez que a aplicação desses agentes pode interferir em mecanismos celulares, incluindo alterações na atividade enzimática e na estrutura das membranas (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

A vitamina E (α -tocoferol) é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, atua na proteção contra a lipoperoxidação (KAY et al., 1986). Ela pode reagir diretamente com uma variedade de oxiradicais, como o ânion superóxido, o radical hidroxil, e também com o oxigênio “singlet” (MACHLIN & BENDICH, 1987).

Junto com o selênio, a vitamina E tem função protetora antioxidante das membranas plasmáticas contra a ação tóxica dos peróxidos lipídicos, parando a reação em cadeia de auto-oxidação lipídica. Suas interações se exemplificam pelos casos em que a vitamina E reduz a necessidade de selênio e vice-versa (GONZÁLEZ & SILVA, 2003). Outro exemplo da interação é a complementação no sítio de ação, já que o selênio atua no meio intracelular e a vitamina E no meio extracelular (PASCHOAL et al., 2003).

Os carotenóides, principalmente o β -caroteno, podem funcionar como precursores da vitamina A. Os carotenóides apresentam duplo papel, ao diminuírem a formação do oxigênio “singlet” ao mesmo tempo em que ajudam a remover aqueles já formados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). A vitamina A tem pouca ação antioxidante e é incapaz de agir sobre o oxigênio “singlet”, mas seu precursor, o β -caroteno, é o mais eficiente ligante desta forma reativa de oxigênio e pode agir como antioxidante.

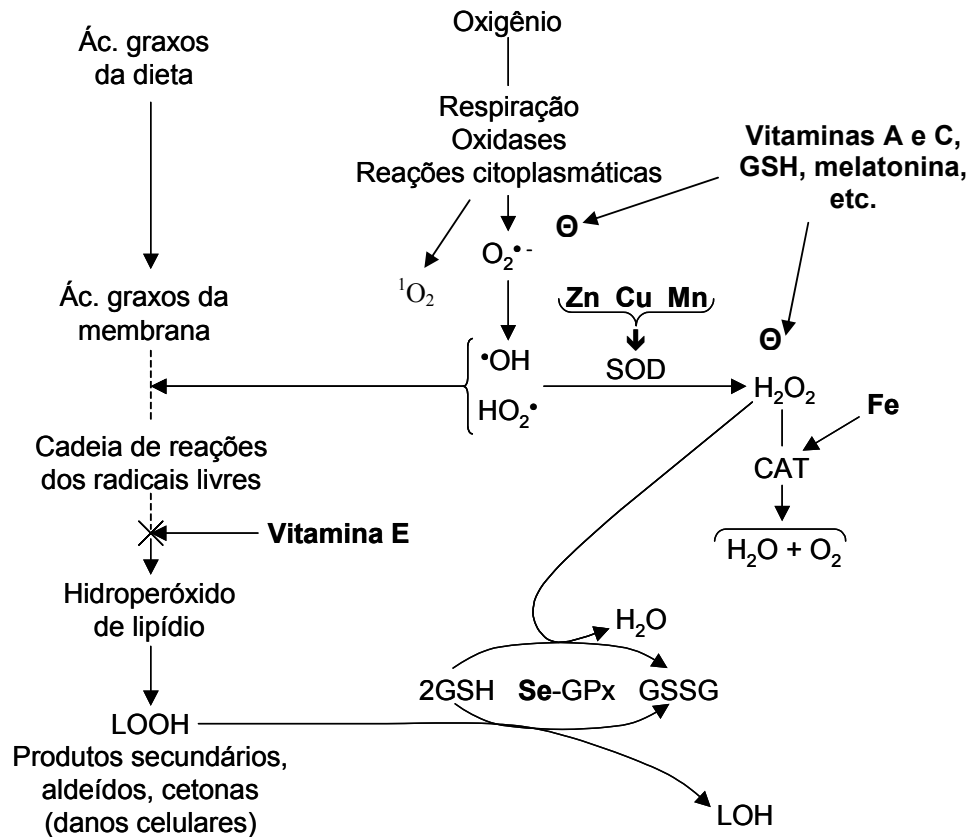


Figura 10: Inter-relação entre as ERO, componentes celulares e sistema antioxidante. Destaque (em negrito) para a atuação de antioxidantes não-enzimáticos exógenos (vitaminas A, C e E, minerais como o Se, Cu e Fe, melatonina, GSH) como possíveis focos de intervenção através da suplementação na dieta. Adaptado de BELL & COWEY (1987).

A vitamina C (ácido ascórbico) é hidrossolúvel e também age contra as ERO como o $O_2^{\bullet-}$ e o OH^{\bullet} . Participa ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000) e, juntamente com a GSH, atua protegendo as células dos danos oxidantes (NORDBERG & ARNER, 2001).

A melatonina é o principal hormônio da glândula pineal em vertebrados exercendo papel regulador sobre eventos fisiológicos, metabólicos e comportamentais, como a regulação de mecanismos endócrinos independentes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, termorregulação, regulação do sistema cardiovascular, ciclos de atividade-reposo e vigília-sono, sistema imune, crescimento e envelhecimento (VANECEK, 1998). Além disso, a

melatonina é um potente antioxidante, neutralizando radicais livres como $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} e LOO^{\bullet} e estimulando a síntese de enzimas antioxidantes como a SOD, a GPx e enzimas envolvidas na síntese de GSH (ANTUNES et al., 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; KARBOWNIK & REITER, 2002; REITER et al., 2002). Por exercer uma proteção substancial contra os radicais livres que são gerados em uma variedade de situações experimentais, incluindo injúria por isquemia/reperfusão, a melatonina vem sendo utilizada terapeuticamente em cirurgias e transplantes (REITER & MAESTRONI, 1999).

Metalotioneínas (MTs) são uma família de baixo peso molecular (6-7 kDa), proteínas ricas em cisteína, que são induzidas por íons de metais pesados tais como Cd, Cu e Zn. Os grupos de cisteína (-SH) das MTs ligam-se aos íons dos metais dos grupos I-B e II-B da tabela periódica, como Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} , prevenindo sua ação tóxica e danos celulares. As MTs são ubiqüitativamente expressas e, portanto, têm sido implicadas em uma série de importantes processos biológicos tais como homeostase de íons metálicos e desintoxicação de metais pesados (KAGI & SCHAFFER, 1988; SATO & BREMMER, 1993).

Em adição aos metais, as MTs são também induzidas por outros agentes incluindo mitógenos e citocinas (KAGI et al., 1993). A metalotioneína é o primeiro sistema de defesa da célula contra metais e um marcador bioquímico em potencial na contaminação de metais (BRAGIGAND & BERTHET, 2003).

Alguns antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos que participam da defesa contra as espécies reativas do oxigênio nos sistemas biológicos estão na **Tabela 2**.

Os organismos aeróbios possuem um enorme e diversificado sistema de defesa antioxidante, defesas tanto enzimáticas como não-enzimáticas, no sentido de manter baixos níveis das ERO e minimizar o dano delas decorrente. As principais estratégias de defesa antioxidante estão ilustradas na **Figura 11**.

Tabela 2: ERO e antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.

ERO	Antioxidantes	
	Endógenos	Exógenos
Ânion superóxido $O_2^{\bullet -}$	superóxido dismutase (SOD): a) citoplasmática: Zin-Cu SOD; b) mitocondrial: Mn SOD; vitamina C	vitaminas A, C e E, zinco, cobre, manganês
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	catalase, glutatona peroxidase, piruvato, glutatona reduzida (GSH),	
Peróxido lipídico ($LOOH^{\bullet}$)	glutatona peroxidase, selênio, melatonina	vitamina E, selênio, L-cisteína
Radical hidroxila (HO^{\bullet})	glutatona reduzida (GSH), ácido úrico, ácido lipóico, vitamina C	picnogenol, dimetil sulfóxido, EDTA, ácido dimercapto succínico, manitol e polifenóis
Oxigênio "single" (1O_2)	ácido úrico	β -caroteno, flavonóides

1.5 Defesas Antioxidantes em Peixes

Os peixes estão sujeitos aos danos mediados pelas ERO assim como qualquer outro organismo que respira oxigênio (FRAGA et al., 1996). Estudos sobre os mecanismos de defesas antioxidantes em peixes são relativamente recentes e algumas análises comparativas têm relacionado os níveis de atividade das enzimas antioxidantes em diversos tecidos (WDZIECZAK et al., 1982; CASSINI et al., 1993; WILHELM-FILHO & BOVERIS, 1993; WILHELM-FILHO et al., 1993) e principalmente em espécies de regiões temperadas (RUDNEVA, 1997; SPEERS-ROESCH & BALLANTYNE, 2005).

Algumas avaliações das proteções antioxidantes, em espécies de peixes tropicais e subtropicais, também foram realizadas, revelando diferenças qualitativas e quantitativas em relação aos peixes das zonas temperadas (WILHELM-FILHO & BOVERIS, 1993; WILHELM-FILHO et al., 1993) e, igualmente, em relação aos representantes amazônicos examinados por WILHELM-FILHO & MARCON (1996).

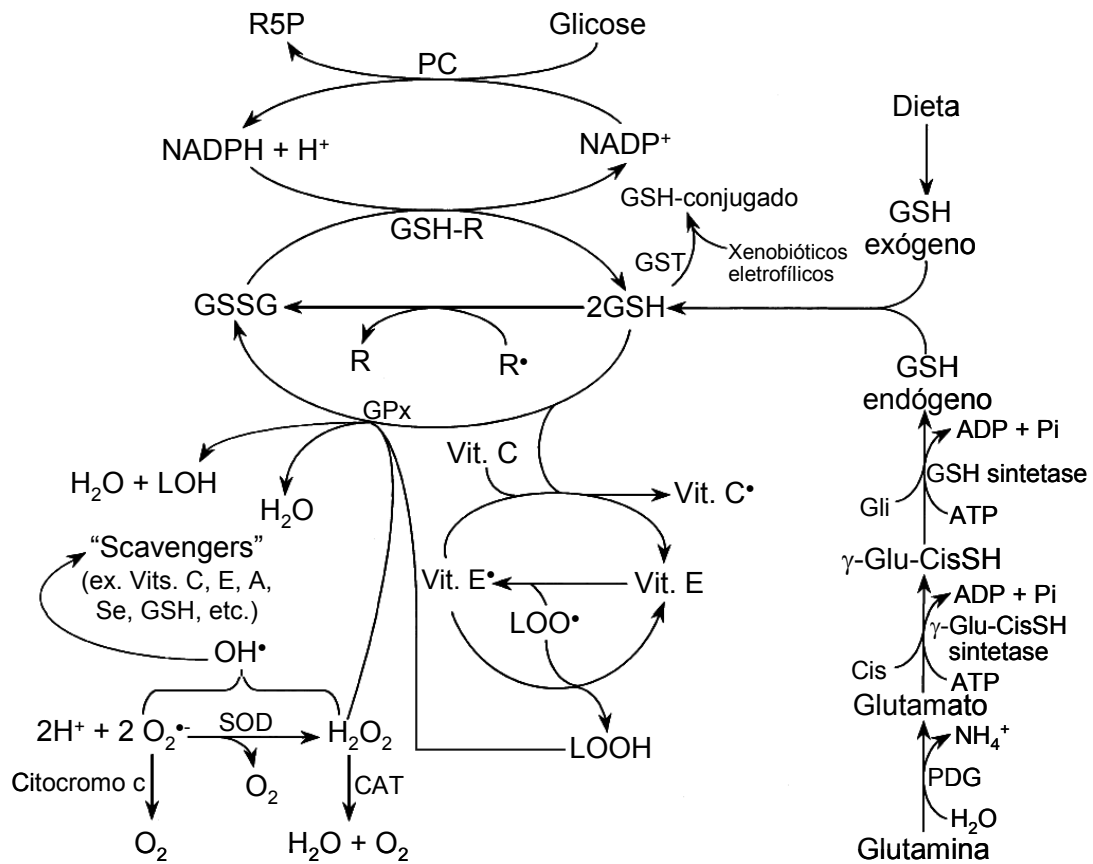


Figura 11: Esquema representando o sistema de defesa antioxidante (enzimático e não-enzimático) em células de mamíferos (FANG et al., 2002).

Os peixes estão frequentemente expostos ao impacto das ERO porque, diferentemente dos vertebrados terrestres, os animais aquáticos são expostos diariamente a mudanças sazonais de temperatura e oxigênio ou a mudanças nas condições ambientais no seu habitat natural, tais como poluição, disponibilidade de oxigênio, pH, incidência da radiação solar, entre outros (CHOW, 1991; WINSTON & DI GIULIO, 1991; HENRIQUE et al., 1998). Esta situação é facilmente exemplificada pelos peixes de água doce, que vivem em ambientes instáveis como as águas tropicais (KRAMER, 1987; GRAHAM, 1990). Como os outros vertebrados, os peixes possuem sistemas de defesas antioxidantes que utilizam mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos para combater os impactos das ERO (FRAGA et al., 1996). Os peixes, assim como outros organismos aquáticos, exibem uma variedade de alterações nesses sistemas de defesa antioxidante, após a exposição a poluentes, com potencial oxidante (REGOLI et al., 2002). Vários estudos em organismos aquáticos vêm

demonstrando a importância destes mecanismos de defesa antioxidantes na proteção celular contra o estresse oxidante induzido por xenobióticos. Essas alterações podem ser usadas como biomarcadores de estresse oxidante de diferentes poluentes nos organismos aquáticos (VALAVANIDIS et al., 2005).

Comparativamente com outros vertebrados, as proteções antioxidantes de peixes revelam características funcionais e qualitativas muito similares, principalmente em relação à superóxido dismutase (MATKOVICS et al., 1977; VIG et al., 1989; NATOLI et al., 1990). Contudo, em termos quantitativos, os peixes apresentam atividades enzimáticas inferiores às observadas nos mamíferos (MATKOVICS et al., 1977; PEREZ-CAMPO et al., 1993; WILHELM-FILHO, 1994) e, a princípio, compatíveis com seus respectivos níveis de atividade. Por outro lado, as concentrações de glutathiona sanguínea são similares e até mesmo superiores às observadas nos mamíferos (DAFRÉ & REISCHL, 1990; WILHELM-FILHO & MARCON, 1996). Além disso, em relação a outros vertebrados em geral, os peixes parecem exibir atividades basais de SOD e CAT mais baixas, porém altas atividades da GPx (WDZIECZAK et al., 1982).

Um grande obstáculo na tentativa de correlacionar a atividade das enzimas antioxidantes com os aspectos fisiológicos dos peixes, é a diferença quantitativa existente entre as diferentes espécies analisadas (WINSTON, 1991).

Segundo CHANCE (1979), as mitocôndrias são o principal local de produção das ERO e os músculos vermelhos são proporcionalmente a maior fonte de mitocôndrias. Conseqüentemente, este tecido é considerado o maior contribuinte na geração das ERO em mamíferos e aves (BOVERIS & CHANCE, 1973). Entretanto, segundo AKSNES (1981) e WILHELM-FILHO (1993), em muitos peixes os músculos vermelhos são relativamente escassos, e outros tecidos como o fígado, sangue, rim, bexiga natatória, músculo branco e outros são mais representativos com relação à produção das ERO e os processos que conduzem ao estresse oxidante.

1.6 Pesticidas e Estresse Oxidante

A contaminação aquática é um dos principais responsáveis pelo estresse oxidante devido ao aumento da produção de ERO nos organismos expostos (SILVA et al., 1999; AHMADA et al., 2000). O desenvolvimento de várias patologias em peixes e camarões de importância econômica está associado à manipulação ambiental e à poluição do meio aquático (LE MOULLAC & HAFFNER, 2000).

Várias evidências suportam a ligação entre mudanças ambientais (incluindo contaminantes), doenças e depressão do sistema imune (DUNIER & SIWICKI, 1993; PIPE & COLES, 1995). Entretanto, existem poucos dados que corroborem a hipótese de que mudanças ambientais afetam os sistemas de defesas antioxidantes, levando ao aumento na suscetibilidade a agentes infecciosos e doenças em organismos aquáticos (LE MOULLAC & HAFFNER, 2000; LIVINGSTONE, 2001; ALMEIDA et al., 2002), principalmente em relação a peixes tropicais. Em algumas espécies de peixes da zona temperada foram observados aumentos na produção das ERO e nas defesas antioxidantes decorrentes de mudanças na temperatura do meio e no hábito alimentar da espécie e da contaminação aquática (PARIHAR et al., 1997; ALMEIDA et al., 2002). Neste sentido, os pesticidas podem ser considerados como perturbadores entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes nos organismos, ocupando uma posição especial entre os muitos xenobióticos lançados no ambiente.

Por outro lado, é cada vez mais freqüente a poluição do ambiente aquático por produtos químicos provenientes da agricultura, indústria, derramamento de óleo, efluentes de minas e outros contaminantes que podem ser incorporados pelos tecidos de invertebrados e vertebrados (VAN der OOST et al., 1996; SOLE et al., 2000; DORES & FREIRE, 2001; LIVINGSTONE, 2001).

No Brasil, a agroindústria é uma atividade em franco desenvolvimento e é responsável por uma importante parcela da balança comercial do país. O país é responsável pelo consumo de cerca de 50% da quantidade de agrotóxicos utilizados na América Latina, o que envolve um comércio de aproximadamente US\$ 2,5 bilhões/ano com consumo superior a 140 mil toneladas em ingredientes ativos (EMBRAPA, 2003). Atualmente o Brasil ocupa o quarto lugar no ranking dos países consumidores de agrotóxicos (MOREIRA et al., 2002). Para garantir a eficiência desta atividade, os empresários e produtores rurais muitas vezes utilizam agrotóxicos com o intuito de maximizar suas produções, possuindo lavouras altamente dependentes de insumos químicos, incluindo os pesticidas. Apesar dos benefícios que os pesticidas trazem, o problema de intoxicações por defensivos agrícolas é preocupante, especialmente pelo fato de que essas intoxicações acontecem pela ingestão gradativa destes produtos que contaminam a água, o solo e uma variedade de alimentos (RISSATO et al., 2004).

As propriedades destes compostos orgânicos, tais como alta toxicidade, para uma grande variedade de pragas e, manutenção da atividade por meses, estimularam pesquisas e também a descoberta de outros compostos orgânicos sintéticos. Dentre eles, destacam-se os organofosforados (malation, paration, diazimon, diclorvos, triclorfon), organoclorados

(aldrin, lindane, dieldrin, endosulfan, clordane, heptoclor), carbamatos (aldicarb, carbofuran, vetomil) e piretróides (flumetrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina).

A aplicação de pesticidas em áreas cultivadas pode resultar em contaminação do ambiente aquático por meio de derramamentos acidentais, lavagem do solo pela chuva, lavagem de equipamentos e recipientes utilizados nas aplicações, descarga de efluentes industriais ou de atividades agrícolas, precipitação daqueles que contaminam a atmosfera, transporte de partículas de solo contaminadas através da erosão, entre outros (ALTOE et al., 1992). Vários pesticidas, incluindo algicidas, herbicidas e inseticidas são indicados pelos fabricantes para o controle de pragas em reservatórios e tubulações de água e têm sido testados e liberados para o uso em, ou próximo a, ambientes aquáticos DORES & FREIRE, 2001; ARAÚJO et al., 2001).

Uma das características indesejáveis desses compostos, do ponto de vista ambiental, é a persistência, que consiste na capacidade das substâncias em permanecer inalteradas e ativas por muito tempo no solo, na água e nos alimentos (ABOU-ARAB et al., 1996). O uso de muitos destes compostos foi proibido devido à constatação do efeito cumulativo e prejudicial, que ocorre pela transferência de pequenas quantidades ao longo das cadeias alimentares, fenômeno conhecido por biomagnificação (JORGENSEN, 2001). Além disso, a administração desses produtos nem sempre é efetuada de forma controlada, sendo que seu uso indiscriminado, mesmo de forma profilática, pode trazer conseqüências gravíssimas aos animais e ao ambiente.

Uma vez liberados no ambiente, os pesticidas podem ter diferentes destinos, tais como o solo e as águas residuais e subterrâneas, podendo também ser transportados por longas distâncias devido aos processos naturais de movimento das águas superficiais contaminando recursos hídricos importantes (ALBANIS et al., 1998). Na água, estes compostos podem ser adsorvidos ao material em suspensão, depositados no sedimento ou incorporados por organismos, podendo ser acumulados, metabolizados e excretados.

A concentração da maioria dos pesticidas em água é baixa, em parte, devido ao fato de serem geralmente pouco solúveis e, em parte, devido ao efeito da diluição. Isto, no entanto, não exclui a possibilidade de que concentrações muito altas venham a ocorrer após pesadas chuvas, especialmente quando áreas ao redor de um corpo d'água tenham sido recentemente tratadas com altas doses de pesticidas. Mesmo em concentrações baixas, os pesticidas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos que podem concentrá-los até 1000 vezes o encontrado no ambiente. Não existe nível seguro previsível para pesticidas na água, pois a ocorrência do processo de biomagnificação pode aumentar

consideravelmente os efeitos tóxicos nos organismos (EICHELBERG & LICHTENBERG, 1971; DORES & FREIRE, 2001).

Por outro lado, diversos pesticidas são utilizados na aquicultura para eliminação de ectoparasitas como copépodos e monogenéticos, em concentrações que vão de 0,25 a 12,5 ppm (SHEPHERD & BROMAGE, 1995; BURGES et al., 1998). Desta forma, os peixes e outros organismos aquáticos podem estar sujeitos a exposição aos pesticidas e acumulá-los em concentrações excessivas (RAND & PETROCELLI, 1984).

A fauna íctica constitui um recurso alimentar importante, sendo uma fonte protéica acessível através da exploração direta das populações naturais. Embora essas populações de peixes pareçam inesgotáveis, a ação antrópica tem contribuído para a sua redução, tornando inevitável que populações mundiais tornem-se cada vez mais dependentes de peixes cultivados artificialmente. A utilização de pesticidas nestes sistemas de cultivo torna ainda mais agravante a situação.

Entre os pesticidas, merecem destaque os inseticidas organofosforados (OPs), os quais constituem uma classe importante de inseticidas usados atualmente no combate a diversos tipos de pragas na agricultura e, em geral, no tratamento de ectoparasitas em animais (RODRIGUES et al., 2001). De acordo com HOFFMAN et al. (1995), mais de 100 diferentes OPs estão registrados nos EUA, sendo aplicados em aproximadamente 200 milhões de acres/ano. No Brasil, os OPs representam aproximadamente 40% do consumo total de inseticidas (KUBOTA, 2000).

Os efeitos tóxicos dos OPs têm sido atribuídos basicamente à sua ação em inibir a acetilcolinesterase (AChE), levando a uma hiperatividade do sistema colinérgico, uma vez que a acetilcolina não é rapidamente hidrolizada, resultando em uma estimulação colinérgica contínua (JOKANOVIC, 2001). De acordo com VITTOZZI & De ANGELIS (1991), aproximadamente um terço dos OPs são seletivamente tóxicos aos peixes.

Entretanto, os efeitos dos OPs não se restringem apenas à inibição da AChE. Os OPs são capazes também de induzir apoptose (CARLSON et al., 2000) e provocar ataxia e paralisia (JOHNSON, 1982). Além disso, alguns estudos mostram que, em geral, pesticidas organofosforados podem induzir a peroxidação lipídica, a produção de ERO e mobilização dos sistemas de defesa enzimáticos antioxidantes (BANERJEE et al., 1998; 2001).

Baixas doses do OP malation, administradas oralmente em ratos, induziram a peroxidação lipídica e o aumento da atividade da CAT e da SOD nos eritrócitos destes animais (JOHN et al., 2001). Alterações características do estresse oxidante como o aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e o aumento da peroxidação lipídica também foram observadas em carpa (*Cyprinus carpio*) e bagre

(*Ictalurus nebulosus*) expostos ao inseticida organofosfatado diclorvos (HAI *et al.*, 1997). PEÑA-LLOPIS *et al.* (2003) também observaram que a exposição da enguia (*Anguilla anguilla*) a concentrações subletais de diclorvos causou inibição das enzimas GR, GST e γ -GT e uma elevação nos níveis de GSH. Outros OPs como fosfamidon, triclorfon e diclorvos, também induziram o estresse oxidante em ratos (JULKA *et al.*, 1992; NAQVI & HANSAN, 1992; YAMANO & MORITA, 1992).

BOONE & CHAMBERS (1996) relataram que os peixes são capazes de resistir a maiores graus de inibição de AChE que os ratos, uma vez que possuem uma reserva maior desta enzima. O grande período de inibição que os peixes toleram permite inferir que, diferente dos mamíferos, não requerem grandes quantidades de AChE funcional para se manterem vivos, sugerindo que a inibição da AChE pode não ser a causa principal da toxicidade aguda nestes animais.

Deste modo, os biomarcadores do estresse oxidante podem ser estudados para auxiliar na avaliação das conseqüências da exposição de organismos aquáticos aos OPs. Eles podem também ser utilizados no diagnóstico de possíveis distúrbios em níveis teciduais ou até mesmo populacionais, decorrentes de impactos por poluição ambiental (PORTE *et al.*, 1991; BAINY *et al.*, 1996).

1.7 Metil paration (MP)

O metil paration (**Figura 12**) é um dos inseticidas organofosforados utilizados em larga escala em diversos países, comercialmente conhecido como Dalf, Dimethyl Parathion, Devithion, E 601, Folidol-M, Fosferno M50, Gearphos, Kilex Parathion, Metacide, Metaphos, Metron, Nitrox 80, Partron M, Penncap-M, entre outras denominações (EXTOXNET, 1999). No mercado brasileiro, o produto é comercializado como FOLIDOL 600 (fabricante Bayer) e FOLISUPER 600 BR (fabricante Agripec).

É classificado pela EPA (Agência de Proteção Ambiental dos EUA) como Pesticida de Uso Restrito, pertencente à classe toxicológica dos compostos “extremamente tóxicos” (Classe I), podendo ser utilizado somente por aplicadores autorizados (EPA, 1999).

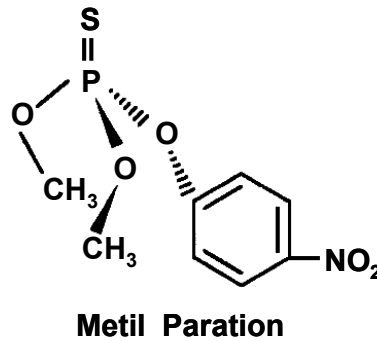


Figura 12: Estrutura química do metil paration (VIDEIRA et al., 2001).

No Brasil, o MP é muito utilizado para o controle de uma grande variedade de insetos em várias culturas, tais como algodão, milho, soja, cana de açúcar e cítricos, entre outros. Segundo os fabricantes, é o único produto recomendado oficialmente para o controle do inseto da “broca” (*Eutinobothrus brasiliensis*) sendo, por isso, extensivamente usado na agricultura brasileira (MACHADO & FANTA, 2003). Conforme estudo de CALDAS & SOUZA (2000), alimentos comercializados em diversas metrópoles brasileiras como São Paulo, Rio de Janeiro, Distrito Federal, Belo Horizonte entre outras, estavam contaminados com agrotóxicos em concentrações acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira (ANVISA, 1999). O MP, no referido trabalho, foi o pesticida que mais excedeu o parâmetro toxicológico IDA (dose diária aceitável de ingestão), que é a dose máxima permitida para a ingestão, segundo a WHO (1997), e que mantém ativa a indústria de agrotóxicos. Segundo VINATEA-ARANA (1997), em cultivos de arroz, o MP, quando dissolvido em água, atinge a concentração de 2,3 ppm a 5 cm de profundidade.

Além disso, em sistemas de cultivo de peixes, o MP é comumente utilizado na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixes, na concentração de 0,25 a 3,0 ppm do produto ativo, com o objetivo de eliminar predadores aquáticos como larvas de insetos da ordem Odonata (FIGUEIREDO & SENHORINI, 1990; SILVA et al., 1993).

Deste modo, os peixes podem estar constantemente sujeitos à exposição ao MP, seja acidental ou em condições de tratamento em tanques de criação, sendo de grande importância o estudo dos seus efeitos em peixes brasileiros.

O MP é parcialmente solúvel em água (20 a 25 ppm), mas o paraoxon, seu metabólito ativo, é mais solúvel (2.400 ppm). Em água, o MP é lentamente hidrolisado para a forma *p*-nitrofenol e ácido dietil ortotiofosfórico. A taxa de degradação aumenta com a temperatura, exposição à luz e em meio alcalino (TOPLEY, 1950 *apud* MATSUMURA, 1985; WAUCHOPE et al., 1992). Em solução aquosa, o MP tem vida média de 120 dias e possui

persistência moderada no solo, com meia vida de 30 a 100 dias (EXTOXNET, 2004, EPA, 1999). É rapidamente metabolizado por plantas e animais e parece não persistir ou bioconcentrar-se (HOWARD, 1989). Entretanto, segundo DE LA VEJA SALAZAR et al. (1997), o MP bioconcentrou-se 221 vezes em brânquias e 76 vezes em músculo de *C. carpio*.

A Resolução CONAMA 20/86 (atualmente revisada para a Resolução CONAMA 357/05) regulamenta uma série de substâncias, estabelecendo a concentração máxima permissível das mesmas, de acordo com as diferentes classes de água. A concentração máxima de organofosforados totais e carbamatos permitida para águas da classe I, que são destinadas à conservação da vida aquática, é de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$.

De qualquer modo, não há muitos dados disponíveis na literatura que quantifiquem as concentrações do MP em corpos de água brasileiros. MOREIRA et al. (2002) verificaram a presença de níveis significativos ($37,2$ a $76,8 \mu\text{g.L}^{-1}$) de agrotóxicos anticolinesterásicos em amostras de corpos d'água pertencentes a microbacia do Córrego São Lourenço, RJ, e SOUMIS et al. (2003) detectaram resíduos de MP em oito espécies de peixes amazônicos. Isto demonstra que os pesticidas usados na agricultura podem ser levados através das chuvas, contaminando águas e a ictiofauna da região, bem como outros alimentos.

A ampla utilização desse produto, o desconhecimento dos riscos associados a sua utilização, o conseqüente desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização e a grande pressão comercial por parte das empresas distribuidoras e produtoras constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental observados no Brasil.

1.7.1 Modo de ação do metil paration (MP)

Além de inibir a AChE, como os demais inseticidas OPs, o MP induz a modificação do potencial transmembrana em neuroblastomas humanos (CARLSOM & EHRICH, 1999) e inibi receptores nicotínicos em células neuronais de diferentes espécies (VAN DE BEUKIL et al., 1998). Por serem lipofílicos, os OPs malation, paration e metil paration são facilmente incorporados às membranas, levando a alterações químicas e físicas e a disfunções nas mesmas (VIDEIRA et al., 2001). O paration ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_5\text{PS}$) também é capaz de produzir danos nas mitocôndrias, nos retículos endoplasmáticos e na membrana nuclear em células de brânquias do linguado *Paralichthys olivaceus*, além de aumentar o número de lisossomos nestas células (LI & ZHANG, 2001). Esses mesmos autores descrevem que a cadeia de reações, através da qual o paration induz essa citotoxicidade celular, precisa ser examinada.

Neste sentido, SARAFIN & BREDESEN (1994) e PEÑA-LLOPIS et al. (2003) relataram que as ERO podem servir como mediadores da apoptose, ativando caspases (cisteína-proteases responsáveis por desencadear o processo de apoptose) em resposta às condições toxicológicas e patológicas. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos do MP sobre o estresse oxidante em peixes.

Geralmente, o processo de metabolização de xenobióticos ocorre no fígado e inclui as chamadas reações de Fase I e II. As reações da Fase I são responsáveis pela transformação do xenobiótico lipofílico em uma forma mais solúvel em água e mais tóxica, por meio de reações de oxidação, redução e hidrólise. As reações da Fase II são desintoxicadoras e responsáveis pela conjugação de xenobióticos a substratos endógenos como glicina, glutatona ou glucoronato, formando produtos hidrossolúveis não-tóxicos que podem ser rapidamente excretados. Assim, no caso dos OPs, as reações de biotransformação podem ser divididas basicamente em processos de ativação e de desintoxicação (JOKANOVIC et al., 2001).

As enzimas monooxigenases do citocromo P450 (CYPs) são as principais enzimas envolvidas na fase inicial (Fase I) do metabolismo xenobiótico, muitas vezes referido como uma biotransformação, para distingui-lo do metabolismo intermediário. As CYPs são capazes de catabolizar diferentes xenobióticos através de diferentes reações como dealquilação, carboxilação, hidroxilação e dessulfuração. Estas reações preparam o xenobiótico para a conjugação com grandes metabólitos hidrofílicos (Fase II) que, finalmente, promovem a sua excreção na urina. Os elétrons para esta reação são fornecidos pelo NADPH, por uma enzima redutase associada ao sistema do citocromo P450 (TIMBRELL, 2000).

O metabolismo oxidante do sistema P450 substitui o enxofre ($P = S$) da molécula de MP pelo oxigênio ($P = O$), mais eletronegativo, formando o paraoxon (SULTATOS, 1995). Isto aumenta a carga positiva no átomo de fósforo, tornando-o mais reativo frente à serina (Ser) da AChE. Portanto, o paraoxon é uma forma muito mais potente e tóxica que o metil paration. Além disso, a velocidade de hidrólise da enzima fosforilada é, geralmente, tão lenta que possivelmente a AChE seja degradada e substituída por uma nova enzima, sintetizada antes de ocorrer a liberação do fosfato. A substituição da AChE pode ocorrer com uma meia-vida de 10 a 30 dias, de tal modo que exposições repetidas a doses sub-tóxicas de organosfosforados podem produzir uma resposta acumulativa.

O paraoxon inibe a atividade da AChE agindo como pseudo-substrato ao imitar a forma da acetilcolina e formando um aduto covalente com o sítio ativo da Ser. A ligação covalente da Ser ao fosfato resulta na liberação do grupo residual de *p*-nitrofenol. Apesar

desta reação ser reversível, posteriormente ocorre a ligação irreversível do composto ao resíduo glutamí, fazendo com que o OP se ligue permanentemente a AChE, resultando em acúmulo da mesma na sinapse e supra-estimulação dos receptores da acetilcolina (ACh). O metil paration, o paration e o malation transformam-se em inibidores da AChE muito mais potentes após a oxidação, em uma reação catalisada pelas monooxigenases do CYPs (CARR et al., 1995). De acordo com CUNHA BASTOS et al. (1992), cerca de 6% do paration é biotransformado em paraoxon em homogeneizados de fígado (0,15 mg de proteína) do cascudo *Hypostomus punctatus*, incubados por duas horas com 0,5 ppm de paration. Mesmo que a quantidade de metabólitos formados nas reações de biotransformação seja baixa, as reações de ativação dos OPs podem produzir muitos compostos tóxicos e de importância significativa do ponto de vista toxicológico.

Muitas das isoenzimas da superfamília dos citocromos P-450 são capazes de gerar radicais livres de diversas maneiras. Até mesmo na ausência de indutores, como substratos xenobióticos, algumas isoenzimas P-450 são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio, incluindo $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (BONDY & NADERI, 1994). Essa taxa basal de produção de ERO pode aumentar significativamente pela ação de vários xenobióticos que atuem favorecendo esse “desacoplamento” ou induzindo a expressão dessas isoenzimas. A própria oxidação dos xenobióticos, como os OPs, pelas enzimas da família do citocromo P-450, pode resultar na produção de radicais livres (MYERS, 1997). Além desses, há outros sítios subcelulares produtores de ERO que podem ser induzidos por xenobióticos tais como: NADPH citocromo P-450 redutase, monooxigenases contendo flavina, NADH citocromo b_5 redutase, carboxilases, esterases, entre outros (JOKANOVIC et al., 2001). Adicionalmente, além da ACh, outros sistemas de neurotransmissores são afetados pela ação dos OPs, havendo a liberação de catecolaminas e de aminoácidos excitatórios (EAAs) (SOLBERG & BELKIN, 1997). Altas concentrações de EAAs são capazes de ativar os receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA), resultando num influxo de Ca^{2+} , que por sua vez, desencadeia a ativação de enzimas proteolíticas e a geração de radicais livres (BEAL, 1995).

Muitos pesticidas, incluindo os compostos organoclorados e os organofosforados, podem inibir a atividade e/ou alterar a expressão de várias isoformas de CYPs (HODGSON & LEVI, 1996). O paration, por exemplo, inativa a isoforma de CYP3A4 durante a sua biotransformação oxidativa (BUTLER & MURRAY, 1997). Estas mudanças podem aumentar a sensibilidade das células para reagir com metabólitos endógenos ou outros xenobióticos (TIMBRELL, 2000). Desta forma, foi postulado que a inibição da atividade desta CYP, por compostos organofosforados, poderia contribuir para o desenvolvimento do mal de Parkinson, através da formação de neurônios mais sensíveis aos metabólitos tóxicos dos

neurotransmissores, que são normalmente metabolizados pela CYP (LE COUTEUR et al., 1999).

A sensibilidade de um organismo aos compostos organofosforados é grandemente determinada pelas velocidades relativas da transformação oxidativa *versus* uma conversão hidrolítica para espécies menos tóxicas. De acordo com MANNERVIK & DANIELSON (1988), existem várias enzimas que apresentam a capacidade de metabolizar diversos xenobióticos, entre eles os pesticidas, proporcionando, desse modo, a sua desintoxicação. Dentre as enzimas encontradas na Fase II, envolvidas nos processos de desintoxicação, as GSTs desempenham um papel predominante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com a GSH como também por ligação não-covalente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas citotóxicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na dieta alimentar e na fumaça dos cigarros, impedindo a ligação destes ao DNA (LIEBLER & REED, 1997). A família das GSTs é composta por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que podem conjugar-se com moléculas hidrofóbicas e eletrofílicas. A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da glutatona com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, catalisada pela GST, tornam os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (EUBANKS, 1994; GUENGERICH, 2000).

Durante a desintoxicação do metil paration, a reação de conjugação com a GSH catalisada pela GST resulta na formação de S-metil glutatona e do mono-desmetil derivado do OP correspondente - mono-desmetil O-4-nitrofenil tiofosfato (MOTOYAMA & DAUTERMAN, 1980; JOKANOVIC et al., 2001).

1.8 Biomarcadores do estresse oxidante

O ambiente aquático está exposto a processos de poluição causados pelas substâncias químicas que podem atingi-lo. Estas substâncias, que podem ser produzidas pelo homem ou que podem ser de origem natural, são chamadas de xenobióticos e sua quantidade e variedade estão em contínuo aumento (LIVINGSTONE, 1993; 1998). Os padrões de acumulação de xenobióticos são diferentes e dependem do organismo, de características inerentes ao produto, da quantidade do produto disponível no meio e do balanço entre a taxas de assimilação, de metabolização e de eliminação.

Dadas estas diferenças nas formas de metabolizar os xenobióticos, existe uma necessidade de se detectar e avaliar o impacto de poluentes nos organismos expostos e

não somente avaliar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais. Esta necessidade origina o estudo e desenvolvimento de biomarcadores morfológicos, moleculares, bioquímicos ou fisiológicos que detectem efeitos biológicos nos organismos.

Várias definições são dadas ao termo biomarcador, que é geralmente utilizado num sentido amplo, incluindo qualquer medida que reflita uma interação entre o sistema biológico e um risco em potencial, que pode ser de natureza química, física ou biológica (WHO, 1993). Um biomarcador é definido como uma alteração na resposta biológica (em nível molecular, celular, fisiológico e até mesmo comportamental) que pode ser relacionada à exposição ou aos efeitos tóxicos de xenobióticos ou químicos ambientais (PEAKALL, 1994; VAN GESTEL & VAN BRUMMELEN, 1996).

Uma vez que o estresse oxidante está associado ao aparecimento de efeitos adversos, a identificação de biomarcadores e a quantificação do estresse oxidante podem constituir uma importante medida preventiva de alterações sistêmicas, bem como no tratamento de danos associados ao estresse oxidante. Entretanto, devido à instabilidade das ERO, os marcadores de estresse oxidante estão relacionados à quantificação das modificações nas biomoléculas que acompanham este estresse, em decorrência da elevação na formação das ERO, diminuição das defesas antioxidantes, ou na associação dessas duas condições.

Assim, desde que as ERO podem atuar em inúmeros componentes celulares, os metabólitos resultantes dessas ações específicas são freqüentemente utilizados como biomarcadores. Mecanismos bioquímicos envolvendo a desintoxicação celular são particularmente relevantes ao entendimento dos efeitos deletérios de vários poluentes ambientais (LOPEZ et al., 2001). Antioxidantes em peixes podem ser eficientes biomarcadores de exposição a poluentes aquáticos (BAINY, 1996; AHMAD et al., 2000). A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST), o ciclo redox da glutatona e o resultado do dano oxidante a lipídios (níveis dos produtos da peroxidação lipídica), ao DNA e a proteínas são os mais freqüentes biomarcadores de exposição usados nas avaliações ecotoxicológicas (DOYOTTE et al., 1997; ORUC et al., 2004) e no monitoramento da poluição ambiental (VALAVANIDIS et al., 2005). Uma das vantagens de se utilizar estes biomarcadores, de níveis baixos de organização biológica, é a possibilidade de detectar precocemente efeitos deletérios de poluentes, antes de serem evidenciadas alterações em níveis de organização biológica superiores.

LIVINGSTONE (1993) considera como biomarcadores os fluidos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes. Também considera como biomarcadores as respostas fisiológicas,

comportamentais ou energéticas dos organismos expostos. Existem, assim, biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes.

Em geral, os biomarcadores podem ser de três tipos: biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição podem ser utilizados para o monitoramento tanto ambiental (exposição ambiental) como biológico (dose de exposição) e são quaisquer alterações biológicas mensuráveis que evidenciem a exposição. Biomarcadores de efeito permitem identificar que tipos de danos estão associados aos radicais livres, como, por exemplo, a peroxidação de lipídios e danos ao DNA. Como monitores de efeitos, os biomarcadores podem integrar efeitos de múltiplos estressores e auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação. Já os biomarcadores de suscetibilidade permitem evidenciar grupos de indivíduos mais sensíveis. Os biomarcadores devem, portanto, apresentar elevada especificidade, refletir um único efeito, ser facilmente determinados e apresentar estreita relação dose-efeito (TIMBRELL, 1998; VAN der OOST et al., 2003).

Uma das principais finalidades da ecotoxicologia é avaliar os riscos ecológicos, o que, pela complexidade e diversidade dos sistemas naturais, é ainda uma tarefa difícil. Um novo paradigma e também desafio da ecotoxicologia é a identificação de "alvos ecológicos" - elementos ou sinais chaves que traduzam os processos de controle e suas alterações no ecossistema em risco. Embora estes "alvos" possam diferir entre os ecossistemas, uma vez identificados, a condição de normalidade pode ser avaliada por qualquer tipo de resposta biológica, seja ela bioquímico-celular, orgânica, de populações ou de comunidades. Um outro paradigma é a mudança na abordagem dos problemas ecológicos, que antes visavam reparar danos e/ou restaurar a vida e hoje visam, sobretudo, proteger/preservar o ecossistema. Nesta ótica de preservação, e por estarem relacionados às respostas primárias das células aos impactos recebidos do meio, os biomarcadores (bioquímicos e fisiológicos) são vistos como instrumentos eficientes de prevenção e de avaliação de riscos ecológicos.

1.9 A Espécie *Brycon cephalus*

Atualmente, o grande interesse da piscicultura em conhecer as condições ideais de cultivo e comercialização de espécies de interesse econômico, somado ao propósito de

diminuir a pesca predatória, vem propiciando uma nova opção de fonte protéica na alimentação e também uma nova forma de lazer nos pesque-pagues.

O gênero *Brycon* é representado por espécies comercialmente importantes e muito apreciadas pela população da Amazônia Central. *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae), conhecido popularmente por matrinxã (**Figura 13**), é uma espécie nativa das bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins (HOWES, 1982) e está distribuída no Brasil, Peru e Bolívia.

Ao longo do seu desenvolvimento, a pigmentação é caracterizada por ser mais escura na parte dorsal até o pedúnculo da cauda, enquanto os flancos e a parte ventral apresentam uma cor prateada intensa e todas as nadadeiras mostram-se pigmentadas de preto (ZANIBONI-FILHO & RESENDE, 1988).

O matrinxã é um peixe que apresenta comportamento migratório na época da reprodução, ou seja, de piracema, que apresenta desova total e em ambiente natural. Pode chegar a pesar 4 Kg e alcança a maturidade sexual com cerca de três anos de idade. A análise de seu trato intestinal revela uma grande quantidade de frutos e insetos (VAL & HONCZARYK, 1995).

Quando em cativeiro, é comum apresentar comportamento de canibalismo durante a fase larval (ANTECIO-GARCIA et al., 2003).

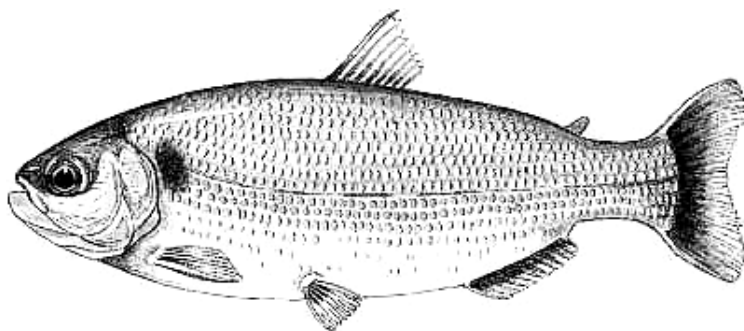


Figura 13: Representação de um exemplar de *Brycon cephalus*.

Esta espécie possui grande interesse comercial devido a excelente qualidade de sua carne, o rápido crescimento, e grande esportividade na pesca sendo, por isso, um peixe muito utilizado e procurado em sistemas de cultivo do tipo "pesque e pague" (CASTAGNOLLI, 1992; SCORVO FILHO et al., 1998). Além disso, possui hábito alimentar onívoro, o que lhe confere mais uma vantagem em sua utilização em sistemas de cultivo, pois aceita vários tipos de alimentos como rações comerciais e iscas.

Segundo MENDONÇA (1996), o desmatamento ciliar, a construção de barragens e a poluição são os principais responsáveis pelo desaparecimento dessa espécie em muitas regiões brasileiras.

Conforme a classificação de GODOY (1975), a espécie ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Bryconinae

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon cephalus* Günther, 1869

KUBITZA (1997) ressalva que é uma espécie pouco tolerante a situações de estresse, mostrando altos índices de descamação pelo corpo, o que aumenta a exposição a patógenos e parasitas externos, causando altas taxas de mortalidade. Portanto, torna-se de grande importância a determinação da suscetibilidade da espécie a pesticidas, como o metil paration, o qual é comumente utilizado tanto no controle de pragas da lavoura, acabando por contaminar ecossistemas aquáticos, como nos tanques de criação de peixes, para o controle de larvas de insetos predadoras. Neste cenário, é muito importante o conhecimento aprofundado de como este inseticida é capaz de afetar a fisiologia e, por consequência, a saúde dos peixes.

Em 1997, 5.300 toneladas de matrinxã foram capturadas no Brasil, sendo 70% deste valor capturado no estado do Amazonas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 1997). O comércio de matrinxã representa 7% do total de peixes consumidos nessa região, o que demonstra o grande impacto que a pesca causa nos estoques naturais. Neste contexto, a piscicultura pode surgir como uma alternativa viável à pesca e o matrinxã é uma espécie que vem sofrendo com o desconhecimento de técnicas apropriadas para seu cultivo, por ser bastante sensível. Desta forma, torna-se imprescindível buscar meios (como, por exemplo, o manejo de dietas) para otimizar o cultivo desta espécie e minimizar as dificuldades apresentadas pelos piscicultores como o uso de xenobióticos na tentativa de controlar pragas predadoras de alevinos.

1.10 Objetivos Gerais

Tendo em vista a importância da contaminação aquática por pesticidas, o uso indiscriminado do metil paration na aquicultura e o fato de que o dano oxidante pode ser o principal mecanismo da toxicidade de poluentes, o presente trabalho objetivou avaliar o comportamento dos sistemas de defesas antioxidantes em *Brycon cephalus* (matrinxã) expostos por 96 horas à concentração subletal de 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (metil paration 600 g.L⁻¹) e verificar o papel da suplementação de selênio na ração (1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração) nas respostas desses sistemas de defesa antioxidantes frente a exposição ao organofosforado. As hipóteses do trabalho foram:

Hipótese 1: A exposição ao metil paration altera os sistemas de defesas antioxidantes em *Brycon cephalus*.

Hipótese 2: As respostas apresentadas pelos sistemas de defesas antioxidantes de *Brycon cephalus*, em relação à exposição ao metil paration, diferem em relação aos níveis de selênio na dieta.

Hipótese 3: Há interação entre os níveis de metil paration e os níveis de selênio na dieta em relação às respostas apresentadas pelos sistemas de defesas antioxidantes de *Brycon cephalus*.

1.10.1 Objetivos Específicos

Para testar tais hipóteses, os peixes foram expostos por 96 horas a concentração subletal de 2 ppm da formulação comercial de MP (Folisuper 600 BR[®]) para o cumprimento dos seguintes objetivos específicos:

1. Determinação dos efeitos do MP sobre a produção de hidropéroxido de lipídios (determinada pela reação FOX) em músculo branco, fígado, brânquias, plasma e eritrócitos dos animais do grupo controle e do grupo exposto ao MP, independentemente do tipo de arraçoamento.
2. Determinação dos efeitos do MP sobre a concentração de glutatona reduzida em músculo branco, fígado, brânquias e sangue dos animais do grupo controle e do grupo exposto ao MP, independentemente do tipo de arraçoamento.
3. Determinação dos efeitos do MP sobre a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, GPx, GST e CAT) em músculo branco, fígado, brânquias, eritrócitos e plasma dos animais do grupo controle e do grupo exposto ao MP, independentemente do tipo de arraçoamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e Drogas

No presente trabalho, foi usada a formulação comercial do inseticida organofosforado metil paration (O, O-dimetil O-4-nitrofenil tiofosfato, $C_8H_{10}NO_5PS$) - Folisuper 600 BR[®] (metil paration 600 g.L⁻¹, Agripec). Todas os reagentes foram de procedência Sigma (St. Louis, MO, USA), CELM (São Paulo, Brasil) ou Merck (Darmsdat, Alemanha).

2.2 Animais

Os exemplares de matrinxã (*Brycon cephalus*), de ambos os sexos, foram cedidos pela Piscicultura Águas Claras (Mococa-SP), onde foram mantidos para crescimento em reservatórios artificiais, abertos e livres de poluição aquática. Os animais foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

Os alevinos, com peso de 3 a 6 g, ficaram estocados, no LZBC, em densidades de até 100 peixes por tanque. MARQUES et al. (2004) concluíram que a densidade de estocagem de 96 alevinos por m³ é a mais indicada para a espécie nesta faixa de peso, uma vez que nessa densidade obtiveram os melhores valores de biomassa total, conversão alimentar, ganho e uniformidade de peso dos matrinxãs, sem alterações nos parâmetros de sobrevivência.

Os animais ficaram em tanques de 1000 L com circulação de água sem cloro, termostatizada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), com aeração constante e sob fotoperíodo natural (~12h:12h), até alcançarem o peso apropriado para o uso nos experimentos (~ 30 g). Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados e se mantiveram aproximadamente constantes: pH 6,7 a 7,5; DO₂ 6,0 a 7,5 mg.L⁻¹; dureza 25 a 30 mg.L⁻¹ (como CaCO₃); alcalinidade 9,5 a 10,2 mg.L⁻¹ (como CaCO₃) e condutividade 65 a 72 $\mu\text{S.cm}^{-1}$.

2.3 Delineamento Experimental I

O primeiro lote de peixes permaneceu nas condições descritas anteriormente por 60 dias para a recuperação do estresse decorrente da coleta e do transporte, para a

aclimação às condições laboratoriais e também para o crescimento. Durante esse período, os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial pelo menos três vezes ao dia (**Tabela 4**).

IZEL et al. (2004) demonstraram que uma dieta contendo no mínimo 28% de proteína é necessária para garantir um maior ganho de peso, uma melhor conversão alimentar e mais alto crescimento corporal de *Brycon cephalus*. Desta maneira, o nível de 35% de proteína, presente na ração utilizada, atende satisfatoriamente às necessidades para esta espécie.

Após o período de aclimação, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (C, n = 10) e grupo exposto ao metil paration (Folisuper 600 BR[®], 600 g.L⁻¹) na concentração subletal de 2 mg.L⁻¹ (2 ppm) por 96 horas (MP, n = 10).

AGUIAR (2002) encontrou valores de CL₅₀ do metil paration 600 g.L⁻¹ (Folidol 600[®], Bayer) para juvenis de matrinxã, *Brycon cephalus*, de 6,54 ± 0,87 mg.L⁻¹ durante 96 horas de exposição. Segundo estes autores, a concentração de 2 ppm (~ 1/3 da CL₅₀) de metil paration foi suficiente para a inibição máxima da enzima AChE tanto no cérebro quanto no plasma, mostrando que este organofosforado tem toxicidade moderada para a espécie em questão. Além disso, a concentração de 2 ppm de Folisuper 600 BR[®], utilizada no presente estudo, é comumente empregada em tanques de cultivo de peixe (FIGUEIREDO & SENHORINI, 1990; SILVA et al., 1993).

As formulações comerciais do metil paration incluem aproximadamente 40% de solventes orgânicos, mas os fabricantes não informam sua composição exata. Entretanto, devido à utilização da formulação comercial do MP em vez de seu composto puro, tanto em pisciculturas quanto na agricultura, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do produto comercial e não só do seu ingrediente ativo. Assim, os possíveis efeitos de tais solventes orgânicos estão inclusos nos efeitos do metil paration propriamente dito.

Os animais tiveram a alimentação suspensa por 24 horas antes do início dos experimentos para evitar efeitos prandiais e prevenir deposição de fezes ao longo do ensaio. Em seguida, foram separados e transportados para caixas de marfinita no laboratório, para a realização do teste.

As caixas experimentais usadas na exposição tinham a capacidade de 250 L, temperatura controlada (24 a 26 °C) e aeração constante. Foram colocados 10 peixes em cada caixa, sendo mantida a relação de 1,0 a 1,5 g de peixe por litro de água. Os peixes permaneceram nas caixas por 12 horas para adaptação e após este período a água foi renovada e o organofosforado, adicionado. A água utilizada nas renovações das caixas experimentais era termostaticada e proveniente da mesma fonte de água dos tanques de aclimação dos peixes. Uma solução estoque de 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] feita com

esta água foi utilizada para a renovação da água da caixa experimental destinada à exposição ao MP.

As caixas experimentais eram escuras para evitar distúrbios externos que pudessem estressar os animais e cobertas com tampa escura para prevenir a volatilização do MP.

Tabela 3: Níveis de garantia por Kg do produto segundo fabricante (Fri-Acqua 35[®], Rações Fri-Ribe S.A.).

Ração comercial (Fri-Acqua 35[®]) (0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração)	
Composição bromatológica (%)	
Proteína bruta	35,00
Cinzas	11,00
Extrato etéreo	3,00
Fibra bruta	8,00
Cálcio	1,80
Fósforo	0,60
Umidade	9,50
Composição básica	
Farelo de soja, farelo de trigo, farinha de peixe, milho moído, cloreto de sódio, calcário calcítico, premix vitamínico mineral.	
Enriquecimento por Kg do produto	
Ácido fólico 1,5 mg; ácido pantotênico 30 mg; niacina 150 mg; biotina 0,15 mg; colina 225 mg; vit. B ₁ 9 mg; vit. B ₂ 12mg; vit. B ₆ 4,5 mg; vit. B ₁₂ 30 mcg; vit. A 4.500 UI; vit. K 9 mg; vit. D ₃ 4.500 UI; vit. C 300 mg; vit. E 90 UI; ferro 150 mg; iodo 7,5 mg; manganês 105 mg; zinco 225 mg e selênio 0,22 mg.	

Os peixes permaneceram em sistema semi-estático por 96 horas, onde a solução experimental de MP (solução estoque na concentração de 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] devidamente termostaticada) era renovada a cada 24 horas para manter a qualidade da água e ajustar a concentração do MP. O grupo controle foi submetido ao mesmo protocolo experimental, mas sem a adição de metil paration.

Durante este período, amostras de água foram coletadas para verificar os parâmetros físico-químicos - alcalinidade, dureza, pH, O₂ dissolvido, amônia, nitrito e temperatura - e a concentração de metil paration. A concentração do organofosforado era

ajustada sempre que necessário. Os efeitos subletais tais como, nível de atividade, padrão de natação e mudanças de coloração foram monitorados.

2.4 Delineamento Experimental II

O segundo lote de animais permaneceu nas mesmas condições de aclimação como descritas anteriormente. Entretanto, estes peixes foram divididos em dois tanques de 1000 L, onde permaneceram por 60 dias para a recuperação do estresse decorrente da coleta e do transporte, para a aclimação às condições laboratoriais e também para o crescimento.

Os peixes foram arraçoados *ad libitum*, ao longo de 60 dias, com dois tipos de ração peletizada. As rações experimentais foram elaboradas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, *campus* Lageado. Foram formuladas duas dietas isocalóricas (3.069 Kcal de Energia Digestível por Kg de ração), com 35% de proteína: ração livre de selênio e ração contendo 1,5 mg Se.Kg⁻¹ (**Tabela 4**). Esta formulação foi estabelecida com base nos níveis de qualidade da dieta comercial utilizada no protocolo experimental I, de maneira que os níveis nutricionais não fossem tão discrepantes entre os protocolos experimentais, reduzindo as possíveis interferências e fazendo com que a variação nos níveis de selênio fosse a maior responsável pelos prováveis efeitos.

O período de 60 dias foi suficiente para que os animais atingissem o tamanho aproximado daqueles utilizados no primeiro protocolo. POSTON et al. (1976) mostraram que a suplementação de selênio na dieta de *Salmo salar* por 30 dias foi suficiente para reverter à alta incidência de mortalidade em relação aos animais que receberam dieta livre de selênio.

Cabe ressaltar que os peixes chegaram ao Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da UFSCar com aproximadamente 4 a 6 g e 3 a 5 cm. Anteriormente, durante o período em que permaneceram nos tanques de alevinagem da estação de piscicultura, os peixes receberam dietas contendo “níveis recomendados” de todos os ingredientes, incluindo selênio, ou seja, ração comercial utilizada para a maioria dos peixes tropicais, pois há uma carência de estudos sobre exigências nutricionais para as diferentes espécies brasileiras.

Tabela 4: Composição percentual e química e análise bromatológica das dietas utilizadas no experimento com variação de níveis de selênio (Protocolo experimental II).

Ingredientes	Dietas Experimentais	
	Níveis de selênio das dietas (mg/Kg de peso seco)	
	0	1,5
Farinha de peixe 60%	10,00	10,00
Farelo de soja 46%	54,00	54,00
Farelo de trigo	20,00	20,00
Milho	11,50	11,50
Alginato	0,20	0,20
Calcário 38% cálcio	1,50	1,50
Fosfato bicálcico	0,82	0,82
Cloreto de sódio	0,10	0,10
Vitamina C 35%	0,10	0,10
BHT 99%	0,02	0,02
Óleo de soja	1,68	1,68
Supl vitam/mineral ⁽¹⁾	0,50	0,50
Selenito de sódio ⁽²⁾	0,00	0,00845
Total	100,00	100,00
Composição bromatológica		
Proteína Bruta (%)	35,91	35,77
Matéria seca (%)	96,89	96,67
Extrato etéreo (%)	4,12	4,10
Cinzas (%)	8,60	8,42
Fibra bruta (%)	7,11	7,57
Selênio (mg/Kg) ³	0,0024	1,32

¹ Suplemento Vitamínico e Mineral: Níveis de garantia por kg de premix (*Suprevit – SUPREMAIS*): ácido fólico 1.200 mg; pantotenato de cálcio 12.000 mg; vit B₁ 4.800 mg; vit. B₂ 4.800 mcg; vit B₆ 4.800 mg; vit. B₁₂ 4.800 mg; niacina 24.000 mg; vit. A 1.200.000 UI; vit. K 2.400 mg; vit D₃ 200.000 UI; vit C 48.000 mg; vit. E 12.000 mg; cobalto 2 mg; cobre 600 mg; ferro 10.000 mg; iodo 20 mg; manganês 4.000 mg; zinco 6.000 mg;

²Selenito de sódio (Na₂SO₃) - 0,18% ativo;

³Níveis de selênio obtidos por espectrometria de absorção atômica.

A suplementação com 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ ração foi escolhida baseada nos dados disponíveis na literatura, os quais relatam que a ingestão prolongada acima de 3 mg de Se.Kg⁻¹ de dieta em truta arco-íris é tóxica e prejudicial para seu desenvolvimento e saúde (HILTON et al., 1980). Além disso, outros estudos mostraram que dietas contendo concentrações de Se menores que 3 mg por Kg raramente produzem efeitos adversos em peixes e outros animais (MAIER & KNIGHT, 1994; USDOJ, 1998; DEFOREST et al., 1999). Desta forma, a metade da menor dose de selênio encontrada como prejudicial foi utilizada no presente trabalho para evitar os efeitos tóxicos do mineral.

Uma vez que o objetivo do trabalho não era encontrar o melhor nível de suplementação de Se para a espécie *B. cephalus*, não foram testados níveis progressivos de Se na ração. A escolha da concentração de 1,5 mg de Se visou assegurar que o nível escolhido não exibiria um efeito tóxico ao mesmo tempo em que seria consideravelmente superior àqueles utilizados normalmente nas rações industriais brasileiras destinadas à alimentação de peixes, as quais se baseiam em níveis nutricionais recomendados para espécies não nativas.

Depois de triturados, todos ingredientes foram pesados e homogeneizados e a massa final foi umedecida para ser peletizada. O selenito de sódio foi misturado manual e cuidadosamente ao premix e, em seguida, este premix foi muito bem misturado ao restante dos ingredientes secos. Após essa mistura manual, os ingredientes secos foram colocados em misturador automático a fim de evitar, ao máximo, as perdas do mineral, garantindo a sua suplementação mais próxima possível daquela desejada. Após a peletização, os grânulos foram secos a 55 °C, fracionados de forma a apresentarem o tamanho de 2 a 4 mm e armazenados a 4 °C. As dietas foram fornecidas *ad libitum*, pelo menos três vezes ao dia.

Após a aclimatação, os animais de cada tratamento (0Se e 1,5Se) foram divididos em dois grupos experimentais: controle (C, n = 10) e grupo exposto a concentração subletal de 2 mg.L⁻¹ (2 ppm) de metil paration 600 g.L⁻¹ (Folisuper 600 BR[®]) por 96 horas (MP, n = 10), de maneira a se obter os seguintes grupos experimentais simultaneamente:

- **C 0Se:** animais alimentados com ração contendo 0 mg de Se.Kg⁻¹ e não expostos ao Folisuper 600 BR[®]
- **C 1,5Se:** animais alimentados com ração contendo 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ e não expostos ao Folisuper 600 BR[®]
- **MP 0Se:** animais alimentados com ração contendo 0 mg de Se.Kg⁻¹ e expostos a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®]
- **MP 1,5Se:** animais alimentados com ração contendo 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ e expostos a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®]

Os procedimentos experimentais realizados durante a exposição ao organosfosforado foram os mesmos utilizados no procedimento experimental I.

Cabe ressaltar que os alevinos de matrinxã apresentam bom aproveitamento de ingredientes de origem animal e vegetal, sendo a farinha de peixe o ingrediente mais digestível, seguido do farelo de trigo (SALLUM et al., 2002).

2.5 Coleta de Amostras

Ao final dos protocolos experimentais, os animais foram coletados das caixas experimentais e uma amostra de sangue (1 a 2 mL) foi obtida por meio de punção da veia caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas, sendo então imediatamente sacrificados por secção medular. O sangue foi centrifugado a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C para a obtenção do plasma e dos eritrócitos, que foram lavados e hemolisados de acordo com os procedimentos descritos posteriormente.

Os animais foram mortos por transecção da coluna espinal e o fígado, as brânquias e uma amostra de músculo branco foram coletados para posterior análise dos parâmetros bioquímicos. Os tecidos foram lavados em salina 0,9% para retirada de impurezas, secos superficialmente com papel filtro. Os tecidos, o plasma e os hemolisados foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C.

Não foi utilizado qualquer tipo de anestésico durante a coleta de sangue e tecidos pelo fato destas drogas causarem alterações na atividade das enzimas antioxidantes, especialmente a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (WDZIECZAK et al., 1982).

O peso e o comprimento total dos animais e o peso do fígado foram medidos e o índice hepático-somático [IHS = (peso do fígado/peso do peixe) x (100)] foi calculado após a biometria.

2.6 Determinação das Características Físicas e Químicas da Água

2.6.1 pH e alcalinidade

Amostras de 100 mL de água foram coletadas das caixas experimentais, transferidas para um Becker e mantidas sob agitação para a determinação do valor do pH da água. A determinação da alcalinidade foi efetuada de acordo com as técnicas descritas por GOLTERMAN & CLIMO (1969) utilizando-se ácido sulfúrico 0,01 N como indicador da

alcalinidade, para titular até o pH 4,0. Para o cálculo da alcalinidade das amostras, em mg.L^{-1} de carbonatos e bicarbonatos, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{ALCALINIDADE (mg CaCO}_3\text{.L)} = (\text{mL de H}_2\text{SO}_4) \times N \times \text{Eq/volume da amostra (mL)}$$

N = normalidade do H_2SO_4

Eq (equivalente do H_2SO_4) = 50.000

2.6.2 Dureza total

A análise de dureza foi feita por titulação das amostras de água, previamente tamponadas com EDTA, até o ponto de viragem de lilás para azul, usando-se como indicador o Eriocromo Negro (ADAD, 1982). Para o cálculo da dureza, em $\text{mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}$, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{DUREZA (mg CaCO}_3\text{.L)} = \text{EDTA}_{(\text{mL})} \times 1000/\text{AMOSTRA}_{(\text{mL})}$$

2.6.3 Nitrito

O nitrito foi determinado segundo SIPAÚBA-TAVARES (1994). Em amostras de 5 ml de água coletada dos tanques experimentais, foi adicionado 0,1 mL de sulfanilamida 58,07 mM em HCl 10%. Em seguida, as amostras foram agitadas e após 10 minutos adicionou-se 0,1 mL da solução bicloridrato de N-naftaleno-diamina 3,86 mM. O produto da reação de coloração rosa escuro foi determinado colorimetricamente em comprimento de onda (λ) de 300 nm. A concentração de nitrito, em mg.L^{-1} , foi estimada a partir de uma curva-padrão feita com nitrito de sódio (NaNO_2).

2.6.4 Amônia

A amônia foi determinada pelo método de Nessler (GREENBERG et al., 1976), utilizando-se 2 mL de amostra de água e 0,5 mL de reativo de Nessler. Após 20 minutos à temperatura ambiente, a leitura óptica foi realizada em $\lambda = 420$ nm. Os valores de amônia foram expressos em mg.L^{-1} e estimados a partir de curva-padrão feita com cloreto de amônia (NH_4Cl).

2.6.5 Oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura

A temperatura (°C) da água nos tanques experimentais foi tomada periodicamente e os parâmetros oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) e condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) foram determinados por processo eletrométrico utilizando-se o aparelho Check Mate II Corning, efetuados no próprio tanque de teste.

2.6.6 Concentração de metil paration na água

As concentrações de metil paration na água dos tanques experimentais foram monitoradas espectrofotometricamente em $\lambda = 300 \text{ nm}$. Foi feita uma análise de varredura e observou-se um pico de absorção em 300 nm para o produto utilizado (Folisuper 600 BR[®], metil paration 600 g.L^{-1} , Agripec). As concentrações de metil paration na água foram definidas por meio de uma curva-padrão de concentração de metil paration previamente determinada (**Apêndice 1**). De acordo com as leituras obtidas e sempre que necessário, a concentração de metil paration na água dos tanques experimentais era devidamente corrigida seguindo a curva-padrão.

2.7 Procedimentos Bioquímicos

Os tecidos congelados foram rapidamente amostrados sobre superfície gelada e pesados em quantidades apropriadas para as determinações enzimáticas.

Para as análises das atividades das enzimas SOD, CAT, GPx e para determinação dos níveis de hidroperóxido de lipídio e de GSH, foram mantidas as proporções de 100 mg de tecidos por mL de tampão de homogeneização (tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, conforme PEREIRA et al., 1998) e, para a análise da atividade da GST, 200 mg de tecidos por mL de tampão (tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, conforme KEEN et al., 1976).

Em seguida, essas amostras foram homogeneizadas a 18.000 rpm (Homoginizador Turratec TE 102, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) em dois “*strokes*” de 30 segundos, sob banho de gelo. Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 13.500 rpm por 30 minutos a 4 °C para a obtenção do sobrenadante, que foi usado para as análises bioquímicas (AHMAD et al., 2000).

Os sobrenadantes, mantidos no gelo, foram utilizados para a determinação da concentração de proteínas solúveis, hidroperóxido de lipídio (HP) e de GSH e para os

ensaios das enzimas SOD, CAT, GST e GPx. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Spectronic Genesys 5. (Milton Roy Co., Rochester, NY, USA) a 25 °C.

2.7.1 Preparação do hemolisado

Após a remoção do plasma por centrifugação, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina (NaCl 1%) e os hemolisados foram obtidos a partir da adição de três volumes de tampão TRIS-HCl 20 mM pH 8,0 e posterior centrifugação a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (WILHELM-FILHO, 1996). O sobrenadante foi utilizado para as análises enzimáticas (SOD, CAT, GPx) e para a avaliação dos níveis endógenos de peroxidação lipídica (HP). Nenhuma atividade da GST nos hemolisados foi detectada com a técnica utilizada para os ensaios nos tecidos.

No plasma, foram analisadas as atividades da SOD, GPx e os níveis de HP, uma vez que a CAT está presente em altos níveis, principalmente nos eritrócitos (AEBI, 1974).

Durante as análises, os hemolisados bem como o plasma, foram descongelados e mantidos no gelo para evitar perdas das atividades enzimáticas e a oxidação de lipídios.

2.7.2 Determinação de proteína total

O teor de proteína total dos tecidos foi determinado segundo o método clássico de Bradford com Coomassie Brilliant Blue G-250 (BRADFORD, 1976), adaptado para leitura em microplaca (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK) conforme descrito por KRUGER (1994), utilizando-se albumina bovina como padrão. Os valores de proteína total foram utilizados para expressar as atividades específicas das enzimas. A absorbância das amostras foi medida em $\lambda = 595$ nm.

2.7.3 Determinação de hemoglobina total (Hb)

Na determinação de hemoglobina total, 10 μ L de sangue foram adicionados a 2 mL de solução de Drabkin (0,5 g de KCN, 1,4 g de KH_2PO_4 e 2,0 g de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ para 1 L de água destilada q.s.p.). A leitura do produto resultante foi realizada em $\lambda = 540$ nm (DRABKIN, 1948) e o cálculo da concentração foi realizado a partir de uma curva-padrão feita com padrão de hemoglobina da Labtest (Minas Gerais, Brasil). Os valores de

hemoglobina foram utilizados para expressar as atividades específicas das enzimas intraeritrocitárias.

2.7.4 Determinação dos níveis de hidroperóxido de lipídios (HP)

Os hidroperóxidos de lipídios são indicadores do processo de peroxidação lipídica (LPO). A peroxidação lipídica foi quantificada pelo método FOX (“Ferrous Oxidation-Xylenol orange”) como descrito por JIANG et al. (1992). O método FOX é baseado na oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal) a Fe^{3+} pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe (III), o alaranjado de xilenol. Cerca de 100 μL de amostra (previamente tratada com TCA 10%) foi incubada durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com 900 μL de mistura reativa contendo 100 μM de alaranjado de xilenol, 250 μM de FeSO_4 (sulfato ferroso amoniacal), 25 mM de H_2SO_4 e 4 mM de butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol 90% (v/v). O Fe^{3+} formado na presença de hidroperóxidos reage com alaranjado de xilenol formando um composto colorido com um pico de absorção em 560 nm, comprimento de onda em que as leituras foram realizadas no espectrofotômetro. Para o cálculo foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ do complexo Fe^{3+} -alaranjado de xilenol para H_2O_2 , hidroperóxido linoleico ou butil hidroperóxido (JIANG et al., 1991). Os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxido de lipídio por mg de proteína ou de hemoglobina.

O processo de LPO ocorre em diversas etapas, com inúmeras possibilidades de reações químicas, conforme elucidado anteriormente, dificultando sua compreensão e avaliação. Por isso, ainda não existe um método considerado ideal para avaliar a LPO (LIMA et al., 2002). O método do “Xilenol orange” é simples, não exige equipamentos sofisticados, os resultados são reprodutíveis e avalia efetivamente o conteúdo de hidroperóxidos de lipídios em extratos de tecidos (HERMES-LIMA et al., 1995). Outros métodos de avaliação da peroxidação lipídica, como o conhecido ensaio TBARS, quantificam os produtos finais da cadeia de peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA). O ensaio FOX apresenta uma boa correlação com o ensaio TBARS (STOREY, 1996).

2.7.5 Determinação da atividade da superóxido dismutase total (SOD)

A atividade da SOD foi determinada com base na capacidade desta enzima em inibir a redução do “Nitro Blue Tetrazolium”, NBT (CROUCH et al., 1981), causada pelo fluxo

de ânion superóxido gerado pela hidroxilamina em solução alcalina (OTERO et al., 1983). O sal solúvel amarelo oxidado de NBT é reduzido pelo ânion superóxido, produzindo o composto formazan azul-escuro, que tem pico de absorção em $\lambda = 560$ nm. A adição de superóxido dismutase (SOD) inibe a velocidade de redução do NBT, uma vez que a SOD dismuta o $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 . A atividade da enzima foi medida em meio contendo tampão carbonato de sódio 0,5 M (pH 10,2), EDTA 2,0 mM, NBT 1,2 mM e extrato enzimático diluído 1:10. Para a determinação da atividade da SOD nos eritrócitos, os hemolisados foram tratados com um mistura de clorofórmio/etanol (3:5 v/v) para precipitar a hemoglobina. O ferro interfere na redução do NBT e a porcentagem máxima de inibição da redução pode ser subestimada e, conseqüentemente, a atividade da SOD também (SPITZ & OBERLEY, 1989). A reação foi realizada no escuro uma vez que o NBT é fotossensível.

A taxa de redução do NBT do controle, caracterizado pela ausência de amostra e contendo uma mistura hidro-alcóolica (álcool etílico) de 4:1, foi usada como referência. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do NBT. A atividade da SOD foi expressa em unidades por mg de proteína ou de hemoglobina.

2.7.6 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida pela avaliação contínua do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em $\lambda = 240$ nm (AEBI, 1974). A diminuição na absorbância foi registrada durante 17 segundos em cubeta contendo uma solução recém preparada de H_2O_2 15 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e amostra do extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição da solução de H_2O_2 .

Na avaliação da atividade da CAT, os hemolisados foram diluídos 200 vezes em tampão TRIS-HCl enquanto que as amostras de tecido foram diluídas 10 vezes em salina 0,9%. Os valores de CAT foram expressos em Unidades de Bergmeyer (U.B.) por mg de proteína ou de hemoglobina para efeito da comparação com os dados existentes na literatura, que em sua maioria, estão expressos em U.B. Uma U.B., de acordo com Bergmeyer, é a quantidade de CAT que libera a metade do oxigênio de uma solução de peróxido de hidrogênio de qualquer concentração no intervalo de tempo de 100 segundos a 25 °C. Segundo WILHELM-FILHO et al. (1993), nessas condições, 1 nmol de CAT equivale a 33 U.B.

2.7.7 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx Se-dependente foi analisada de acordo com procedimento 2 de MILLS (MILLS, 1959) modificado por HAFEMAN et al. (1974).

A GPx degrada H_2O_2 na presença de GSH, depletando-a. A atividade da GPx é medida indiretamente pela diminuição da quantidade de GSH, avaliada pela reação da GSH com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A reação da GSH com o DTNB gera o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de coloração amarela, cuja leitura é realizada em $\lambda = 412$ nm. A mistura contendo tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 7,0), EDTA 80 mM, 1mM de NaN_3 , 0,4 mM de GSH, 0,25 mM de H_2O_2 e alíquota do extrato enzimático foi incubada a 37 °C. Após 3 min, uma alíquota dessa mistura foi removida e tratada com reagente de precipitação (1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,2 g de EDTA e 30 g de NaCl para 100 mL de água destilada q.s.p.). A GSH, nesse filtrado livre de proteína, foi determinada usando 0,4 M de Na_2HPO_4 e 1 mM de DTNB em citrato trissódico 1%. Um branco foi simultaneamente carregado com as amostras, uma vez que ocorre uma oxidação não enzimática da GSH pelo H_2O_2 durante a incubação.

Uma unidade da GPx foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μ g de GSH por minuto (LATHA & PARI, 2004). A atividade da GPx foi expressa em unidades por mg de proteína.

2.7.8 Determinação da atividade da glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida de acordo com HABIG et al. (1974), usando-se 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A mistura de reação continha 1 mM de CDNB em etanol, 1mM de GSH, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 e extratos enzimáticos. A formação do aduto glutathiona-2,4-dinitrobenzeno foi monitorada pelo aumento da absorbância em 340 nm contra um branco. O coeficiente de extinção molar do CDNB de 9,6 $mM^{-1}.cm^{-1}$ foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática. A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 nmol de produto por minuto por mg de proteína ou de hemoglobina.

A maioria dos estudos determina a atividade total da GST usando o substrato artificial CDNB, que é conjugado com todas as isoformas da GST com exceção da classe q (GEORGE, 1994; VAN der AAR et al., 1996).

2.7.9 Determinação do conteúdo de glutatona reduzida (GSH) no sangue e nos tecidos

A concentração de glutatona reduzida no sangue e nos tecidos foi medida de acordo com a metodologia de BEUTLER et al. (1963), usando o reativo de Elmann (ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzoico – DTNB) adaptada por WILHELM-FILHO (1996) e WILHELM-FILHO et al. (2005).

Amostras de sangue, imediatamente após a coleta, foram tratadas com TCA 30% na razão 1:3 e os sobrenadantes dos homogeneizados dos tecidos foram tratados com TCA 12% na proporção 1:1. Após o tratamento com TCA, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 15 min a 4 °C, para precipitar as proteínas, e os sobrenadantes foram usados para análise do conteúdo de GSH. Aos sobrenadantes dos extratos ácidos foram adicionados 0,25 mM de DTNB em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 na proporção 1:4 para o sangue e 1:1 para os tecidos. A formação do ânion tiolato, que resulta da reação da GSH com o reativo de Elmann, foi determinada em espectrofotômetro a $\lambda = 412$ nm. O coeficiente de extinção molar de $13,6 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ da GSH nessas condições foi utilizado no cálculo da concentração da GSH nos tecidos ($\text{nmol}\cdot\text{mg prote\u00edna}^{-1}$) e no sangue (mM).

Uma vez que existem métodos mais sensíveis disponíveis para a determinação do conteúdo de GSH nos sistemas biológicos, em paralelo ao método espectrofotométrico de determinação da GSH descrito acima, o conteúdo de GSH nos tecidos dos animais do protocolo experimental I também foi analisado por HPLC (Waters 464 Pulsed Electrochemical Detector, Milford, MA, USA) (Hiraku et al, 2002).

Amostras do tecidos foram homogeneizados (1:10 w/v) em tampão acetato de sódio 10 mM (pH 6,5) contendo 10 μM de DPTA e Tween 20 a 0,5% e, em seguida, foram desproteinizados com 1 volume de TCA 10% e centrifugadas a 11.000 rpm por 10 min a 4°C. Alíquotas de 25 μL foram injetadas no sistema de HPLC e analisadas por detecção eletroquímica, usando o detector eletroquímico 247 Waters equipado com um eletrodo de ouro. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna X-Terra (4,5 x 250 mm, 5 μm) e tampão fosfato de potássio 100 mM pH 2,5 contendo 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de heptanossulfonato de sódio e 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de EDTA em metanol 1% (v/v) como fase móvel (fluxo de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). A GSH foi identificada e quantificada por detecção eletroquímica (potencial de oxidação de 600 mV) e comparada com concentrações conhecidas de padrão de GSH sob as mesmas condições cromatográficas. O conteúdo de GSH foi expresso em $\text{nmol}\cdot\text{mg prote\u00edna}^{-1}$.

A comparação entre os dois métodos acima citados revelou uma boa reprodutibilidade. Normalizando-se os valores obtidos para o parâmetro em questão de mesmos grupos de animais em ambas as técnicas, nenhuma diferença significativa nos

resultados obtidos pelos dois métodos foi observada. Por isso, no segundo experimento, a análise espectrofotométrica foi utilizada para determinar o conteúdo de GSH nos tecidos, pela simplicidade e praticidade em relação à determinação por HPLC. A comparação entre as duas técnicas encontra-se no **Apêndice 2**.

2.7.10 Determinação da concentração de selênio (Se) nos tecidos e na ração

A determinação de selênio foi feita no Centro de Apoio Químico ao Ensino, à Pesquisa e de Prestação de Serviços (CEAQUIM), serviço auxiliar anexo ao Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, campus Rubião Júnior.

A análise de selênio foi realizada de acordo com WELZ et al (1992) e ROSA et al. (2002), utilizando-se espectrômetro Shimadzu AA 6800 (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., EUA).

As amostras de tecidos de peixe e de ração foram mineralizadas em forno de microondas. Neste procedimento, cerca de 100 mg de amostra foram transferidas diretamente para os frascos de teflon do forno de microondas, adicionando-se em seguida 2,5 mL de ácido nítrico suprapuro 14 mol.L⁻¹ mais 0,50 mL de peróxido de hidrogênio 30% m/m. O programa de aquecimento utilizado encontra-se descrito na **Tabela 5**.

Tabela 5: Programa de aquecimento utilizado na mineralização das amostras de ração e de tecidos de matrinxã em forno de microondas.

Etapas	Potência (W)	Tempo (min)
1	200	1
2	0	1
3	400	3
4	500	3
5	700	3
6	Ventilação	3

Após a etapa de mineralização das amostras, o volume final dos extratos ácidos foram acertados para 10 mL com água destilada. Em seguida, 10 μL das amostras acrescidas de 2 μL de solução 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrato de paládio foram injetados dentro do tubo de grafite pela micropipeta do auto-amostrador do espectrômetro. O programa de aquecimento do tubo de grafite utilizado nas determinações encontra-se descrito na **Tabela 6**.

Tabela 6: Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de Se em de amostras de ração e de tecidos de matrinxã.

Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (seg)		Fluxo de Argônio ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)
		Rampa	Patamar	
Secagem	90	10	0	1
Secagem	150	10	5	1
Pirólise	1400	10	20	1
Pirólise	1400	5	10	1
Atomização	2300	1	5	0
Limpeza	2600	5	0	1

2.8 Tratamento Estatístico dos Dados.

Os valores de todas as determinações foram expressos em média \pm E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas. Os seguintes procedimentos foram adotados no presente estudo:

- Teste-t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade, para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais (controle e metil paration) em cada tipo de arraçoamento (GraphPad InStat v. 3.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

- Análise de variância Fatorial ou ANOVA “two-way”, com interação envolvendo dois critérios de classificação: três níveis de selênio na ração (tratamentos) e duas concentrações de metil paration na água (experimentais), ou seja, análise fatorial 3x2. A análise estatística Two-Way verificou se as médias dos diferentes tipos de tratamento (0,0, 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração), independentemente da concentração de metil paration na água, e as médias dos grupos experimentais (Controle ou 2 ppm de metil paration), independentemente do tipo de arraçoamento, foram ou não estatisticamente iguais. Esta análise também estabeleceu se os grupos experimentais são afetados ou não pelos tratamentos, uma vez que estes fatores podem ou não estar interagindo. A ANOVA two-way foi complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para a identificação das diferenças específicas, verificando a existência de possíveis interações significativas entre os valores de um mesmo tratamento com os diferentes protocolos experimentais ou entre tratamentos diferentes dentro de um mesmo protocolo experimental (SigmaStat v. 2.00, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).
- Análise de correlação entre as diversas variáveis determinadas, para avaliar o grau de associação entre dois conjuntos de escores referentes a um grupo de indivíduos e cuja significância foi determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson (GraphPad InStat v. 3.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3 RESULTADOS

3.1 Protocolo Experimental I

Todos os peixes de ambos os grupos experimentais (C - controle - e MP - exposição a 2 ppm de Folisuper 600 BR®) sobreviveram. As análises da qualidade da água estão apresentadas na **Tabela 7**, expressas como média dos valores obtidos a partir das amostras de água coletadas ao longo do período experimental. A adição de metil paration na água resultou em aumento no pH, na alcalinidade, dureza e na concentração de amônia e nitrito.

Tabela 7: Características físicas e químicas da água controle e com 2 ppm de Folisuper 600 BR®, medidas ao longo do período experimental. Os valores são médias \pm E.P.M. das quatro amostras de água coletadas a cada 24 horas de experimento.

	Controle	Metil paration
pH	6,95 \pm 0,11	8,26 \pm 0,26 *
Temperatura (°C)	23,53 \pm 0,13	23,07 \pm 0,30
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	5,88 \pm 0,18	5,95 \pm 0,01
Amônia (mg.L ⁻¹)	0,025 \pm 0,01	0,43 \pm 0,06 *
Nitrito (mg.L ⁻¹)	--	0,005 \pm 0,001
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	19,76 \pm 0,44	30,65 \pm 0,46 *
Dureza (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	27,00 \pm 0,81	45,00 \pm 1,04 *
Condutividade elétrica (μ S.cm ⁻¹)	68,5 \pm 2,85	73,00 \pm 3,40
Metil paration (mg.L ⁻¹) ¹	---	2,19 \pm 0,20

¹Valores obtidos através da análise espectrofotométrica. De acordo com as leituras obtidas, a concentração de metil paration na água era ajustada quando necessário.

--- = não detectado.

* indica diferença significativa em relação à água do controle com 95% de confiança.

Quando comparados com o controle, os peixes expostos ao metil paration mostraram movimentos letárgicos, redução da atividade natatória e perda parcial de reflexos.

Observações macroscópicas tais como descoloração, hemorragias e perda de consistência do fígado sugerem lesões degenerativas e necrose deste órgão. Diferenças significativas foram observadas no peso dos fígados e no índice hepático-somático (IHS). No grupo exposto ao MP, estes parâmetros foram significativamente inferiores àqueles apresentados pelos peixes do grupo controle (30% e 10%, respectivamente). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas no tamanho corpóreo de ambos os grupos experimentais (**Tabela 8**).

Tabela 8: Valores médios \pm E.P.M. dos parâmetros biométricos de matrinxãs do grupo controle e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®].

	Controle	Metil paration
Massa corporal (g)	25,40 \pm 1,95	25,83 \pm 2,04
Massa hepática (g)	0,27 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01 *
IHS (%)	0,96 \pm 0,04	0,84 \pm 0,03 *

* indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança.

No fígado, a exposição ao MP por 96 horas induziu um aumento significativo nas atividades da SOD, CAT e GST (20%, 101% e 34%, respectivamente) e uma diminuição também significativa no conteúdo de GSH (48%) em relação ao grupo controle. Nenhuma diferença foi observada nos níveis de HP e na atividade da GPx, neste órgão, entre o grupo controle e o exposto ao metil paration (**Figura 14**).

As atividades da SOD, CAT e GST aumentaram significativamente no músculo branco (41%, 151% e 57%, respectivamente) e nas brânquias (28%, 35% e 57%, respectivamente) após a exposição ao metil paration. Entretanto, no músculo branco e brânquias, houve uma redução significativa na atividade da enzima GPx (36% e 45%, respectivamente) e no conteúdo de GSH (44% e 36%, respectivamente) nos peixes expostos ao MP em relação aos peixes controle. Os peixes expostos ao MP também mostraram um aumento significativo nos níveis de HP nas brânquias e no músculo branco (57% e 64%, respectivamente), quando comparados aos valores apresentados pelos peixes do grupo controle (**Figuras 15 e 16**).

Em relação ao grupo controle, nos eritrócitos dos peixes expostos ao MP, houve um aumento significativo nas atividades da SOD (93%) e da CAT (140%) e nenhuma diferença foi observada para os níveis de HP e para a atividade da GPx intraeritrocitários. Ocorreu uma diminuição significativa no conteúdo sanguíneo de GSH (41%) após a exposição ao MP (**Figuras 17**).

Por outro lado, no plasma houve um aumento significativo da peroxidação lipídica (361%), mas não foi constatada nenhuma alteração nas atividades da SOD e GPx após a exposição ao MP (**Figuras 18**).

A idéia de injúria celular induzida pela ocorrência de uma potencialização na produção das ERO pode ser confirmada através da razão HP/CAT+GPx. Essa relação estabelece o balanço entre a injúria celular (peroxidação lipídica), induzida pelas ERO, e os principais sistemas antioxidantes (CAT e GPx) que são capazes de neutralizar as ERO ou os intermediários responsáveis pelo respectivo dano. O aumento nessa razão indica que uma quantidade substancial de peróxidos tenha sido formada a partir da ação catalítica da SOD, o que por sua vez desencadearia a cascata de peroxidação lipídica. As relações para cada tecido de ambos grupos experimentais encontra-se na **Tabela 9**. Esta razão sofreu aumentos de cerca de 2,5 vezes no músculo branco, 2,8 vezes nas brânquias e 4,5 vezes no plasma dos peixes expostos ao MP, quando comparados ao controle. Não houve alteração na razão HP/CAT+GPx no fígado e nos eritrócitos entre ambos os grupos experimentais (**Tabela 9**).

Tabela 9: Razão HP/CAT+GPx para os diferentes tecidos de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h.

	HP/CAT+GPx	
	Controle	Metil paration
Fígado	0,009	0,010
Músculo branco	0,008	0,020
Brânquias	0,013	0,036
Eritrócitos	0,031	0,025
Plasma ¹	0,020	0,090

¹Para plasma não há medida da catalase e, portanto, a relação é HP/GPx

Os valores médios \pm E.P.M., mostrados nas **Figuras 14 a 18**, são apresentados nas **Tabelas 13 a 17**.

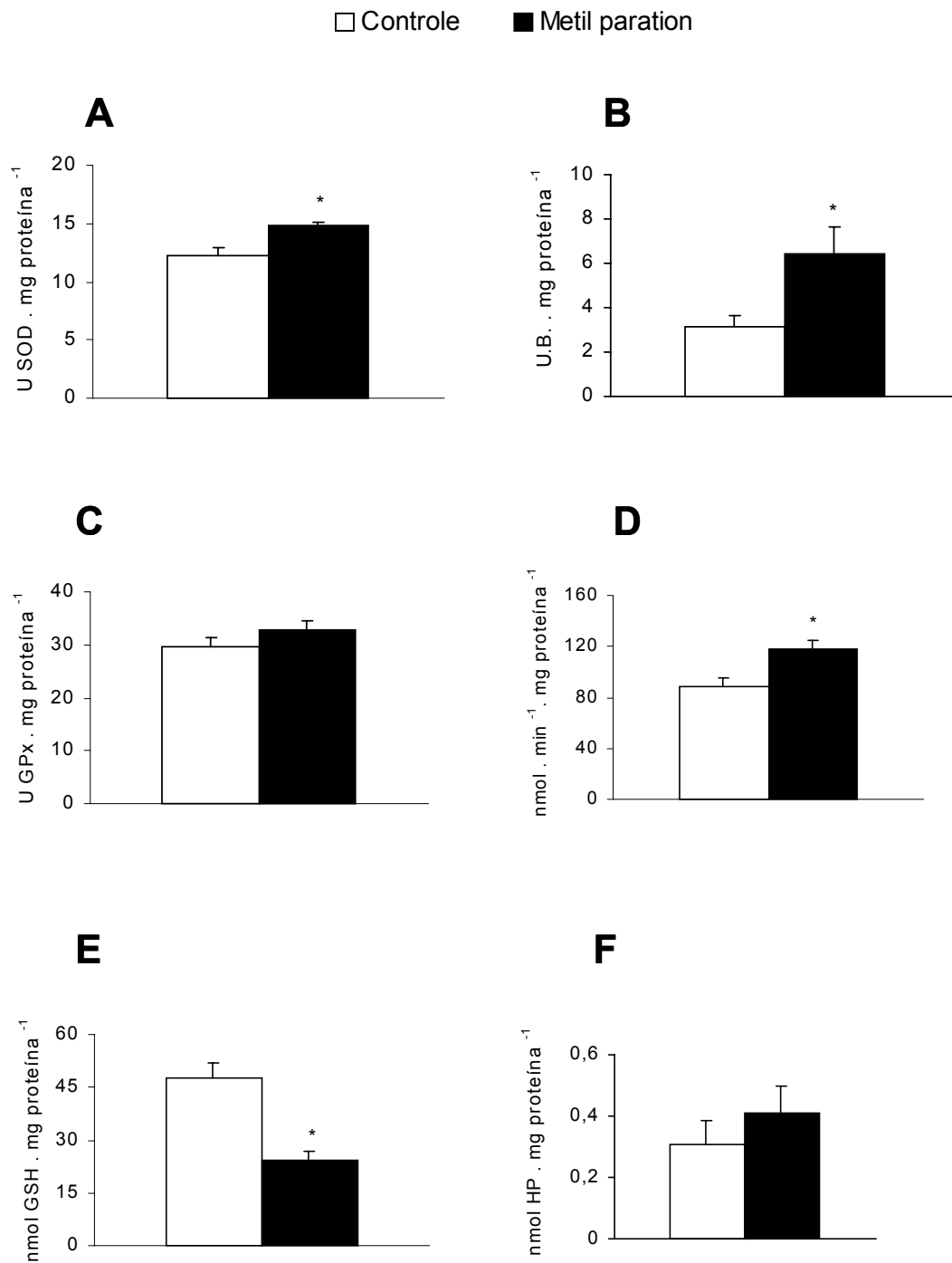


Figura 14: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados em fígado de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR® (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutatona peroxidase (GPx); D: glutatona S-transferase (GST); E: glutatona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias \pm E.P.M.

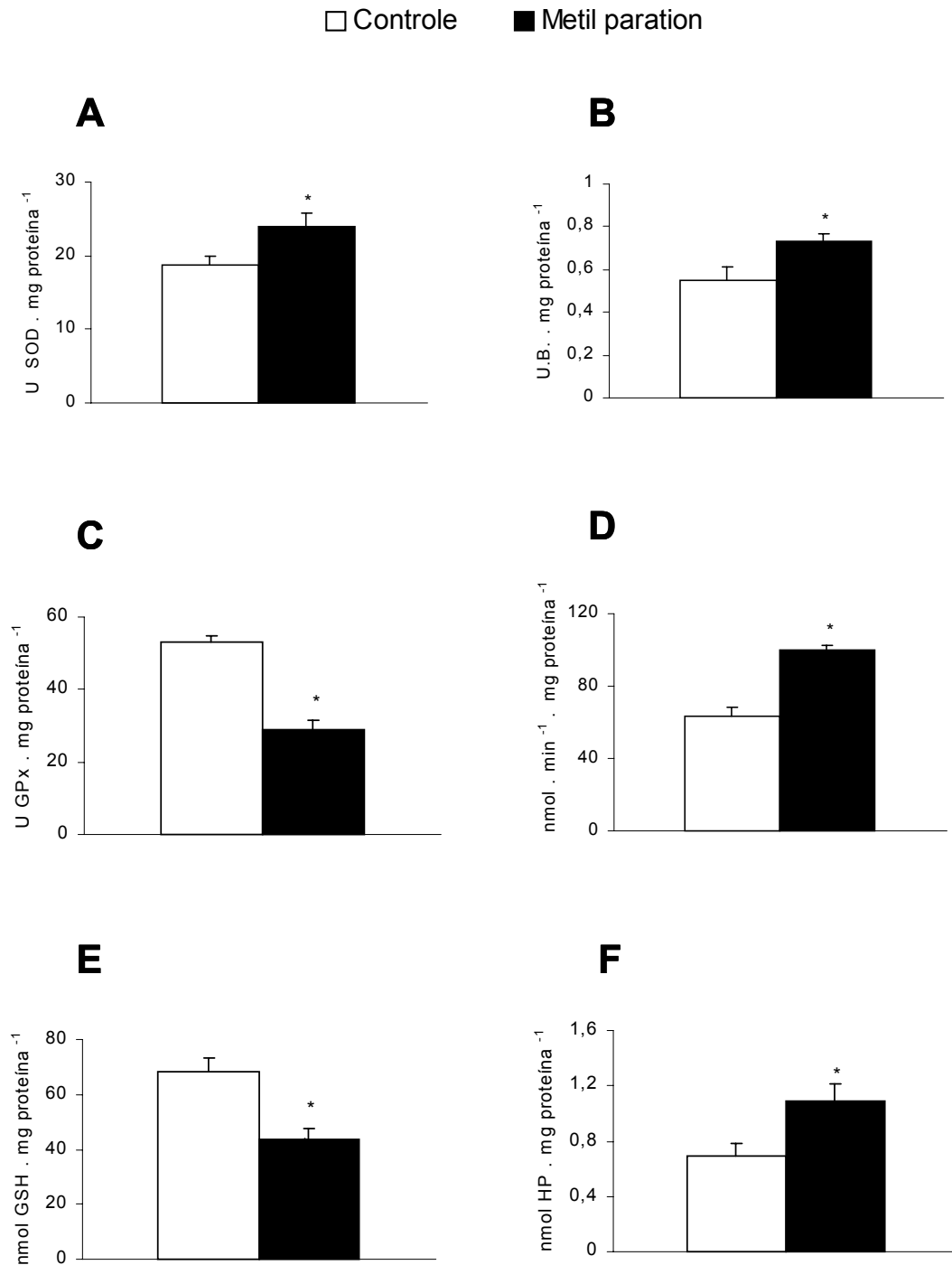


Figura 15: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados em músculo branco de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutaciona peroxidase (GPx); D: glutaciona S-transferase (GST); E: glutaciona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.

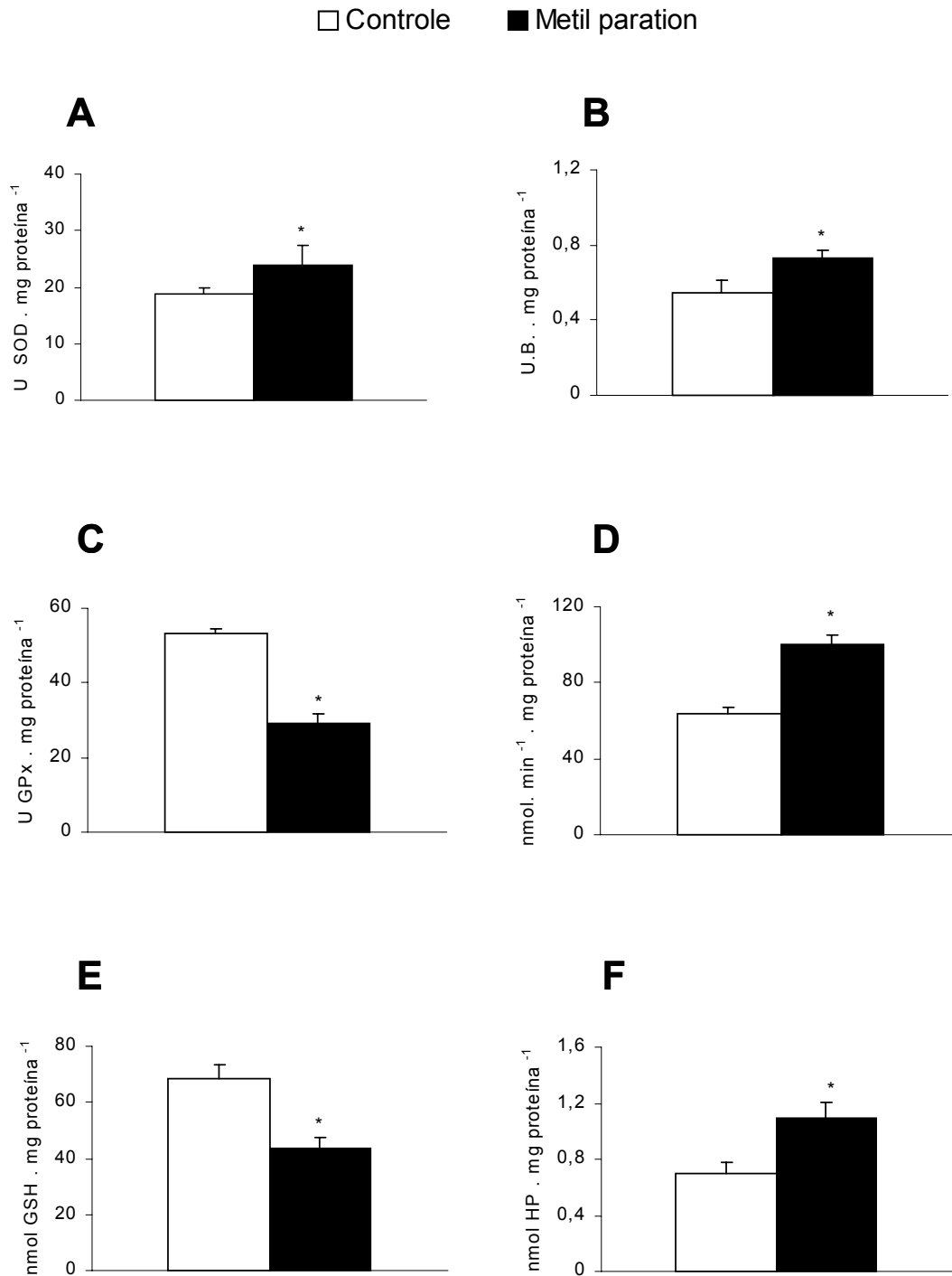


Figura 16: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados nas brânquias de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutatona peroxidase (GPx); D: glutatona S-transferase (GST); E: glutatona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias \pm E.P.M.

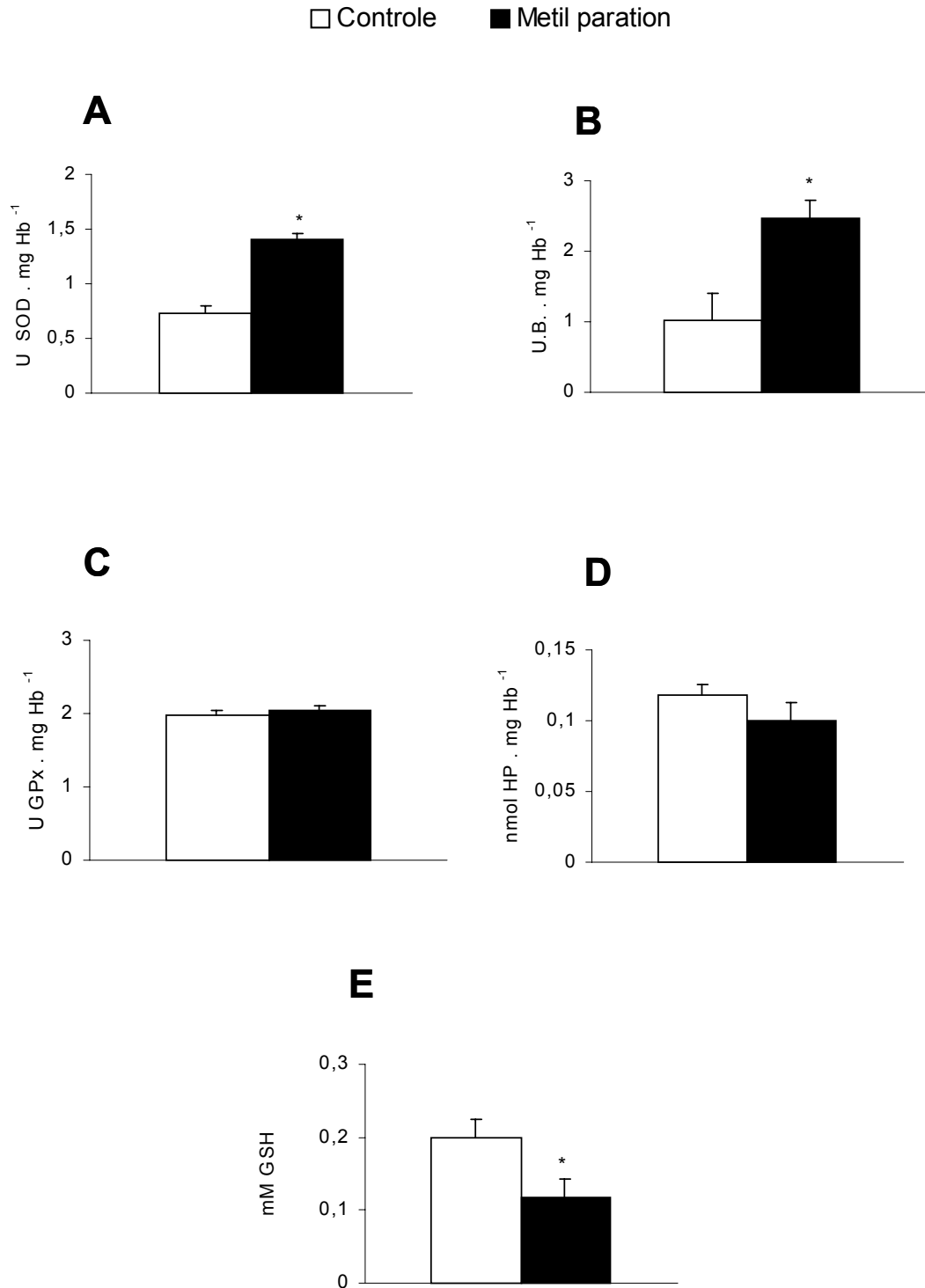


Figura 17: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados nos eritrócitos de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutatona peroxidase (GPx); D: hidroperóxido de lipídio (HP); E: glutatona reduzida sanguínea (GSH). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias \pm E.P.M.

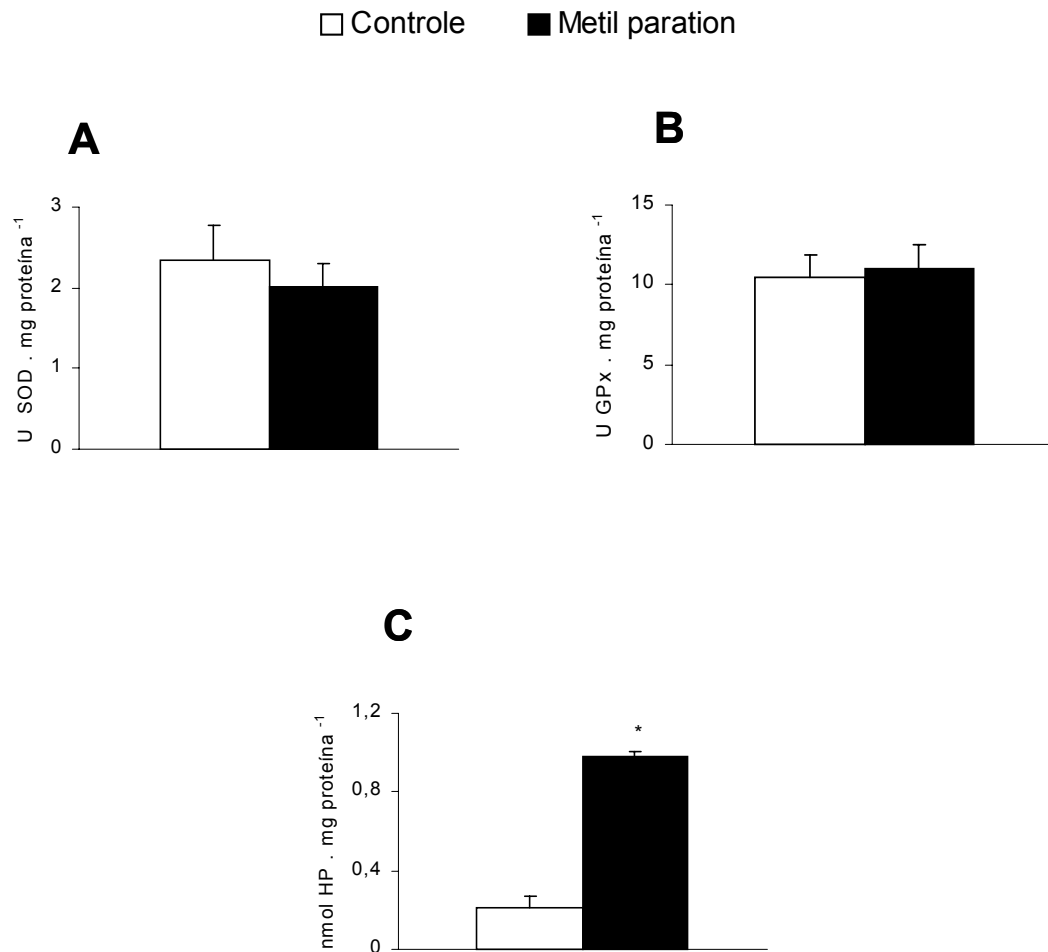


Figura 18: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados no plasma de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h. A: superóxido dismutase (SOD); B: glutatona peroxidase (GPx); C: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.

3.2 Protocolo Experimental II

O comportamento dos grupos experimentais começou a diferir após 15 dias de arraçoamento. Os peixes alimentados com ração sem selênio não exibiram o padrão natatório em círculo, característico de matrinxã, e nem mostraram saciedade com a mesma quantidade de ração oferecida para os peixes que receberam dieta suplementada com $1,5 \text{ mg Se.Kg}^{-1}$. Estes últimos apresentaram o padrão de natação em círculo típico da espécie, não subiram à superfície para se alimentar e a quantidade de ração oferecida era quase totalmente consumida. Diferentemente, os peixes que receberam dieta sem selênio subiam constantemente em busca de alimento, porém uma quantidade maior de ração era observada no fundo do tanque após os períodos de arraçoamento.

Os peixes que receberam dieta livre de selênio exibiram canibalismo após 50 dias de arraçoamento, comportamento este ausente no grupo suplementado com selênio.

A suplementação com Se pareceu induzir um padrão de coloração mais clara nos peixes, quando comparados ao grupo com dieta sem selênio, os quais mostraram-se mais escuros e mais agitados.

Os peixes suplementados com selênio apresentaram um aumento significativo na concentração deste elemento no fígado (19%) e nas brânquias (74%), mas nenhuma alteração foi detectada no músculo branco (**Tabela 10 e Figura 19**). Portanto, houve uma relação direta entre a acumulação de Se nestes tecidos e a concentração de Se na dieta.

No grupo exposto ao MP e tratado com ração sem Se (MP 0Se), o peso dos fígados e os IHS foram significativamente menores quando comparados aos controles (30% e 16%, respectivamente). Entretanto, nenhuma diferença foi observada em tais parâmetros para os peixes tratados com $1,5 \text{ mg}$ de Se. Os pesos dos fígados e os valores do IHS encontram-se na **Tabela 11**.

Nenhuma alteração no tamanho corpóreo dos peixes de todos os grupos experimentais foi observada. Por outro lado, a biometria dos dois lotes de peixes evidenciou que os peixes arraçados com $1,5 \text{ mg}$ de Se apresentaram valores de peso corpóreo e comprimento total ($34 \pm 1,30 \text{ g}$ e $14,5 \pm 0,13 \text{ cm}$, respectivamente) significativamente maiores que os peixes que receberam a dieta sem Se ($28 \pm 1,3$ e $13,5 \pm 0,19$ respectivamente).

Tabela 10: Valores médios \pm E.P.M. da concentração de selênio ($\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$) em fígado ($n = 6$), músculo branco ($n = 4$) e brânquias ($n = 6$) de *Brycon cephalus* alimentados com dietas contendo 0 ou 1,5 mg Se. Kg^{-1} de ração durante 60 dias.

	0 mg de Se/ Kg ração	1,5 mg Se/ Kg de ração
Fígado	11,40 \pm 0,11	13,54 \pm 0,56 *
Músculo branco	3,35 \pm 0,05	3,23 \pm 0,25
Brânquias	3,44 \pm 0,03	6,00 \pm 0,09 *

* indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança.

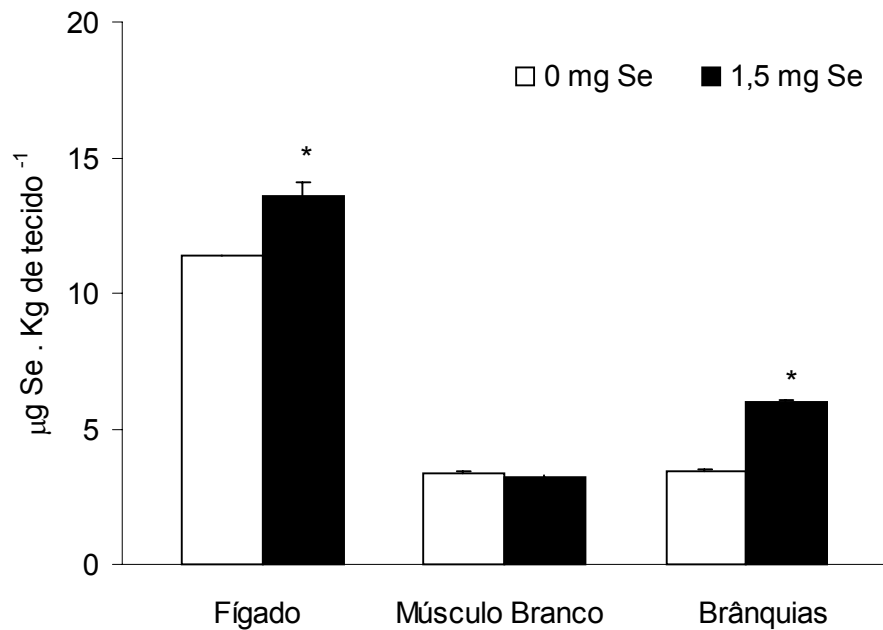


Figura 19: Concentração de selênio no fígado, músculo branco e brânquias de matrinxãs arraçoadas com 0 ou 1,5 mg de Se. Kg^{-1} de ração por 60 dias. * indica diferença significativa em relação ao grupo controle com 95% de confiança. Valores são médias \pm E.P.M.

Tabela 11: Valores médios \pm E.P.M. dos parâmetros biométricos de matrinxãs do grupo controle e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias.

	C 0Se	C 1,5Se	MP 0Se	MP 1,5Se
Massa corporal (g)	29,66 \pm 1,61	32,96 \pm 1,07	30,72 \pm 1,98	29,93 \pm 1,43
Massa hepática (g)	0,33 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,27 \pm 0,006 *	0,34 \pm 0,02
IHS (%)	1,32 \pm 0,15	1,34 \pm 0,12	0,92 \pm 0,07 *	1,18 \pm 0,06

* indica diferença significativa em relação ao seu respectivo controle com 95% de confiança.

Os valores médios \pm E.P.M. das atividades das enzimas antioxidantes e do conteúdo de HP e GSH no fígado, músculo branco, brânquias, eritrócitos e plasma estão apresentados nas **Figuras 20 a 24** e nas **Tabelas 13 a 17**.

Independentemente do tipo de arraçoamento (0 ou 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração), a exposição ao MP por 96 horas induziu um aumento significativo na atividade das enzimas SOD (22% e 28%, para 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração, respectivamente), GST (36% e 86%, para 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração, respectivamente) e CAT (53% e 26%, para 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração, respectivamente) no fígado.

Não houve nenhuma alteração na atividade da GPx e nos níveis de hidroperóxido de lipídio com 96 h de exposição ao metil paration, tanto no grupo dos peixes tratados com ração sem selênio como naqueles arraçoados com 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração. Entretanto, o conteúdo de GSH hepático nos peixes arraçoados com dietas sem selênio sofreu uma redução significativa (34%) após a exposição ao metil paration, enquanto que nos peixes que receberam dietas suplementadas com 1,5 mg de Se.Kg⁻¹, nenhuma alteração foi observada nos níveis de GSH hepáticos (**Figura 20 e Tabela 13**).

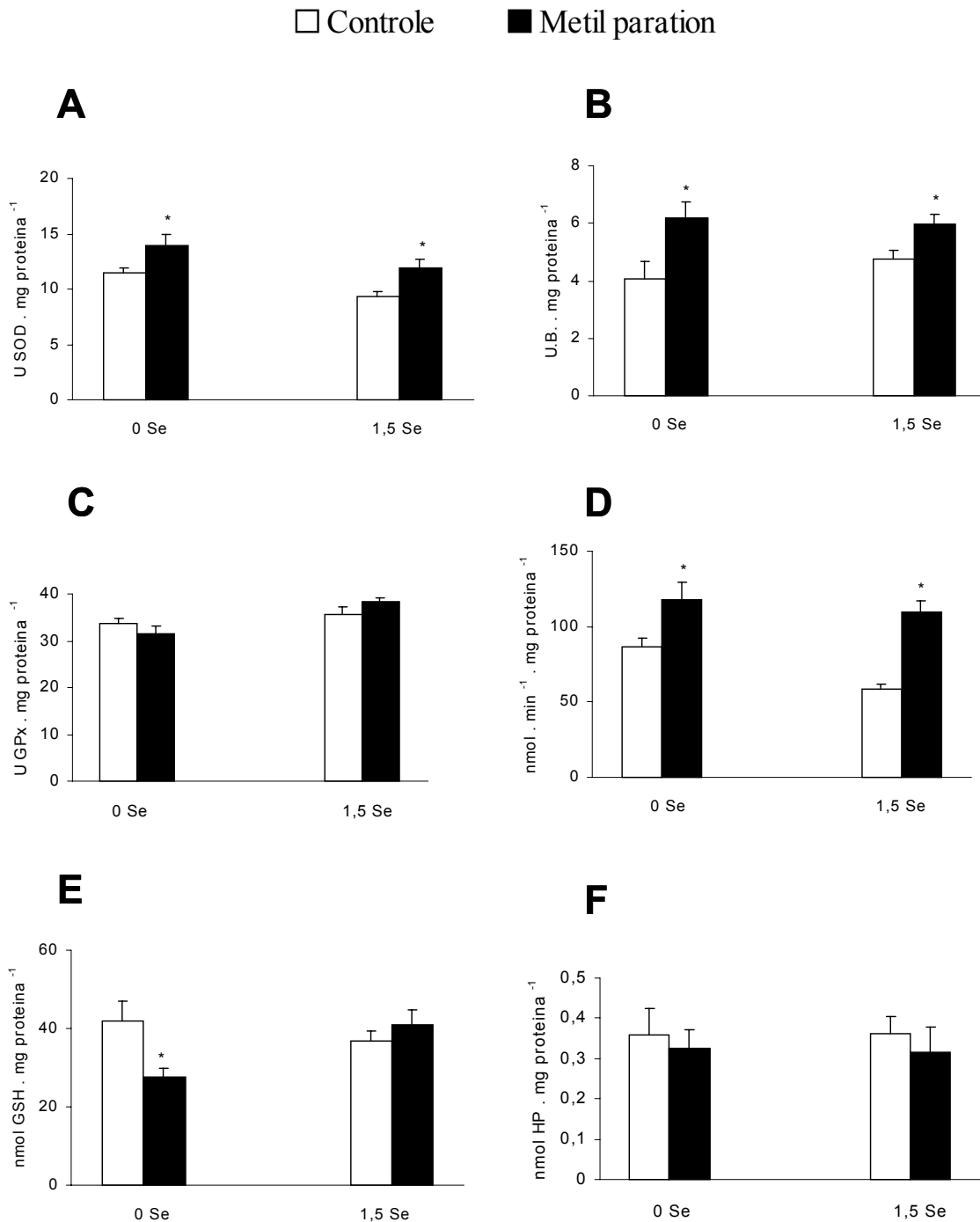


Figura 20: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados em fígado de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR® (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutiona peroxidase (GPx); D: glutiona S-transferase (GST); E: glutiona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.

No músculo branco, também foram observados aumentos significativos nas atividades das enzimas SOD (54% e 75%, para 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração, respectivamente) e GST (85% e 50%, para 0 e 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração, respectivamente) dos peixes expostos ao metil paration, independente do nível de selênio na ração. Entretanto, no grupo que recebeu ração livre de selênio, a exposição ao metil paration induziu um aumento significativo na atividade da CAT (82%) e nos níveis de HP (160%) e uma diminuição também significativa na atividade da GPx (41%) e nos níveis de GSH (28%). Entretanto, nenhuma alteração significativa nestes parâmetros foi detectada no grupo dos peixes alimentados com ração contendo 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ após 96 h de exposição ao metil paration (**Figura 21 e Tabela 14**).

Nas brânquias, houve um aumento significativo na atividade da enzima GST nos peixes expostos ao metil paration, independente do tipo de ração (74% e 123%, para 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração respectivamente). No grupo de peixes que receberam a ração sem selênio, a exposição ao metil paration induziu um aumento significativo na atividade da SOD (22%) e da CAT (97%) e nos níveis de HP (69%) e uma diminuição também significativa na atividade da GPx (15%) e nos níveis de GSH (32%). Não foram observadas alterações significativas nas atividades da SOD, CAT, GPx e nos níveis de HP e de GSH nas brânquias dos peixes do grupo MP 1,5Se (**Figura 22 e Tabela 15**).

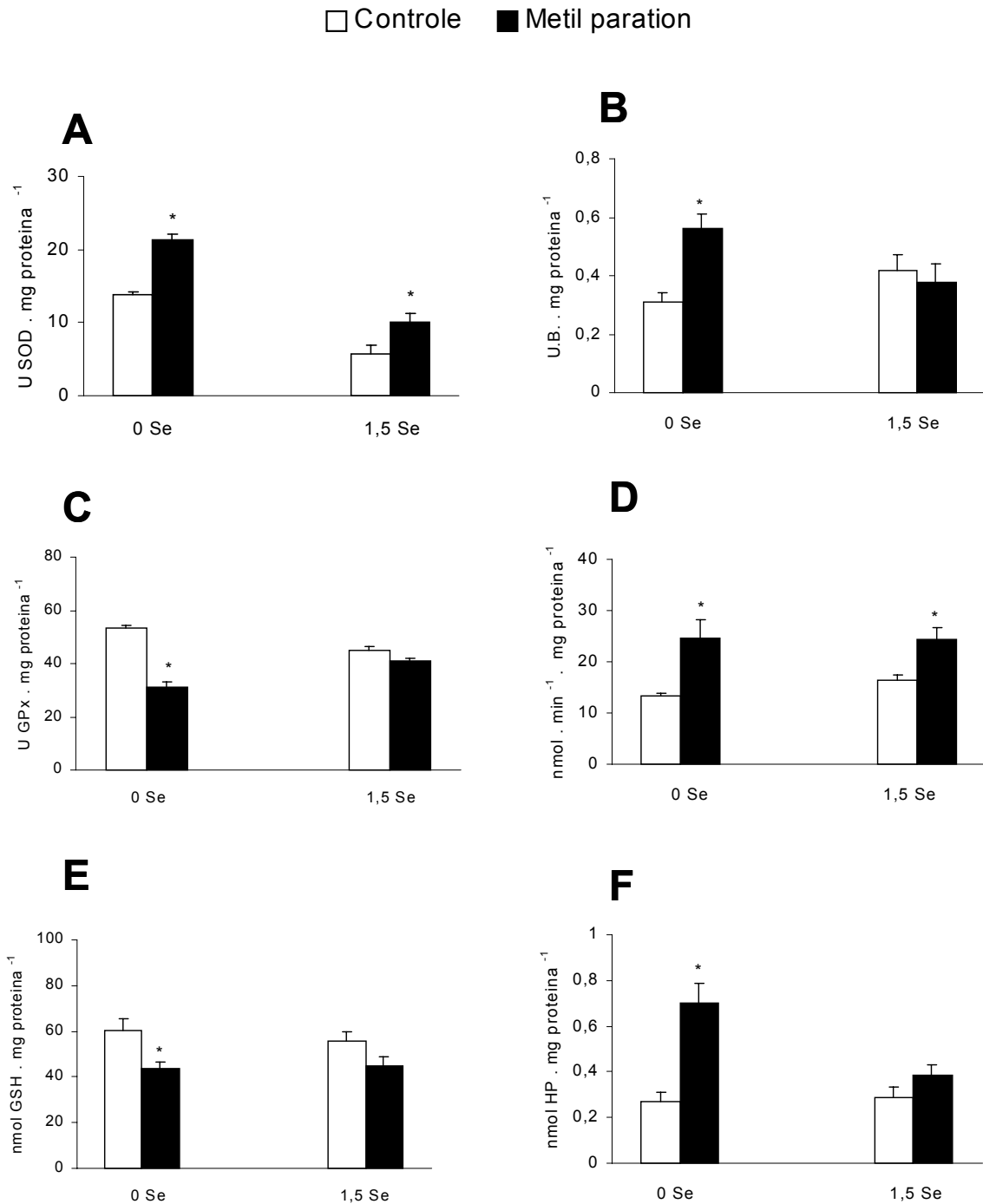


Figura 21: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados em músculo branco de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR® (MP, n = 10) por 96 h e arraçados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutatona peroxidase (GPx); D: glutatona S-transferase (GST); E: glutatona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.

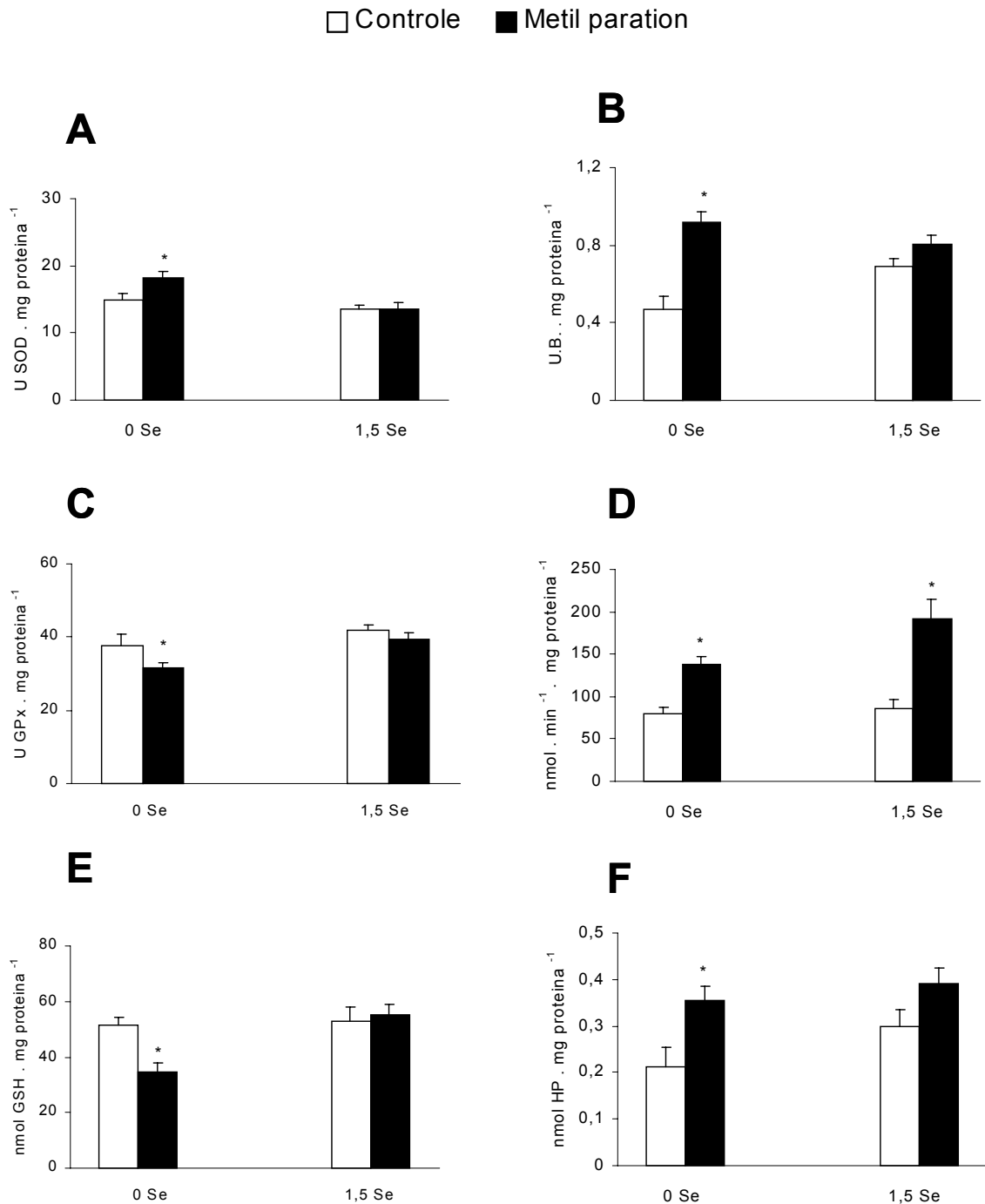


Figura 22: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados nas brânquias de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutatona peroxidase (GPx); D: glutatona S-transferase (GST); E: glutatona reduzida (GSH); F: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.

Nos eritrócitos dos peixes alimentados com ração sem Se, a exposição ao MP por 96 h induziu um aumento significativo nas atividades da SOD (65%) e da CAT (111%) e no conteúdo de HP (88%), além de uma diminuição na concentração de GSH sanguínea (39%). Nenhuma diferença significativa foi observada para a atividade da GPx intraeritrocitária. Por outro lado, nos peixes arraçoados com 1,5 mg de Se, o metil paration induziu aumentos significativos das atividades da SOD (245%) e da GPx (62%) e reduções na atividade da CAT (45%) e nos níveis de HP (59%). Porém, não foi constatada nenhuma alteração na concentração de GSH sanguínea após a exposição ao metil paration (**Figura 23 e Tabela 16**).

No plasma dos peixes tratados com ração sem selênio, a exposição ao metil paration induziu um aumento significativo nos níveis de HP (94%) enquanto que as atividades da SOD e da GPx não foram alteradas. Já nos peixes tratados com 1,5 mg de Se/Kg de ração, houve um aumento significativo na atividade da GPx (31%) enquanto que a atividade da SOD e os níveis de HP permaneceram inalterados após 96 h de exposição ao metil paration, quando comparados ao controle (**Figura 24 e Tabela 17**).

A razão HP/CAT+GPx para os grupos do protocolo experimental II encontra-se na **Tabela 12**. Esta relação foi maior no grupo exposto ao MP em relação ao controle no músculo branco, nas brânquias, nos eritrócitos e no plasma nos peixes do grupo MP 0Se, indicando um aumento no processo de peroxidação lipídica e estresse oxidativo. Estes aumentos foram da ordem de 4,4; 2,0; 2,0 e 1,95, respectivamente. No fígado, não houve alteração nesta razão entre o grupo controle e o grupo MP 0Se.

Nos peixes do grupo MP 1,5Se, os aumentos na relação HP/CAT+GPx no músculo branco e nas brânquias foram muito menos acentuados sendo, para ambos os tecidos, de cerca de 1,25 vezes o valor do controle. No fígado e nos eritrócitos dos peixes expostos ao MP, esta razão apresentou-se menor (1,3 e 2,6, respectivamente) em relação ao controle. No plasma, nenhuma alteração nesta razão foi observada para os grupos controle e MP 1,5Se.

Tabela 12: Razão HP/CAT+GPx para os diferentes tecidos de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias.

	HP/CAT+GPx			
	0 mg Se/Kg ração		1,5 mg Se/Kg ração	
	Controle	Metil paration	Controle	Metil paration
Fígado	0,009	0,009	0,009	0,007
Músculo branco	0,005	0,022	0,007	0,009
Brânquias	0,005	0,011	0,008	0,010
Eritrócitos	0,007	0,014	0,013	0,005
Plasma ¹	0,078	0,152	0,017	0,017

¹Para plasma não há medida da catalase e, portanto, a relação é HP/GPx

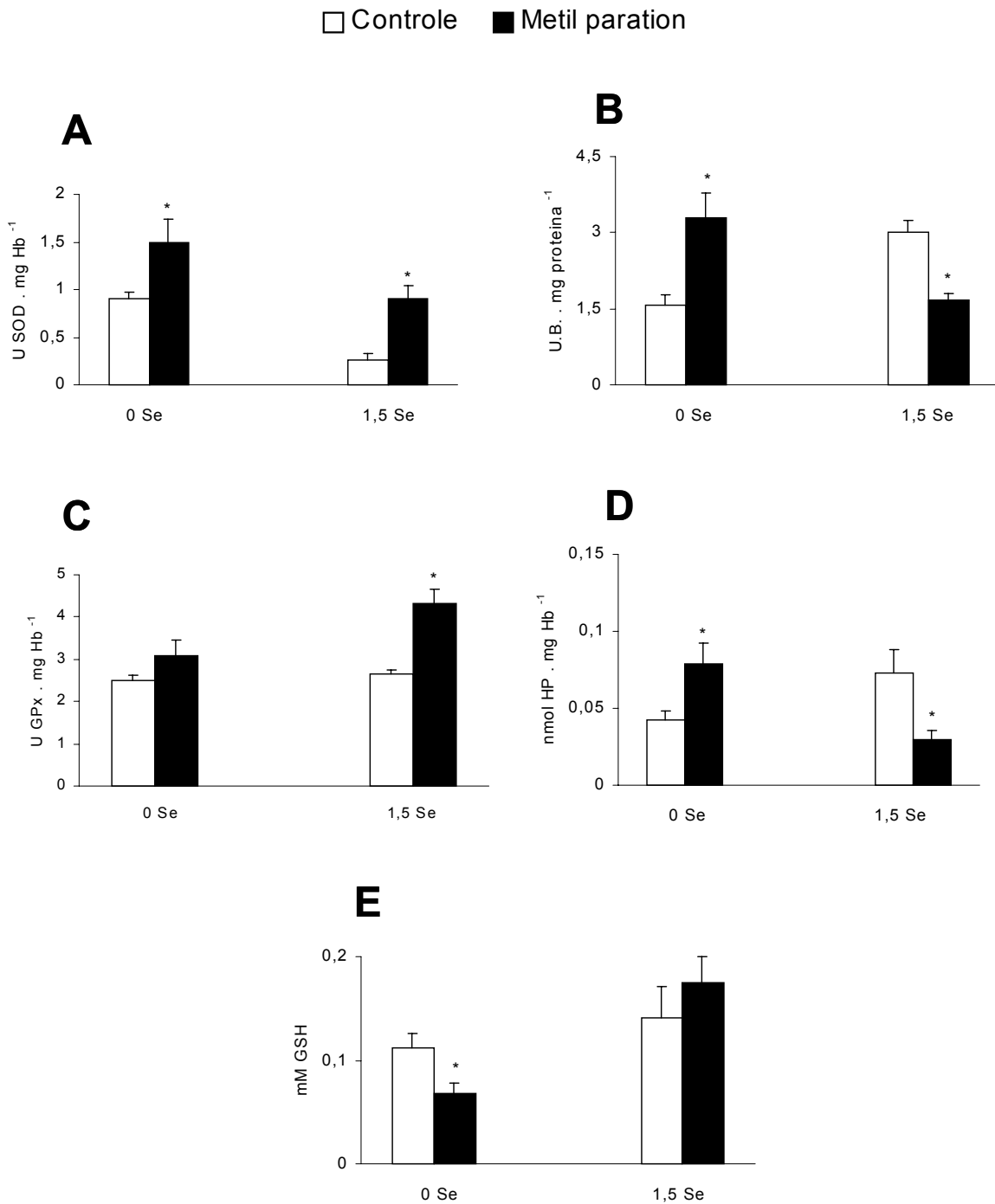


Figura 23: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados nos eritrócitos de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: catalase (CAT); C: glutatona peroxidase (GPx); D: hidroperóxido de lipídio (HP); E: glutatona reduzida sangüínea (GSH). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias \pm E.P.M.

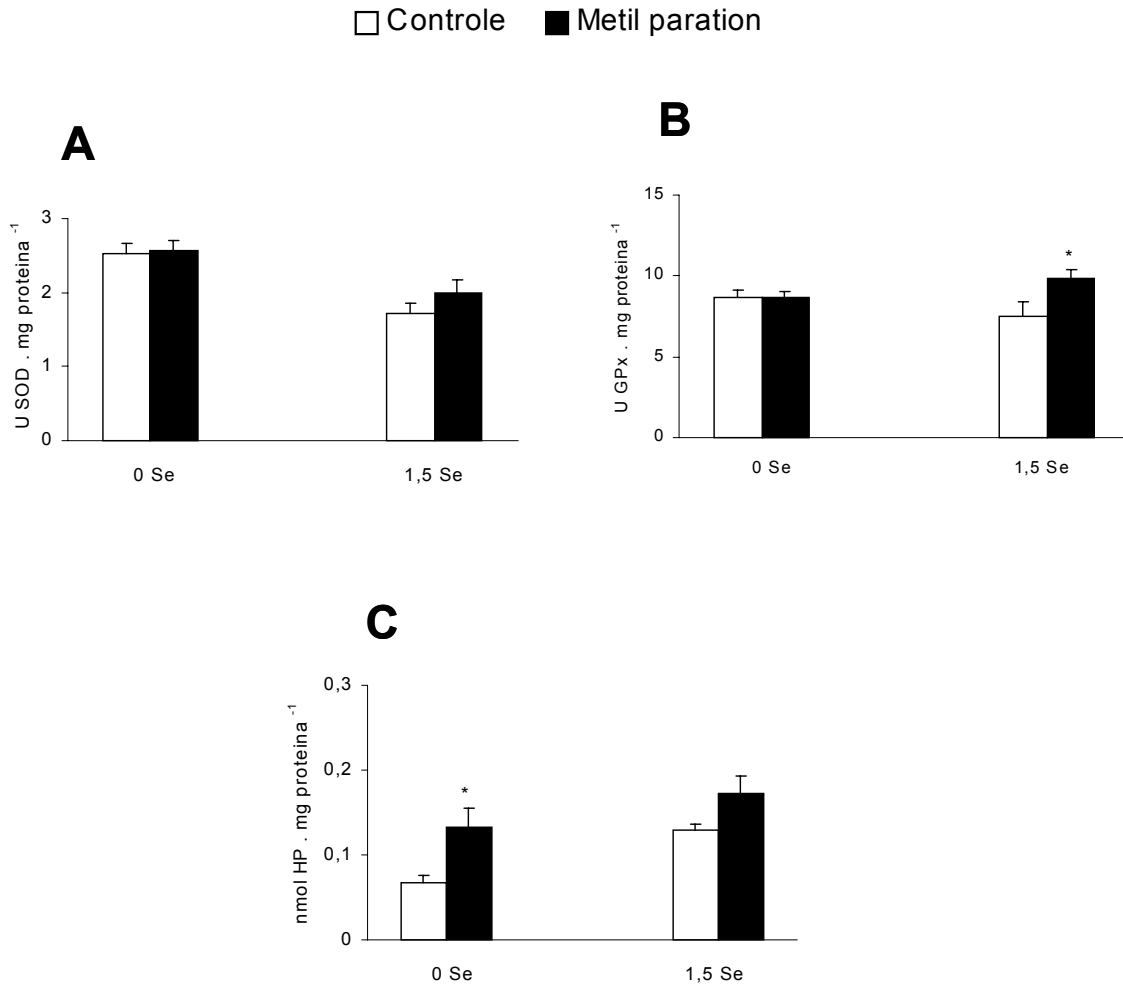


Figura 24: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados no plasma de *Brycon cephalus* dos grupos controle (C, n = 10) e exposto a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (MP, n = 10) por 96 h e arraçoados com 0 ou 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração por 60 dias. A: superóxido dismutase (SOD); B: glutaciona peroxidase (GPx); C: hidroperóxido de lipídio (HP). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle com 95% de confiança. Valores são médias ± E.P.M.

3.3 Protocolos Experimentais I e II (Resultados da Interação)

Os resultados obtidos quando os protocolos experimentais I e II foram analisados conjuntamente, para verificar a existência de uma possível interação entre os diferentes níveis de selênio na ração e a presença ou não de MP na água, estão apresentados nas **Tabelas 13 a 17**.

No fígado (**Tabela 13**), houve interação entre os fatores MP e Se apenas para o parâmetro GSH, onde o padrão de redução significativa do conteúdo de GSH após a exposição ao MP nos grupos tratados com 0 ou 0,22 mg de Se foi revertido com a suplementação de 1,5 mg de Se por Kg de ração. Também foi verificada diferença significativa entre o valor do conteúdo de GSH nos peixes do grupo MP 1,5Se e dos peixes dos outros tipos de arraçoamento e sob a mesma condição de exposição ao pesticida. Além disso, houve diferença significativa nas atividades da SOD e da GPx hepáticas entre os diferentes tipos de arraçoamento, independentemente da exposição ou não ao MP. A atividade da SOD apresentou-se reduzida enquanto que a da GPx mostrou-se elevada no tratamento com 1,5 mg de Se em comparação aos demais tratamentos. Diferenças significativas para os parâmetros SOD, CAT, GST e GSH foram observadas nos grupos experimentais (C e 2 ppm de MP) independentemente do tipo de tratamento (níveis de selênio). As atividades da SOD, CAT e GST apresentaram-se elevadas com a exposição ao MP em relação ao controle, enquanto que o conteúdo de GSH mostrou-se reduzido.

No músculo branco (**Tabela 14**), houve interação entre os fatores MP e Se para os parâmetros HP, CAT, GPx e GSH. O padrão de aumento significativo para o conteúdo de HP e para a atividade da enzima CAT, bem como o padrão de redução do conteúdo de GSH e da atividade da GPx, após a exposição ao MP nos grupos tratados com 0 ou 0,22 mg de Se, foi revertido com a suplementação com 1,5 mg de Se. Diferenças significativas entre os valores do conteúdo de HP e atividades da CAT e da GPx nos peixes do grupo MP 1,5Se quando comparados aos grupos MP 0Se e MP 0,22Se também foram registradas. Houve diferença significativa na atividade da SOD no músculo branco dos peixes dos diferentes tipos de arraçoamento, independentemente da exposição ou não ao MP. A atividade da SOD apresentou-se reduzida no tratamento com 1,5 mg de Se em comparação aos demais tratamentos. Diferenças significativas para todos os parâmetros foram observadas nos grupos experimentais (C e 2 ppm de MP) independentemente do tipo de tratamento (níveis de selênio), havendo um aumento no conteúdo de HP e nas atividades das enzimas SOD, CAT e GST e uma redução do conteúdo de GSH e de atividade da GPx após a exposição ao MP, em relação ao controle.

Nas brânquias (**Tabela 15**), todos os parâmetros analisados exibiram interação entre os fatores MP e Se, com exceção dos níveis de HP. Aumentos significativos nas atividades da SOD e CAT após a exposição ao MP só foram observados nos peixes tratados com 0 e 0,22 mg de Se por Kg de ração. A redução significativa nos níveis de GSH e na atividade da GPx nos peixes dos grupos MP 0Se e MP 0,22Se também não foi observada para os peixes do grupo MP 1,5Se. Quanto a GST, os peixes do grupo MP 1,5Se apresentaram uma atividade significativamente mais elevada em comparação com os peixes dos grupos MP 0Se e MP 0,22Se. As diferenças apresentadas nesses parâmetros quando as mesmas doses de MP foram comparadas entre os diferentes níveis de Se são apresentadas na **Tabela 15**. Os níveis de HP e GSH, assim como as atividades da SOD, GPx e da GST, apresentaram diferenças significativas em relação ao tipo de arraçoamento, independentemente da exposição ou não ao MP. O conteúdo de HP e a atividade da SOD apresentaram-se com um valor mais alto para o tratamento com 0,22 mg de Se, ao mesmo tempo em que a atividade da SOD mostrou-se significativamente menor nos peixes suplementados com 1,5 mg de Se. Os valores da atividade da GPx e do conteúdo de GSH foram maiores nos peixes que receberam dietas contendo selênio tanto na concentração de 0,22 como 1,5 mg. A atividade da GST, por sua vez, mostrou-se elevada no tratamento com 1,5 mg de Se em comparação com os outros tipos de arraçoamento. Diferenças significativas em todos os parâmetros foram observadas nos grupos experimentais (C e 2 ppm de MP), independentemente do tipo de tratamento (níveis de selênio), havendo um aumento no conteúdo de HP e nas atividades das enzimas SOD, CAT e GST e uma redução do conteúdo de GSH e da atividade da GPx após a exposição ao MP em relação ao controle.

Nos eritrócitos (**Tabela 16**), houve interação entre os fatores Se e MP para os níveis de HP e para as atividades da CAT e da GPx. Em relação a CAT, em contraste com o aumento significativo nos peixes dos grupos MP 0Se e MP 0,22Se, houve uma redução significativa deste parâmetro nos peixes do grupo MP 1,5Se. A GPx nos peixes do grupo MP 1,5Se apresentou-se com maior atividade em relação aos outros tipos de arraçoamento, onde a exposição ao MP não causou um aumento da atividade da GPx intraeritrocitária. Por outro lado, o conteúdo de HP foi reduzido de maneira linear com o aumento de Se na ração, de maneira que no grupo MP 0Se houve um aumento significativo no nível de HP que não foi observado no grupo MP 0,22Se. Além disso, os peixes do grupo MP 1,5Se apresentaram uma redução no conteúdo de HP intraeritrocitário. Os níveis de HP e de GSH e as atividades da SOD e da CAT apresentaram diferenças significativas em relação ao tipo de arraçoamento, independentemente da exposição ou não ao MP, conforme observado na **Tabela 16**. Nas atividades das enzimas SOD, CAT e GPx, diferenças significativas foram

observadas nos grupos experimentais (C e 2 ppm de MP), independentemente do tipo de tratamento (níveis de selênio), havendo um aumento nas atividades dessas enzimas após a exposição ao MP em relação ao controle.

No plasma (**Tabela 17**), houve interação entre os fatores Se e MP para os níveis de HP. Nos peixes tratados com 1,5 mg de Se, não houve aumento significativo dos níveis de HP plasmáticos após a exposição ao MP quando comparados com os demais tratamentos (0 e 0,22 mg Se por Kg de ração) sob essa mesma condição. Conforme a **Tabela 17**, diferenças significativas foram observadas nos níveis de HP e na atividade da SOD para os diferentes tipos de arraçoamento, independentemente da exposição ou não ao MP. Houve, também, diferença significativa no conteúdo de HP nos grupos experimentais (C e 2 ppm de MP), independentemente do tipo de tratamento (níveis de selênio), havendo um aumento do conteúdo de HP plasmático após a exposição ao MP em relação ao controle.

Tabela 13: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg proteína⁻¹), SOD (U.mg proteína⁻¹), CAT (U.B..mg proteína⁻¹), GPx (U.mg proteína⁻¹), GST (nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹) e GSH (nmol.mg proteína⁻¹) em fígado de matrinxãs arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg⁻¹ de ração) por 60 dias expostos (n = 10) ou não (n = 10) a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (mg.L⁻¹). Análise Two-Way.

Selênio	MP	HP	SOD	CAT	GPx	GST	GSH
0	0	0,36 \pm 0,06	11,42 \pm 0,47	4,06 \pm 0,62	33,59 \pm 1,10	86,65 \pm 5,58	42,03 \pm 5,03
0	2	0,33 \pm 0,05	13,97 \pm 0,94	6,20 \pm 0,54	31,43 \pm 1,78	118,22 \pm 10,8	27,60 \pm 2,36 *
0,22	0	0,31 \pm 0,08	12,25 \pm 0,71	3,17 \pm 0,44	29,51 \pm 1,78	88,16 \pm 6,86	47,56 \pm 4,54
0,22	2	0,41 \pm 0,06	14,78 \pm 0,39	6,40 \pm 1,25	32,74 \pm 1,70	118,40 \pm 6,42	24,46 \pm 2,47 *
1,50	0	0,36 \pm 0,04	9,27 \pm 0,55	4,74 \pm 0,32	35,56 \pm 1,82	58,85 \pm 2,68	36,95 \pm 2,50
1,50	2	0,32 \pm 0,06	11,90 \pm 0,81	5,96 \pm 0,37	38,31 \pm 0,99	109,67 \pm 7,28	40,95 \pm 3,86 ^{1,2}
Efeito Se		ns	P < 0,05	ns	P < 0,05	ns	ns
	0,00	0,34 \pm 0,04	12,51 \pm 0,50	5,13 \pm 0,40	32,52 \pm 1,26	100,63 \pm 5,53	34,81 \pm 2,80
	0,22	0,36 \pm 0,04	13,84 \pm 0,52	4,36 \pm 0,32	31,12 \pm 1,13	101,36 \pm 6,10	34,38 \pm 3,13
	1,50	0,34 \pm 0,03	10,59 \pm 0,48 ^{A, B}	5,35 \pm 0,30	36,93 \pm 1,10 ^{A, B}	85,69 \pm 5,52	38,95 \pm 2,44
Efeito MP		ns	P < 0,05	P < 0,05	ns	P < 0,05	P < 0,05
	0	0,34 \pm 0,03	10,98 \pm 0,38	4,08 \pm 0,30	32,67 \pm 0,92	77,84 \pm 4,92	41,09 \pm 2,20
	2	0,35 \pm 0,03	13,55 \pm 0,41	5,81 \pm 0,30	34,16 \pm 0,96	113,95 \pm 4,42	31,00 \pm 2,40
Se x MP		ns	ns	ns	ns	ns	P < 0,05

Diferenças significativas entre os níveis de selênio, independentemente dos níveis de metil paration: A - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; B - indica diferença entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; C - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration, independentemente dos níveis de selênio, são indicados por P < 0,05.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration dentro de um mesmo nível de selênio, quando há interação entre os dois fatores (concentrações de metil paration na água x níveis de selênio na ração), são indicadas por *.

Diferenças significativas entre os níveis de selênio dentro de um mesmo nível de metil paration: 1 - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 2 - indica entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 3 - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Tabela 14: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg proteína⁻¹), SOD (U.mg proteína⁻¹), CAT (U.B.mg proteína⁻¹), GPx (U.mg proteína⁻¹), GST (nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹) e GSH (nmol.mg proteína⁻¹) em músculo branco de matrinxãs arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg⁻¹ de ração) por 60 dias expostos (n = 10) ou não (n = 10) a 2 ppm de Folisuper 600 BR® (mg.L⁻¹). Análise Two-Way.

Selênio	MP	HP	SOD	CAT	GPx	GST	GSH
0	0	0,27 \pm 0,04	13,77 \pm 0,35	0,31 \pm 0,03	53,17 \pm 1,10	13,35 \pm 0,61	60,63 \pm 4,62
0	2	0,70 \pm 0,09 *	21,24 \pm 0,95	0,56 \pm 0,05 *	31,35 \pm 1,78 *	24,67 \pm 3,54	43,82 \pm 2,60 *
0,22	0	0,46 \pm 0,06	27,46 \pm 1,42	0,24 \pm 0,03	55,00 \pm 1,78	18,43 \pm 1,50	76,53 \pm 2,26
0,22	2	0,71 \pm 0,09 *	38,85 \pm 3,50	0,61 \pm 0,10 *	35,31 \pm 1,70 * ¹	29,03 \pm 2,46	42,82 \pm 3,98 *
1,50	0	0,29 \pm 0,05	5,81 \pm 1,09	0,42 \pm 0,05	44,84 \pm 1,82	16,30 \pm 1,12	55,53 \pm 4,25
1,50	2	0,39 \pm 0,05 ^{1,2}	10,15 \pm 1,02	0,38 \pm 0,07 ³	40,76 \pm 0,99 ²	24,47 \pm 2,26	44,95 \pm 3,76 *
Efeito Se		P < 0,05	P < 0,05	ns	ns	ns	ns
	0,00	0,49 \pm 0,04	17,50 \pm 1,00	0,44 \pm 0,04	42,26 \pm 1,83	19,01 \pm 1,67	52,22 \pm 2,90
	0,22	0,58 \pm 0,05 ^A	33,16 \pm 1,17 ^A	0,43 \pm 0,04	45,16 \pm 1,90	23,73 \pm 1,43	59,68 \pm 3,22
	1,50	0,34 \pm 0,04 ^C	7,98 \pm 1,10 ^{B,C}	0,40 \pm 0,04	42,80 \pm 1,74	19,14 \pm 1,69	50,24 \pm 2,63
Efeito MP		P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
	0	0,34 \pm 0,04	15,68 \pm 0,95	0,32 \pm 0,03	51,00 \pm 1,54	16,03 \pm 1,35	64,23 \pm 2,32
	2	0,60 \pm 0,04	23,42 \pm 0,85	0,52 \pm 0,04	35,81 \pm 1,43	25,23 \pm 1,26	43,86 \pm 2,46
Se x MP		P < 0,05	ns	P < 0,05	P < 0,05	ns	P < 0,05

Diferenças significativas entre os níveis de selênio, independentemente dos níveis de metil paration: A - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; B - indica diferença entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; C - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration, independentemente dos níveis de selênio, são indicados por P < 0,05.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration dentro de um mesmo nível de selênio, quando há interação entre os dois fatores (concentrações de metil paration na água x níveis de selênio na ração), são indicadas por *.

Diferenças significativas entre os níveis de selênio dentro de um mesmo nível de metil paration: 1 - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 2 - indica entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 3 - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Tabela 15: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg proteína⁻¹), SOD (U.mg proteína⁻¹), CAT (U.B..mg proteína⁻¹), GPx (U.mg proteína⁻¹), GST (nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹) e GSH (nmol.mg proteína⁻¹) nas brânquias de matrinxãs arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg⁻¹ de ração) por 60 dias expostos (n = 10) ou não (n = 10) a 2 ppm de Folisuper 600 BR® (mg.L⁻¹). Análise Two-Way.

Selênio	MP	HP	SOD	CAT	GPx	GST	GSH
0	0	0,21 \pm 0,04	14,98 \pm 0,85	0,468 \pm 0,07	37,50 \pm 3,19	79,76 \pm 6,90	51,54 \pm 2,81
0	2	0,36 \pm 0,03	18,26 \pm 0,86 ^{*3}	0,920 \pm 0,05 [*]	31,74 \pm 1,31 [*]	138,77 \pm 9,10 [*]	34,81 \pm 3,03 [*]
0,22	0	0,70 \pm 0,08	18,77 \pm 1,16 ¹	0,55 \pm 0,07	53,08 \pm 1,56	63,63 \pm 3,25	68,16 \pm 5,15
0,22	2	1,09 \pm 0,12	23,95 \pm 1,77 ^{*,4}	0,73 \pm 0,04 ^{*,4}	29,07 \pm 2,55 [*]	100,14 \pm 4,79 [*]	43,82 \pm 3,84 [*]
1,50	0	0,30 \pm 0,04	13,58 \pm 0,55 ²	0,69 \pm 0,037	41,98 \pm 1,27	85,60 \pm 11,67	52,72 \pm 5,45
1,50	2	0,39 \pm 0,03	13,57 \pm 0,99 ⁵	0,81 \pm 0,043	39,48 \pm 1,69 ^{4,5}	191,73 \pm 23,15 ^{*,4,5}	55,22 \pm 3,85 ^{*,4,5}
Efeito Se		P < 0,05	P < 0,05	ns	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
0,00		0,28 \pm 0,05	16,62 \pm 0,78	0,69 \pm 0,04	34,62 \pm 1,40	109,26 \pm 7,90	43,17 \pm 2,90
0,22		0,89 \pm 0,05 ^A	21,36 \pm 0,78 ^A	0,64 \pm 0,04	41,07 \pm 1,50 ^A	81,88 \pm 7,20	56,00 \pm 2,97 ^A
1,50		0,35 \pm 0,06	13,57 \pm 0,70 ^{A,B}	0,75 \pm 0,03	40,73 \pm 1,30 ^B	138,66 \pm 8,00 ^{A,B}	53,97 \pm 2,83 ^B
Efeito MP		P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
0		0,40 \pm 0,04	15,78 \pm 0,63	0,57 \pm 0,03	44,20 \pm 1,18	76,33 \pm 5,96	57,47 \pm 2,50
2		0,61 \pm 0,04	18,60 \pm 0,60	0,82 \pm 0,03	33,43 \pm 1,07	143,55 \pm 6,60	44,62 \pm 2,22
Se x MP		ns	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05

Diferenças significativas entre os níveis de selênio, independentemente dos níveis de metil paration: A - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; B - indica diferença entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; C - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration, independentemente dos níveis de selênio, são indicados por P < 0,05.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration dentro de um mesmo nível de selênio, quando há interação entre os dois fatores (concentrações de metil paration na água x níveis de selênio na ração), são indicadas por *.

Diferenças significativas entre os níveis de selênio dentro de um mesmo nível de metil paration: 1 - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 2 - indica entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 3 - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Diferenças significativas entre os níveis de selênio dentro dos grupos expostos a 2 ppm de metil paration: 4 - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 5 - indica entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 6 - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Tabela 16: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg Hb⁻¹), SOD (U.mg Hb⁻¹), CAT (U.B..mg Hb⁻¹), GPx (U.mg Hb⁻¹) e GSH sanguínea (mmol.L⁻¹) nos eritrócitos de matrinxãs arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg⁻¹ de ração) por 60 dias expostos (n = 10) ou não (n = 10) a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (mg.L⁻¹). Análise Two-Way.

Selênio	MP	HP	SOD	CAT	GPx	GSH
0	0	0,04 \pm 0,01	0,91 \pm 0,06	1,56 \pm 0,21	2,50 \pm 0,13	0,11 \pm 0,01
0	2	0,08 \pm 0,01 *	1,50 \pm 0,24	3,30 \pm 0,48 *	3,09 \pm 0,38	0,07 \pm 0,01
0,22	0	0,12 \pm 0,01	0,73 \pm 0,07	1,03 \pm 0,37	1,98 \pm 0,07	0,20 \pm 0,02
0,22	2	0,10 \pm 0,01	1,41 \pm 0,05	2,47 \pm 0,25 *	2,041 \pm 0,06 ⁴	0,12 \pm 0,03
1,50	0	0,07 \pm 0,02	0,26 \pm 0,07	3,00 \pm 0,23 ^{1,2}	2,661 \pm 0,10	0,14 \pm 0,02
1,50	2	0,03 \pm 0,01 ^{*,1,2}	0,90 \pm 0,10	1,66 \pm 0,14 ^{*,5}	4,32 \pm 0,34 ^{*,4,5}	0,18 \pm 0,02
Efeito Se		P < 0,05	P < 0,05	ns	P < 0,05	P < 0,05
	0,00	0,06 \pm 0,01	1,20 \pm 0,08	2,40 \pm 0,22	2,77 \pm 0,16	0,09 \pm 0,02
	0,22	0,11 \pm 0,01 ^A	1,09 \pm 0,07	1,75 \pm 0,20	2,01 \pm 0,20 ^A	0,16 \pm 0,02 ^A
	1,50	0,05 \pm 0,01	0,58 \pm 0,07 ^B	2,32 \pm 0,20	3,50 \pm 0,23 ^{A,B}	0,16 \pm 0,02 ^B
Efeito MP		ns	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	ns
	0	0,08 \pm 0,01	0,63 \pm 0,06	1,86 \pm 0,17	2,31 \pm 0,23	0,15 \pm 0,01
	2	0,07 \pm 0,01	1,27 \pm 0,06	2,46 \pm 0,17	3,20 \pm 0,12	0,12 \pm 0,01
Se x MP		P < 0,05	ns	P < 0,05	P < 0,05	ns

Diferenças significativas entre os níveis de selênio, independentemente dos níveis de metil paration: A - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; B - indica diferença entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; C - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration, independentemente dos níveis de selênio, são indicados por P < 0,05.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration dentro de um mesmo nível de selênio, quando há interação entre os dois fatores (concentrações de metil paration na água x níveis de selênio na ração), são indicadas por *.

Diferenças significativas entre os níveis de selênio dentro de um mesmo nível de metil paration: 1 - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 2 - indica entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 3 - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Diferenças significativas entre os níveis de selênio dentro dos grupos expostos a 2 ppm de metil paration: 4 - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 5 - indica entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 6 - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Tabela 17: Valores médios \pm E.P.M. de HP (nmol.mg proteína⁻¹), SOD (U.mg proteína⁻¹) e GPx (U.mg proteína⁻¹) no plasma de matrinxãs arraçoadas com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de selênio (mg.Kg⁻¹ de ração) por 60 dias expostas (n = 10) ou não (n = 10) ao a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] (mg.L⁻¹). Análise Two-Way.

Selênio	MP	HP	SOD	GPx
0	0	0,07 \pm 0,01	2,52 \pm 0,14	8,69 \pm 0,48
0	2	0,13 \pm 0,02 *	2,56 \pm 0,14	8,69 \pm 0,31
0,22	0	0,21 \pm 0,06	2,35 \pm 0,42	10,48 \pm 1,35
0,22	2	0,98 \pm 0,02 *	2,01 \pm 0,30	11,00 \pm 1,57
1,50	0	0,13 \pm 0,01	1,72 \pm 0,13	7,51 \pm 0,92
1,50	2	0,17 \pm 0,02	2,00 \pm 0,18	9,86 \pm 0,53
Efeito Se		P < 0,05	P < 0,05	ns
	0,00	0,10 \pm 0,01	2,54 \pm 0,14	8,70 \pm 0,47
	0,22	0,60 \pm 0,02 ^A	2,18 \pm 0,17	10,73 \pm 0,67
	1,50	0,15 \pm 0,01 ^{B, C}	1,86 \pm 0,12 ^B	8,70 \pm 0,52
Efeito MP		P < 0,05	ns	ns
	0	0,14 \pm 0,01	2,20 \pm 0,12	8,90 \pm 0,48
	2	0,43 \pm 0,01	2,20 \pm 0,11	9,85 \pm 0,43
Se x MP		P < 0,05	ns	ns

Diferenças significativas entre os níveis de selênio, independentemente dos níveis de metil paration: A - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; B - indica diferença entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; C - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration, independentemente dos níveis de selênio, são indicados por P < 0,05.

Diferenças significativas entre o grupo controle e o exposto ao metil paration dentro de um mesmo nível de selênio, quando há interação entre os dois fatores (concentrações de metil paration na água x níveis de selênio na ração), são indicadas por *.

Diferenças significativas entre os níveis de selênio dentro de um mesmo nível de metil paration: 1 - indica diferença entre 0 e 0,22 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 2 - indica entre 0 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração; 3 - indica diferença entre 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹ de ração.

4 DISCUSSÃO

4.1 Protocolo Experimental I

Mudanças na composição química de ambientes aquáticos naturais podem afetar organismos não-alvos, particularmente os peixes, os quais são muito utilizados como bioindicadores de poluição para se avaliar a qualidade de sistemas aquáticos (ADAMS & GREELEY, 2000). Em áreas poluídas, a exposição de peixes a xenobióticos pode dar origem a distúrbios bioquímicos (GÜL et al., 2004).

As alterações nos mecanismos bioquímicos antioxidantes catalisados pelas enzimas vêm sendo identificadas como biomarcadores da susceptibilidade celular a danos causados pelas ERO. Uma das principais características dessas enzimas é a indução de sua expressão e/ou atividade sob condições de estresse oxidante, um mecanismo que pode ser uma adaptação importante ao estresse induzido por poluentes (LIVINGSTONE, 2001; ZHANG et al., 2004).

O metil paration é facilmente absorvido de todos os meios de exposição (atmosfera, água, alimentos, etc.) e distribui-se rapidamente nos tecidos do organismo. A toxicidade do metil paration resulta da sua conversão metabólica processada no retículo endoplasmático dos hepatócitos, onde o grupo P = S é transformado em P = O, formando o paraoxon, que é o principal responsável pela inibição da AChE nas terminações nervosas. O paraoxon, após ter sido formado no fígado, pode ser distribuído para os outros tecidos através do sangue, acarretando um acúmulo de ACh em diversos órgãos (MACHADO & FANTA, 2003).

O protocolo experimental I demonstrou que a exposição por 96 horas a 2 ppm do Folisuper 600 BR[®] tem um grande potencial indutor de estresse oxidante em *Brycon cephalus* e que as brânquias e o músculo branco são os órgãos mais sensíveis. O Folisuper 600 BR[®] provocou alterações significativas nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GST e GPx, assim como no conteúdo de GSH e nos níveis de HP, estabelecendo um quadro de estresse oxidante.

Os efeitos subletais de intoxicação mais comumente observados em peixes são alterações comportamentais, principalmente as que estão relacionadas ao padrão de natação. A redução da performance natatória observada nos peixes expostos ao metil paration pode ser decorrente da inibição da AChE pelo organofosforado (AGUIAR et al., 2004), da grande demanda energética para suportar os processos de desintoxicação e reparos (RAO & RAO, 1981; HEATH, 1995) e/ou da diminuição da atividade metabólica em resposta ao agente estressor (WENDELAAR-BONGA, 1997).

Substâncias que atuam no sistema nervoso, como os OPs, podem ter um marcado efeito não somente na atividade espontânea, mas também na velocidade de natação. KUMAR et al. (1998) observaram redução da atividade natatória em peixe arco-íris (*Melanotaenia duboulayi*) exposto ao OP profenofós e sugeriram uma relação clara entre a depressão da AChE e as respostas comportamentais.

O processo de transformação do metil paration em paraoxon no retículo endoplasmático dos hepatócitos afeta diretamente a morfologia dessas células (RODRIGUES & FANTA, 1998; MACHADO & FANTA, 2003), o que pode contribuir, em alguma extensão, para a diminuição do IHS observado nos peixes do grupo exposto ao MP. RODRIGUES et al. (2001) verificaram alterações como migração lateral do núcleo dos hepatócitos, núcleos com diferentes diâmetros e diferentes graus de densidade, picnose e necrose em fígado de curimatás (*Prochilodus lineatus*) expostos a $0,2 \mu\text{L.L}^{-1}$ do OP triclorfon 500 g.L^{-1} .

Diminuições no IHS também podem refletir a depleção de reservas energéticas como o glicogênio hepático em resposta ao agente estressor (WENDELAAR-BONGA, 1997). Essa idéia foi corroborada por AGUIAR et al. (2004), que observaram uma redução de cerca de 80% no glicogênio hepático em matrinxãs expostos a 2 ppm de Folidol 600 BR[®], outra marca da formulação comercial do metil paration. RAO & RAO (1981) investigaram os efeitos da exposição a 0,9 ppm de metil paration, por 48 horas, sobre a síntese de derivados lipídicos em músculo, brânquias, fígado e cérebro de *Tilapia mossambica*. Análises quantitativas mostraram tanto uma diminuição no conteúdo total de lipídios e fosfolipídios quanto um aumento nos ácidos graxos livres. Baseados em tais resultados, estes autores sugeriram que há um aumento na demanda energética dos peixes nessa condição, o que também poderia estar contribuindo para a redução do peso do fígado e do IHS observado nos peixes expostos ao MP em nosso trabalho.

Durante a realização dos nossos experimentos foram observados aumentos na concentração de amônia e nitrito, na alcalinidade, dureza e no pH da água com metil paration em relação à água do controle, conforme também verificado nos ensaios de toxicidade feitos por AGUIAR (2002) trabalhando com o mesmo pesticida. A tendência de aumento da amônia na água pode ser resultado da degradação da molécula de metil paration, que contém nitrogênio em sua estrutura, ou do aumento da excreção dos peixes por ação do pesticida. Entretanto, apesar do aumento na sua concentração, a amônia na água ficou abaixo da faixa de tolerância para a maioria dos peixes ($0,6$ a $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) (SIPAÚBA-TAVARES, 1994).

O metil paration pode ser degradado em água e um dos produtos dessa degradação é o *p*-nitrofenol (JOKANOVIC et al., 2001) que, por sua vez, pode ser convertido

em nitrito e gás carbônico (SETHUNATHAN, 1989). Isso foi corroborado pelo aumento significativo nos níveis de nitrito na água com metil paration.

Além disso, esse aporte de CO₂ poderia deslocar o equilíbrio do tampão bicarbonato, favorecendo a formação de íons bicarbonato e carbonato. Como estes íons representam a maior parte da alcalinidade, que é a capacidade da água em neutralizar ácidos, é de se esperar um aumento desta propriedade química com a adição do MP. Por outro lado, sendo a dureza da água determinada pela quantidade de sais de Ca²⁺ e Mg²⁺ estritamente ligados aos íons carbonato, uma vez que a concentração destes íons aumente, a dureza tende a aumentar.

A dureza carbonatada, por sua vez, está diretamente relacionada ao pH. Quanto maior a dureza da água, maior será a tendência de que o pH aumente, pois a dureza serve como uma barreira para que o pH não tenha uma alteração descontrolada. Isso é confirmado pelos resultados de elevação do pH da água com metil paration observados neste experimento.

Entretanto, não há muitos estudos na literatura que relacionem o efeito do pesticida nas características físicas e químicas da água.

As atividades da SOD e da CAT aumentaram após 96 horas de exposição a 2 ppm de Folisuper 600 BR[®] em fígado, músculo branco, brânquias e eritrócitos de *B. cephalus*. As enzimas SOD e CAT estão relacionadas quanto às suas funções, uma vez que a SOD dismuta o radical ânion superóxido em H₂O e H₂O₂ e este último, por sua vez, é degradado pela ação da catalase. Devido ao efeito inibitório sobre a formação das ERO, o sistema SOD-CAT proporciona a primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio (PANDEY et al., 2003) e é comumente usado como biomarcador indicativo da produção desses radicais livres (REGOLI et al., 2003; VAN der OOST et al., 2003). Atividades elevadas destas enzimas provavelmente constituem uma resposta ao aumento de geração das ERO iniciado pela toxicidade do pesticida (JOHN et al., 2001).

Dessa maneira, a indução do sistema SOD - CAT promovida pela exposição ao MP pode ser interpretada como uma adaptação deste sistema no sentido de compensar o aumento da produção de radical superóxido e, conseqüentemente, do peróxido de hidrogênio nos sítios de formação. Essa idéia é corroborada por DIMITROVA et al. (1994), que descreveram uma indução simultânea das atividades da SOD e da CAT em carpa, *C. carpio*, expostas ao zinco. Entretanto, a atividade dessas enzimas em peixes também pode diminuir após a exposição a xenobióticos, conforme relatado por LIVINGSTONE (2001). A indução desse sistema de proteção, após a exposição a agentes indutores da produção das ERO, pode ser uma resposta adaptadora importante a agressões não-letais destas ERO. A SOD e/ou a CAT podem intervir antes da reação lesiva inicial das primeiras

espécies reativas de oxigênio (MOSLEN, 1995). No presente estudo, essa resposta adaptadora do sistema SOD-CAT nos eritrócitos e no fígado foi suficiente para evitar aumentos na peroxidação lipídica após a exposição ao organofosforado.

O aumento da atividade da SOD e da CAT, induzido pelo metil paration, em *B. cephalus* indica um elevado “status” antioxidante na tentativa de neutralizar os impactos das ERO formadas. Segundo ALVES et al. (2002), a exposição a pesticidas pode induzir condições pró-oxidantes que desencadeiam, por sua vez, respostas como o aumento na atividade das enzimas antioxidantes.

Por outro lado, a atividade da GPx nas brânquias e no músculo branco diminuiu significativamente após a exposição de *B. cephalus* ao metil paration, em relação ao controle. Entretanto, tal redução não foi observada no fígado. A diminuição da atividade da GPx observada nesse experimento nas brânquias e no músculo branco poderia estar relacionada à produção excessiva de $O_2^{\bullet-}$, que conforme BAGNASCO et al. (1991) é capaz de inibir a atividade da GPx, ou a uma ação direta do pesticida na síntese enzimática (BAINY et al., 1993).

Embora poluentes ambientais possam aumentar a atividade da GPx, como observado em alguns estudos (ALMEIDA et al., 2002; SAYEED et al., 2003; ZHANG et al., 2004), FATIMA et al. (2000) relataram uma baixa atividade da GPx em diferentes tecidos de peixes após a exposição a efluentes de fábrica de papel, indicando uma ineficiência desses órgãos em neutralizar os impactos dos peróxidos. Redução semelhante na atividade da GPx em fígado de rato foi observada após 90 dias de tratamento com o pesticida organoclorado lindane (BAINY et al., 1993). Similarmente, o inseticida organofosforado malation reduziu a atividade da GPx em eritrócitos de camundongo (YARSAN et al., 1999). A inibição da atividade da GPx também foi observada após o tratamento combinado com o herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e com o inseticida organofosforado azinfosmetil em cérebro de carpa, *C. carpio* (ORUC et al., 2004) e em fígado de tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (ORUC & UNER, 2000).

A atividade da enzima GPx pode ser reduzida por meio de “feedback” negativo do excesso de substrato ou pelo próprio dano oxidante (TABATABAIE & FLOYD, 1994). A diminuição da atividade GPx após a exposição ao MP, observado em nosso trabalho, poderia indicar que a quantidade de hidroperóxidos, resultante do processo de peroxidação lipídica no músculo branco e nas brânquias, poderia ter ultrapassado a capacidade antioxidante desta enzima (REMACLE, et al., 1992).

Existe uma polêmica em relação ao papel da CAT e da GPx no processo de desintoxicação do H_2O_2 . Se consideradas as características cinéticas, o H_2O_2 poderia ser metabolizado preferencialmente pela GPx, que apresenta baixo K_m para este substrato

comparativamente à CAT. Esta, por sua vez, seria mais importante na desintoxicação do H_2O_2 quando este composto estivesse presente em altas concentrações, como por exemplo, na exposição a poluentes. Contudo, a afirmação da maior participação de uma enzima em relação à outra, baseada apenas em suas afinidades pelo H_2O_2 , pode levar a erros na interpretação do papel fisiológico de cada tipo enzimático. Os resultados obtidos no presente estudo suportam a idéia de que estas enzimas são igualmente importantes na manutenção dos níveis basais de H_2O_2 , apresentando uma interdependência funcional, uma vez que a diminuição da atividade da GPx no músculo branco e nas brânquias dos peixes expostos ao MP não foi compensada por aumentos nas atividades da CAT nestes tecidos, resultando em um saldo suficientemente positivo de H_2O_2 , capaz de elevar os níveis de HP.

A GST está envolvida nos processos de desintoxicação de xenobióticos, incluindo o metil paration (JOKANOVIC, 2001). Esta enzima exerce um importante papel na proteção dos tecidos contra o estresse oxidante (FOURNIER et al., 1992; BANERJEE, 1999). O aumento da atividade da GST nos tecidos pode indicar o desenvolvimento de um mecanismo de defesa para tentar combater os efeitos do metil paration, o que pode se refletir em uma proteção mais eficiente à toxicidade do organofosforado. Corroborando essas idéias, o aumento da atividade da GST no fígado, brânquias e músculo branco de matrinxã, após a exposição ao metil paration, sugere um aumento nos processos de desintoxicação. A GST tem sido apontada como um biomarcador útil na avaliação do impacto ambiental causado por xenobióticos orgânicos geradores de estresse oxidante (RODRIGUEZ-ARIZA et al., 1991; LIVINGSTONE, 1998). A atividade da GST foi mais elevada no fígado em comparação com as atividades em brânquias e músculo branco, o que indica uma função hepática efetiva no processo de desintoxicação desses xenobióticos (BASHA & RANI, 2003). O aumento da atividade da GST em fígado, brânquias e músculo branco após 96 horas de exposição a 2ppm de metil paration foi acompanhado por uma concomitante redução nos níveis de GSH.

A GSH tem papel central na desintoxicação de compostos eletrofílicos e na prevenção do estresse oxidante celular (HASSPIELER et al., 1994; SIES, 1999). A redução significativa no conteúdo de GSH dos tecidos (fígado, brânquias, músculo branco e sangue) de *B. cephalus* após a exposição ao metil paration poderia ter sido causada tanto por um aumento na utilização da GSH, que estaria sendo convertida a glutationa oxidada (GSSG), quanto pela inibição de sua síntese no fígado, ou ainda por uma ineficiência na regeneração desta molécula pela glutationa redutase.

Durante um processo moderado de estresse oxidante, os níveis de GSH poderiam aumentar como uma resposta adaptadora por meio do aumento de sua síntese. Entretanto, o estresse oxidante severo pode reduzir os níveis de GSH por prejudicar os mecanismos

adaptadores (ZHANG et al., 2004). De acordo com ELIA et al. (2003), a depleção da GSH pode limitar a capacidade da célula em seqüestrar radicais livres, aumentando o potencial oxidante de maneira geral. A GSH pode ser perdida de modo irreversível em situações de estresse oxidante muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (UHLIG & WENDEL, 1992).

Se, de fato, grande parte da ação da GSH é obtida pela indução das enzimas que a usam como substrato, é necessária a manutenção do nível de GSH para manter a ação funcional destas enzimas (JONES, 1995). Além disso, variações nos níveis de glutathiona afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA (MEISTER & ANDERSON, 1983; DENEKE & FANBURG, 1989), uma vez que a regulação redox de sinais dependentes de receptores de membrana e vários sinais de transcrição são influenciados pelo nível intracelular de GSH (DROGE, 2002).

Um dos papéis do ciclo redox da GSH e enzimas que compõem seu metabolismo é o de manter os níveis de hidroperóxidos lipídicos controlados, para evitar danos celulares provenientes do ataque das ERO (ROVER JÚNIOR, 2001).

A depleção de 20 a 30% dos níveis normais de GSH prejudica o sistema de defesa celular contra ações tóxicas tanto de espécies reativas de oxigênio como de intermediários biológicos reativos, o que pode levar à injúria e morte celular (LIEBLER & REED, 1997). Esta diminuição dos níveis de GSH reflete, provavelmente, um aumento na produção de oxidantes, num grau que excederia a capacidade de desintoxicação pela GSH (BRAY & TAYLOR, 1993; MEISTER, 1995).

Quando em contato com alguns poluentes, como o metil paration, as células dos peixes usualmente tentam removê-los por conjugação direta com a GSH ou pela ação da GST, o que diminui os níveis de GSH. A GST utiliza a GSH no processo de desintoxicação de xenobióticos. A redução do conteúdo de GSH observada no presente trabalho após a exposição ao MP é, provavelmente, uma indicação de sua exaustão no processo de biotransformação de fase II, confirmada pelo aumento da atividade da GST. Nesta circunstância, parece que a depleção da GSH aumenta o risco de estresse oxidante devido à redução da capacidade de proteção, desde que uma possível sobrecarga oxidante poderia induzir um aumento na atividade da SOD e da CAT, como observado neste estudo.

A diminuição dos níveis de GSH foi acompanhada pela diminuição da atividade da GPx. Usando GSH como agente redutor, a enzima GPx catalisa a redução do H_2O_2 ou de peróxidos orgânicos em água ou em compostos alcoólicos estáveis, respectivamente. A atividade da GPx depende da presença da GSH, que é oxidada nesse processo, e, assim, a atividade da GPx pode ser influenciada pelos níveis de GSH. A diminuição da atividade da

GPx pode, portanto, também estar relacionada a uma diminuição na disponibilidade de GSH, a qual é necessária para reduzir os impactos das ERO (CHEUNG et al., 2004).

HAI et al. (1997) observaram uma diminuição nos níveis de GSH hepático e muscular em carpa após 24 horas de exposição a 1 e 5 mg.L⁻¹ do inseticida diclorvos. Este organofosforado também reduziu os níveis de GSH e inibiu a atividade tanto da AChE como da GPx em vários tecidos de rato (JULKA et al., 1992). Em casos de envenenamento humano, o organoclorado lindane e o organofosforado malation também induziram uma diminuição no conteúdo de GSH sanguíneo (BANERJEE et al., 1999).

O fígado é a principal fonte de GSH plasmática (KAPLOWITZ et al., 1985). Portanto, com a redução do conteúdo hepático de GSH, uma menor quantidade deste tripeptídeo seria exportada para o plasma, o que poderia diminuir a disponibilidade da glutatona para tecidos extra-hepáticos como músculo e brânquias, levando à exaustão de GSH nestes tecidos. Assim, como o restabelecimento do conteúdo de GSH no músculo e nas brânquias é mais difícil que no fígado, as reduções do conteúdo de GSH nestes tecidos seriam melhores biomarcadores de exposição a poluentes em relação ao fígado (PEÑA-LLOPIS et al., 2003). Essa idéia é corroborada pelos resultados do presente trabalho, em que o conteúdo de GSH hepático sofreu diminuição significativa acompanhada de reduções também significativas no sangue, músculo branco e brânquias dos matrinxãs após a exposição ao MP. Assim, simultaneamente com a utilização da GSH por sistemas enzimáticos de desintoxicação, a hipótese de redução de sua síntese no fígado com a diminuição na exportação de GSH para o plasma e o conseqüente aporte insuficiente para os tecidos não pode ser descartada, mesmo que os mecanismos de síntese da GSH não tenham sido investigados no presente estudo.

Outro fator que também não pode ser descartado é a possibilidade do organofosforado inibir a glutatona redutase, que é responsável pela manutenção da GSH a partir da redução da glutatona oxidada. PEÑA-LLOPIS et al. (2003) verificaram que a exposição por 96 horas a 1,5 ppm do organofosforado diclorvos inibiu a atividade da glutatona redutase em fígado de enguia, *Anguilla anguilla*.

A peroxidação lipídica vem sendo apontada como o maior contribuinte para a perda das funções celulares sob condições de estresse oxidante (STOREY, 1996). Vários estudos mostram que a peroxidação lipídica nos organismos aquáticos é induzida por uma variedade de poluentes ambientais (PLOCH et al., 1999; AHMAD et al., 2000; WILHELM-FILHO et al., 2001; OAKES & VAN der KRAAK, 2003; OAKES et al., 2004). Considerando que a reação típica durante o dano oxidante causado pelas ERO envolve a peroxidação de ácidos graxos insaturados, nossos resultados claramente mostraram que 96 h de exposição ao metil paration provocou estresse oxidante em *B. cephalus*, com aumentos significativos dos

valores de HP nas brânquias e no músculo branco. Esse aumento da produção de HP sugere que o dano oxidante induzido pelas ERO pode ser um dos principais efeitos tóxicos do metil paration.

Uma vez que a lipoperoxidação é considerada um indicador útil do dano oxidante de componentes celulares, nossos resultados sugerem que a exposição ao metil paration aumentou a síntese das ERO no músculo branco e nas brânquias de matrinxã e que as defesas antioxidantes não foram totalmente eficazes na neutralização efetiva desses radicais, desencadeando assim, o processo de peroxidação lipídica. A LPO também foi observada no plasma dos peixes expostos ao MP.

De acordo com ZHANG et al. (2004), a GPx exerce um efeito importante contra a peroxidação lipídica, uma vez que está envolvida preferencialmente na remoção de peróxidos orgânicos, e, em pequena extensão, na remoção de H₂O₂. Dessa forma, a GPx tem um papel especialmente importante na proteção de membranas contra danos decorrentes da peroxidação lipídica (VAN der OOST et al., 2003). Essa observação sugere que a principal função da GPx está na terminação da propagação da cadeia de radicais (VAN der OOST et al., 2003). Neste contexto, a inibição da atividade da GPx observada no músculo branco e nas brânquias, no presente trabalho, poderia refletir uma possível falha dos mecanismos de defesa antioxidante que seria responsável pelo aumento dos níveis de HP.

Apesar de não ter sido observada inibição da atividade da GPx plasmática, o aumento significativo dos níveis de HP no plasma de *B. cephalus* expostos ao MP pode ser decorrente da oxidação das lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL). A lipoperoxidação das LDL pode ocorrer por ação das ERO, que são capazes de difundir-se dos tecidos para o sangue como ocorre com o H₂O₂, ou ainda, por ação dos produtos da peroxidação lipídica dos tecidos como malondialdeídos, cetonas e epóxidos (HABERLAND & SMITH, 1995), que são mais estáveis e podem atravessar a membrana celular e atingir o plasma (LIMA et al., 2002).

Embora os processos de desintoxicação ocorram principalmente no fígado, o músculo esquelético também está envolvido nesse processo. As células musculares expressam diferentes tipos de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, incluindo a citocromo P450 (OTTO & MOON, 1995; BAINY et al., 1999; SMITH et al. 2000) e glutathione S-transferase (HUSSEY et al. 1991; VAN der WEIDEN et al., 1992; NAM et al., 2005). Ainda que haja uma quantidade relativamente menor de enzimas no músculo esquelético em relação ao fígado, os processos de desintoxicação que ocorrem no músculo devem ser considerados importantes porque este tecido representa uma alta porcentagem da massa corpórea.

As brânquias, por apresentarem uma larga área superficial e grande permeabilidade, são os sítios primários de absorção e de ação de xenobióticos como o metil paration (SANCHO et al., 1997). Dessa maneira, é condizente encontrar um alto nível de HP assim como uma diminuição da atividade da GPx e do conteúdo de GSH nas brânquias após a exposição ao metil paration. MACHADO & FANTA (2003) mostraram que a exposição a 1 e a 7 ppm de metil paration por 96 horas causou enrugamento e hiperplasia do epitélio branquial e, conseqüentemente, alterações na superfície de trocas gasosas e iônicas do peixe de água doce *Metynnis roosevelti*.

Em órgãos como as brânquias, que estão mais expostas aos danos provocados pela produção das ERO, pode ocorrer, como um mecanismo de defesa, a difusão do peróxido de hidrogênio para o sangue, onde reage com a CAT eritrocitária, uma enzima altamente específica (BORELA & VARELA, 2004). O peróxido de hidrogênio pode ainda se difundir diretamente para a água, via brânquias, de forma semelhante à excreção da amônia, um mecanismo aparentemente comum nos peixes como uma possível via de desintoxicação do H_2O_2 . WILHELM-FILHO et al. (1994) demonstraram a capacidade de excreção do H_2O_2 pelas brânquias no guarú, *Poecilia velliifera*. Este composto pode difundir-se livremente através das membranas das células (FREEMAN & CRAPO, 1982) e, além disso, possui estabilidade e tempo de vida médio suficiente para percorrer as distâncias existentes entre os sítios de sua formação nos diferentes tecidos até a região branquial, por onde seria excretado (PRYOR, 1986). Apesar deste mecanismo não ter sido analisado no presente experimento, é possível que o H_2O_2 , não metabolizado pela CAT e pela GPx, possa ter sido eliminado por esta via. O H_2O_2 que estaria sendo difundido dos tecidos para o sangue, ou mesmo gerado pelas altas atividades da SOD e da CAT nos eritrócitos, dos peixes expostos ao MP poderia ser excretado diretamente, via brânquias, como um mecanismo de contribuição de desintoxicação desse composto. Como o radical OH^* - principal iniciador da cascata de peroxidação lipídica - pode ser produzido a partir do H_2O_2 pela reação de Fenton, aumentos significativos na peroxidação lipídica nos eritrócitos poderiam ser evitados pela excreção direta do H_2O_2 via brânquias. A oxidação dos eritrócitos tem sido estudada extensivamente como um modelo de dano oxidante de biomembranas. De acordo com KONDO et al., (1997) e RACEK et al. (2001), as ERO atacam a membrana dos eritrócitos causando a oxidação de lipídios e proteínas e, eventualmente, hemólise.

Estudos sobre os efeitos do endossulfan e de efluentes de fábrica de papel em peixes vêm mostrando que as brânquias são os órgãos mais sensíveis a peroxidação lipídica induzida por esses xenobióticos e seu potencial antioxidante é fraco em relação aos demais órgãos (FATIMA, 2000; PANDEY et al., 2001; SAYEED et al., 2003).

Os organofosforados podem aumentar a peroxidação lipídica por meio da interação direta com as membranas celulares (HAZARIKA et al., 2003). Entretanto, YANG et al. (1996) e YANG & DETTBARN (1996), estudando os efeitos do organofosforado diisopropilfosfofluoridato (DFP), sugeriram que a hiperatividade colinérgica induzida pela inibição da acetilcolinesterase poderia desencadear o processo de acumulação das ERO, levando à peroxidação lipídica e acarretando injúrias celulares. Isto poderia contribuir para os altos níveis de HP observados nas brânquias e no músculo branco de matrinxãs expostos ao metil paration no presente estudo.

O conteúdo de HP hepático não se alterou após a exposição ao metil paration, indicando que este órgão resiste ao estresse oxidante por meio de seus mecanismos de defesa antioxidantes, prevenindo dessa forma, aumentos significativos no processo de peroxidação lipídica. Diferentemente da maioria das espécies de peixes da bacia amazônica, um alto conteúdo de vitamina E foi encontrado no fígado de *Brycon cephalus* (WILHELM-FILHO & MARCON, 1996).

A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel que desempenha uma função essencial na proteção contra a peroxidação lipídica (GONZALEZ-FLECHA et al., 1991), eliminando tanto o oxigênio “singlet” como os radicais hidroxil e peroxil. A vitamina E constitui-se, provavelmente, no inibidor mais importante da reação em cadeia da peroxidação lipídica em peixes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Esse alto nível de vitamina E presente no fígado de matrinxã possivelmente constitui uma proteção adicional contra o processo de peroxidação lipídica e, conseqüentemente, poderia prevenir aumentos significativos nos níveis de HP hepáticos nos peixes expostos ao MP.

No presente trabalho, resposta tecido-específicas, relacionadas às defesas antioxidantes e aos danos oxidantes, foram observadas após 96 horas de exposição a 2 ppm de Folisuper 600 BR®. Os resultados indicam que as brânquias e o músculo branco são os órgãos mais sensíveis ao estresse oxidante em comparação com o fígado em *Brycon cephalus*. As principais causas dessas diferenças poderiam ser atribuídas a diferentes taxas de geração das ERO e a diferentes potenciais antioxidantes dos tecidos (WINSTON, 1991; FATIMA et al., 2000).

Os mecanismos antioxidantes das brânquias e do músculo branco não foram tão eficientes quanto àqueles do fígado, o que pode ter aumentado a vulnerabilidade desses tecidos às ERO, levando ao aumento da peroxidação lipídica. Após a exposição ao MP, a relação HP/CAT+GPx para estes tecidos aumentou em relação ao controle. Isso demonstra claramente que a contribuição destas enzimas não foi efetiva para reduzir a relação oxidante/antioxidante, levando a um saldo positivo dos níveis de HP nestes tecidos. O aumento da atividade da SOD, combinado com a diminuição da GPx no músculo branco e

nas brânquias de *B. cephalus* exposto ao MP, provavelmente resultou em um aumento na produção de H_2O_2 , convertendo-se numa situação de elevado estresse oxidante. As drásticas diminuições nos níveis de GSH, resultante do aumento da atividade da GST ou de uma provável redução da GR, e as elevações no conteúdo de HP no músculo e nas brânquias estariam, dessa maneira, refletindo esse dano oxidante.

O presente experimento demonstrou que 2 ppm de metil paration 600 g.L^{-1} induz estresse oxidante em *B. cephalus*. É evidente que, do ponto de vista eco-fisiológico, o uso do inseticida organofosforado metil paration na agricultura e na piscicultura deveria ser cuidadosamente avaliado, uma vez que o inseticida tem potencial para prejudicar não somente a comunidade de peixes em ambientes naturais como também o rendimento do cultivo, podendo levar até a alterações no sabor e na qualidade da carne (PEARSON et al., 1977; KANNER, 1994). Os resultados do protocolo experimental I sugerem que os parâmetros analisados poderiam ser bons biomarcadores de exposição ao estresse oxidante induzido pelo MP. Entretanto, experimentos utilizando concentrações menores de metil paration são necessários para validar tais parâmetros como biomarcadores de estresse oxidante em programas de monitoramento ambiental de larga escala.

4.2 Protocolo Experimental II

O papel da dieta sobre o efeito deletério dos radicais livres varia, consideravelmente, com o tipo de organismo testado, a idade, o estado fisiológico e a dieta ingerida. A toxicidade do oxigênio é influenciada pela presença, na dieta, de diferentes quantidades das vitaminas A, C e E, carotenóides, ferro, selênio e ácidos graxos polinsaturados (SALONEN, 1991; ASCHERIO et al., 1992). O estresse oxidante pode ser causado pelo desbalanço nutricional devido à deficiência de antioxidantes, excessiva quantidade de pró-oxidantes, ou ambas (CHOW, 1991; TAYLOR & BRAY, 1991).

A interação entre micronutrientes indica que há necessidade de uma ingestão ideal para todos os nutrientes que são antioxidantes, simultaneamente, pois, em caso de uma ingestão marginal de um deles, pode ocorrer subsequente decréscimo na bioatividade do outro micronutriente essencial, ainda que consumidos em níveis recomendados (MACCAY et al., 1982). Tem-se demonstrado que, em animais, a combinação do Se com outros antioxidantes reduz o estresse oxidante (ATROSHI et al., 1999; KOWLURU et al., 2000).

O requerimento mínimo de selênio para peixes depende muito do nível de vitamina E na dieta, uma vez que há um sinergismo entre eles, e esse requerimento varia entre $0,2$ a $0,5\text{ mg.Kg}^{-1}$ de dieta (WATANABE et al., 1997).

O selênio é um micronutriente essencial e, em vertebrados superiores, sua deficiência ocorre quando os níveis estão abaixo de 2 ppm (ALLAWAY, 1973) enquanto que a selenose (excesso de Se) é evidente se este micronutriente exceder 5 ppm (DEORE et al., 2005). A deficiência de Se, tanto em animais como em humanos, leva a várias anormalidades que incluem a diminuição de crescimento, diminuição da atividade da GPx hepática, degeneração muscular, perda de apetite, mortalidade, letargia, infertilidade, entre outros (GATLIN & WILSON, 1984; WATANABE et al., 1997).

Por outro lado, a descrição clássica da toxicidade do selênio em animais, feita por ROSENFELD & BEATH (1964, *apud* COMBS & COMBS, 1986), aponta três tipos clínicos de intoxicação: a) selenose aguda, caracterizada pela exposição a altas doses de selênio dentro de um curto período de tempo, com sinais severos de toxicidade que são manifestados rapidamente como letargia, vômito, dispnéia, espasmos musculares, necrose e degeneração muscular, falha respiratória e morte; b) selenose sub-aguda, descrita como resultado de uma exposição a grandes doses de selênio por um longo período de tempo, resultando em manifestações de sinais neurológicos como ataxia e insuficiência respiratória, e c) selenose crônica, caracterizada pela exposição a níveis moderados de selênio por períodos de semanas ou meses, cujos maiores efeitos são as lesões dérmicas, podendo haver também anorexia, com acentuada perda de peso, mortalidade e calcinose renal. Além disso, exoftalmia, catarata, alterações patológicas no fígado, rim, coração e ovário e deformidades teratogênicas foram relatadas por LEMLY (2002) como implicações e sintomas da toxicidade do selênio em peixes.

No presente trabalho, não foram evidenciados sintomas de selenose nos matrinxãs arraçados com 1,5 mg de Se, sugerindo que essa concentração não foi tóxica durante os 60 dias de tratamento. Por outro lado, os animais que receberam dieta suplementada com selênio mostraram um melhor crescimento em relação àqueles que receberam dieta sem selênio, os quais mostraram um padrão natatório atípico para espécie, canibalismo após 50 dias de arraçoamento e alteração na coloração.

Para peixes, a concentração de selênio na dieta associada à redução do crescimento e à sobrevivência está geralmente próxima a 3 $\mu\text{g.g}^{-1}$, enquanto que os resíduos de selênio corporal ficam em torno de 4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (HAMILTON, 2004). Esses dados reforçam a idéia de que o nível de 1,5 mg de Se por Kg de dieta fornecido por um período de 60 dias não foi prejudicial para *B. cephalus*, uma vez que tais níveis não foram encontrados nos tecidos. Além disso, a concentração de Se nesta dieta ficou abaixo de 3 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

O canibalismo é freqüente em algumas espécies de peixes como em *Brycon* ssp, especialmente em piscicultura onde são incapazes de escapar da predação via migração ou

segregação de habitat. O canibalismo é um fenômeno complexo que envolve tanto fatores intrínsecos (genéticos) quanto fatores populacionais e ambientais (temperatura, fotoperíodo, dieta) (BARAS & JOBLING, 2002). SMITH & RCAY (1991) observaram uma correlação negativa entre a disponibilidade das fontes de alimento e o impacto do canibalismo. Qualquer restrição alimentar (quantitativa, temporal e espacial) pode desencadear ou aumentar o canibalismo como resultado tanto da escassez alimentar como do crescimento diferenciado (KESTEMONT & BARAS, 2001). Assim, o canibalismo exibido pelos matrinxãs que receberam dieta sem selênio pode ser decorrente de um baixo “status” energético, até mesmo porque este mineral regula a ação dos hormônios tireoideanos que, por sua vez, influenciam a utilização dos nutrientes e o crescimento dos peixes (MacKENZIE et al., 1998). Em mamíferos, a alteração na disponibilidade dos hormônios tireoideanos influencia os comportamentos de agressividade (DENICOFF et al. 1990; DODMAN et al., 1995). No entanto, não há dados na literatura sobre este aspecto em peixes, mas tal hipótese não pode ser descartada.

No presente estudo, observou-se que os matrinxãs que receberam dieta sem Se apresentaram uma menor ingestão alimentar em comparação àqueles que receberam dieta suplementada com 1,5 mg de Se por Kg de ração, embora este parâmetro não tenha sido quantificado, mas somente inferido pela sobra de ração no fundo do tanque. PEDRO et al. (1995) encontraram uma redução concomitante da ingestão alimentar e dos níveis plasmáticos de T_3 em peixe dourado, *Carassius auratus*, indicando que a tireóide pode influenciar também o comportamento alimentar dos peixes. Em galinhas, os efeitos da ausência de selênio e de sua suplementação sobre os níveis dos hormônios tireoideanos estão envolvidos na seleção de alimento, por influenciarem a sensibilidade ao sabor do mesmo (ZUBERBUEHLER et al., 2006). Nesse estudo, a diminuição dos níveis de T_3 causada pela deficiência de selênio pode ter tornado as galinhas mais sensíveis ao sabor do alimento, de forma que desenvolvessem aversão à dieta com baixos níveis de selênio. Em ratos com hipotireoidismo, alguns estudos também mostraram uma alteração na preferência por determinados sabores e no paladar destes animais (BROSVIE et al., 1992; GORDON et al., 1992).

Os matrinxãs, na ausência de Se na dieta, exibiram uma coloração diferente daqueles que receberam ração suplementada com Se, o que pode ser decorrente das alterações nos hormônios tireoideanos que são responsáveis pela pigmentação da pele e pelos padrões de coloração nos peixes (HUANG et al., 1998; JESUS et al., 1998). Adicionalmente, o comportamento natatório típico para matrinxã foi alterado na ausência de Se na dieta e os peixes exibiram baixa velocidade de natação e movimentos aleatórios e a natação em círculo foi abolida. POSTON & COMBS (1979) verificaram que a dieta deficiente

deste mineral, oferecida por 26 semanas, causou letargia, perda de apetite, redução no tônus muscular e mortalidade em salmão-do-atlântico (*S. salar*), sendo que uma melhora no crescimento foi obtida quando a dieta foi suplementada com 0,15 mg de Se kg⁻¹ de ração.

Segundo BEHNE (1983), os níveis de selênio em alguns tecidos podem ser um indicativo do selênio corporal total, incluindo os modos de reserva. Os tecidos de maior interesse são o fígado e o músculo esquelético, por compreenderem as maiores reservas, contendo aproximadamente 30% e 40%, respectivamente, do total do Se corporal.

O período de 60 dias de suplementação com selenito de sódio na dieta foi suficiente para acumular selênio no fígado e nas brânquias dos matrinxãs, mas não no músculo branco. Há uma tendência do Se em se acumular em órgãos com atividade metabólica muito intensa (fígado) e esta pode não ser influenciada pelo hábito alimentar, mas sim, pelo modo de incorporação de selênio (via dieta ou água) (SEIXAS, 2004). Grande parte do selênio absorvido é estocada no fígado (UNDERWOOD & SUTLLE, 1999) e, em truta arco-íris, o fígado e o rim mostraram-se os sítios primários de estocagem deste mineral (HAMILTON, 2004).

Adicionalmente, KLEINOW & BROOKS (1986) demonstraram que a meia-vida do Se, independentemente de sua fonte, é maior em tecido muscular. Estes autores observaram que, no peixe "rosy red", *Pimephales promelas*, o Se proveniente do selenito apresentou meia-vida de 19 dias no corpo inteiro e de 41 dias no músculo. Isso permite sugerir que a ausência de diferença na concentração de Se no músculo branco dos matrinxãs que receberam dietas contendo 0 e 1,5 mg de Se pode ser decorrente da depuração incompleta deste mineral nos peixes que não receberam Se, uma vez que, durante o período em que permaneceram nos tanques de alevinagem da estação de piscicultura, os peixes receberam dietas contendo "níveis recomendados" de selênio, presentes nas rações comerciais.

Vários estudos que investigaram a depuração de selênio nos peixes sugerem que a meia-vida do Se é maior que 30 dias (LEMLY, 1982; BENNET et al., 1986; BESSER et al., 1993). Isso poderia justificar os níveis de Se encontrados no fígado, músculo branco e brânquias (11,40; 3,35 e 3,44 µg.Kg⁻¹ de tecido, respectivamente) dos matrinxãs que receberam dieta livre de selênio no presente trabalho.

Além disso, LORENTZEN et al. (1994), estudando o salmão-do-atlântico, revelaram que o selênio proveniente do selenito de sódio ou da Se-metionina em níveis de 1 ou 2 mg por Kg de dieta tiveram o mesmo efeito na promoção do crescimento e manutenção da atividade da glutatona peroxidase. No entanto, as concentrações do mineral no fígado e músculo se comportaram de maneira diferenciada para os dois componentes, sendo que no primeiro órgão houve maior depósito de Se quando com a suplementação com selenito de

sódio enquanto que no músculo, ocorreu maior deposição quando utilizado a Se-metionina. Dessa forma, dependendo da origem da fonte de selênio utilizada na suplementação da dieta, os padrões de acumulação deste elemento podem ser variáveis de acordo com o tecido.

PARIPATANANONT & LOVELL (1997) administraram dietas purificadas a *I. punctatus* e observaram que a absorção de selênio a partir da Se-metionina foi de 91% e a partir do selenito de sódio foi de 63%. WANG & LOVELL (1997) compararam a disponibilidade de Se, o ganho de peso, a atividade da GPx e a concentração do mineral no tecido em relação à fonte deste mineral (Se-metionina, da Se-levedura e do selenito de sódio) em *I. punctatus*. Estes autores encontraram valores de disponibilidade de 336% para o Se-metionina e Se-levedura e 269% para o selenito de sódio. Já para a atividade da GPx, determinaram valores de 147 e 149%, respectivamente, para as fontes orgânicas e inorgânicas. Para a concentração de Se no fígado, encontraram valores de 197 e 184% e, para a concentração muscular, valores de 478 e 453% respectivamente, para as fontes orgânicas e inorgânicas.

No presente trabalho, a exposição ao MP causou aumentos significativos nos níveis de HP em todos os tecidos, exceto no fígado, dos matrinxãs que receberam dieta sem Se. Padrão semelhante foi observado nos peixes do protocolo experimental I submetidos ao MP, os quais receberam ração comercial (0,22 mg Se.Kg⁻¹). A suplementação com 1,5 mg de Se por Kg de dieta, sob a ação do MP, inibiu o aumento ou até mesmo reduziu os níveis de HP nos tecidos analisados. Neste experimento, também foi verificada uma redução na concentração de GSH em todos os tecidos, bem como a diminuição da atividade da GPx no músculo branco e nas brânquias dos animais do grupo MP 0Se, de maneira semelhante ao observado nos peixes do protocolo experimental I expostos ao MP, como discutido anteriormente. Nos peixes expostos ao MP, a suplementação com 1,5 mg de Se também alterou esse padrão, impedindo a redução dos níveis de GSH em todos os tecidos e da atividade da GPx no músculo branco e nas brânquias e aumentando a atividade desta enzima no plasma e nos eritrócitos.

De maneira geral, os demais parâmetros analisados tanto no grupo MP 0Se quanto do grupo MP 1,5Se responderam à exposição ao MP de modo semelhante àqueles dos peixes do protocolo experimental I, que receberam ração comercial (0,22 mg Se.Kg⁻¹).

Em resumo, a suplementação com 1,5 mg Se por Kg de ração inibiu a falha nos níveis de GSH e na atividade da GPx, reduzindo ou mantendo o conteúdo de HP e, conseqüentemente, revertendo o quadro de estresse oxidante induzido pelas 96 horas de exposição a 2 ppm de metil paration tanto nas brânquias quanto no músculo branco de *B. cephalus* arraçados com 0 ou 0,22 mg de Se.

As diminuições no IHS e no peso dos fígados, induzidas pelo MP nos peixes do protocolo experimental I, também foram observadas nos peixes do grupo MP 0Se no protocolo experimental II. Conforme discutido anteriormente, tanto o processo de transformação do metil paration em paraoxon no retículo endoplasmático quanto a depleção de reservas em resposta a uma larga demanda energética exigida pelos peixes nessa condição, poderiam contribuir para a redução das massas hepáticas e, conseqüentemente, dos índices hepato-somáticos. Porém, estas reduções não foram verificadas nos animais arraçoados com 1,5 mg de Se na mesma condição experimental. Desta maneira, a suplementação com 1,5 mg de Se impediu a redução destes parâmetros frente à exposição ao metil paration.

O efeito hepato-protetor do selênio pode ser decorrente de sua atuação na enzima 5' iodotironina deiodinase, enzima que disponibiliza mais T_3 (forma biologicamente mais ativa dos hormônios tireoideanos), embora a atividade desta enzima assim como os níveis de T_3 não tenham sido analisados. O efeito geral dos hormônios tireoideanos consiste em ativar a transcrição nuclear de um grande número de genes. Por conseguinte, um grande número de enzimas, proteínas estruturais, proteínas transportadoras, entre outros componentes, são sintetizados em praticamente todas as células do organismo. O resultado consiste em aumento generalizado da atividade funcional do organismo como um todo (GUYTON & HALL, 2002). Em peixes teleósteos esses efeitos são similares, apesar das diferenças na estrutura da glândula tireóide em relação aos mamíferos. Além disso, apesar do fator liberador de TSH hipotalâmico não ser conhecido em peixes, os hormônios tireoideanos comprovadamente participam do desenvolvimento ontogenético e da reprodução destes animais (YAMANO, 2005).

Os valores de atividade da GPx em brânquias, músculo e plasma foram mantidos e aumentaram significativamente nos eritrócitos e no plasma do grupo MP 1,5Se em relação ao grupo controle. É bem conhecido que o selênio é um antioxidante, não por si só, mas por ser parte integrante da enzima GPx. Em outras palavras, o Se facilita a antioxição enzimática dependente de GSH no sistema celular (SARADA et al., 2002). Além disso, o selenito de sódio é rapidamente incorporado à GPx (WATANABE et al., 1997), cuja atividade responde de forma similar à dietas contendo selenito de sódio ou Se-metionina (OMAYE & TAPPEL, 1974).

BELL & COWEY (1989) compararam a digestibilidade e a biodisponibilidade do selênio em dietas com selenito, Se-metionina e Se-cisteína em salmão-do-atlântico e verificaram que a Se-metionina é mais digestível que as outras fontes de Se. Entretanto, a razão GPx:Se indicou que o selenito e a Se-cisteína são melhores fontes para a GPx plasmática que a Se-metionina.

O aumento significativo da atividade da GPx nos eritrócitos e no plasma pode ser decorrente da maior expressão desta enzima em virtude da maior disponibilidade de Se (ALTAN et al., 1999; ZHANG et al., 2000). Alguns estudos indicam que a suplementação com selênio pode aumentar o nível de expressão do gene da GPx (ALTAN et al., 1999; ZHANG et al., 2000). Sob condições de estresse oxidante, a concentração de Se necessária para aumentar o nível do mRNA da GPx é mais alta do que em condições normais (BORDONI et al., 2003). Em fígado de ratos, houve uma drástica redução nos níveis de mRNA da GPx-1 durante a deficiência de Se causada por dieta com aproximadamente 10% dos níveis de Se recomendados (SACHDEV & SUNDE, 2001).

No presente estudo, o aumento na atividade da GPx nos eritrócitos pode ter sido responsável pelas diminuições significativas nos níveis de HP nestas células, conforme corroborado pela análise de correlação entre os níveis de HP e a atividade da GPx nos eritrócitos dos peixes do grupo MP 1,5Se ($r = -0,80$, $P = 0,03$) (**Apêndice 3**). No plasma, o aumento da GPx pareceu manter os níveis de HP em relação ao controle, não havendo uma correlação negativa entre os dois parâmetros.

De acordo com MEISTER & ANDERSON (1983), as concentrações de GSH plasmáticas são baixas, mas ainda seriam suficientes para permitir a desintoxicação do H_2O_2 e dos hidroperóxidos de lipídios pela GPx plasmática. Entretanto, a atividade da GR plasmática é muito baixa (OMAYE & TAPPEL, 1974) e provavelmente incapaz de regenerar a GSH a uma taxa suficiente para dar suporte à atividade da GPx. Além de sua função na proteção contra a oxidação, a GPx plasmática pode ser o resultado do transporte da GPx dos tecidos, onde sua síntese estaria sendo abundante, para o plasma. Tal síntese abundante pode resultar de estímulos indutores de estresse oxidante e/ou de concentrações de Se nos tecidos em níveis suficientes para aumentar a expressão da GPx (COMBS & COMBS, 1986). Diante disso, neste protocolo experimental, o aumento da GPx plasmática nos peixes do grupo MP 1,5Se poderia ser devido ao transporte de GPx dos tecidos para o plasma. Nos tecidos, a GPx estaria sendo sintetizada em maiores concentrações pela presença do metil paration, indutor de estresse oxidante, e pela maior disponibilidade de selênio. Como houve acumulação significativa de Se no fígado e nas brânquias, esses tecidos poderiam estar apresentando uma maior expressão enzimática, sendo os maiores contribuintes para o aumento da GPx plasmática.

WISE et al. (1993) mostraram que em *I. punctatus* alimentados com ração contendo $0,8 \text{ mg Se.Kg}^{-1}$ (4 vezes o nível de Se recomendado para a espécie, de acordo com o NRC) houve um aumento significativo na atividade da GPx hepática em relação aos animais controle, alimentados com ração contendo $0,2 \text{ mg Se.Kg}^{-1}$. Além disso, os níveis de atividade da GPx hepática nos exemplares que tiveram suas dietas com níveis

recomendados de Se (0,2 mg) foram similares àqueles encontrados nos animais com dieta livre de Se. Em truta arco-íris, a homeostase da GPx plasmática foi mantida com dietas contendo selênio em concentrações acima de $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, tendo sido observada toxicidade na concentração de $13 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ração (HAMILTON, 2004).

SMITH (1995), estudando o efeito do herbicida diquato em ratos, verificou uma potencialização de sua hepatotoxicidade com concomitante diminuição significativa da atividade da GPx em animais alimentados com uma dieta deficiente de selênio. Aparentemente, o papel fundamental da GPx na proteção contra a hepatotoxicidade induzida pelo diquato é devido a sua ação sobre o peróxido de hidrogênio e/ou sobre os hidroperóxido de lipídios.

BORDONI et al. (2003) verificaram que, em culturas de cardiomiócitos de ratos em normóxia, a atividade da GPx aumentou paralelamente com o aumento nas concentrações de selenito de sódio. Esses mesmos autores, submetendo essas culturas celulares à hipóxia e subsequente re-oxigenação (mecanismo conhecido por induzir estresse oxidante em tecido cardíaco), demonstraram que a atividade da GPx também aumentou com um crescente acréscimo de selênio ao meio, mostrando assim, que o Se pode neutralizar danos oxidantes do miocárdio via ação da GPx.

Em linhas gerais, com exceção dos níveis de HP nos eritrócitos e no plasma, os demais parâmetros analisados nos matrinxãs do grupo MP 0Se comportaram-se de maneira semelhante ao observado no grupo MP 0,22Se. As respostas destes parâmetros durante a exposição ao MP foram discutidas anteriormente. Os níveis elevados de HP nos eritrócitos e plasma do grupo MP 0Se podem indicar uma ineficiência do organismo, na ausência de Se, em aumentar e/ou manter a expressão da GPx, que é a principal responsável pelo combate à peroxidação lipídica.

O músculo branco dos peixes do grupo MP 1,5Se não apresentou aumentos significativos na atividade da CAT, ao contrário do observado para os peixes dos grupos MP 0Se e MP 0,22Se. Sob as mesmas condições, também não foi verificada uma diminuição na atividade da GPx muscular que, por sua vez, manteve seus valores semelhantes ao controle (C 1,5Se). Isso mostra a dualidade das enzimas CAT e GPx nos processos de desintoxicação do H_2O_2 relacionados à proteção das membranas. A GPx pode, além de compartilhar a metabolização do H_2O_2 com a CAT, reagir diretamente com os peróxidos orgânicos formados principalmente a partir das membranas, evitando um aumento nos níveis de HP no músculo em resposta a exposição ao MP.

Em culturas de células L1210 de ratos leucêmicos, um aumento compensatório da CAT ocorre durante a deficiência de Se (LIN et al. 1993). Em fígado de rato, a distribuição subcelular da GPx é complementar a da CAT, isto é, cerca de 75% da enzima encontra-se

no citosol e os 25% restantes situam-se na matriz mitocondrial, enquanto a localização da CAT é predominantemente peroxissomal (FLOHÉ, 1982). O compartilhamento funcional entre a GPx e a CAT, na desintoxicação do H_2O_2 , tem sua base na distribuição destas enzimas no interior da célula (CHANCE et al., 1979).

No presente trabalho, a atividade da SOD nas brânquias dos peixes do grupo MP 1,5Se não aumentou significativamente, o que não ocorreu nos peixes dos grupos MP 0Se e MP 0,22Se. Como a expressão da SOD é induzida pela geração de O_2^{\bullet} (URUC & UNER, 2004), uma produção insuficiente destes íons poderia justificar a não alteração na atividade desta enzima nas brânquias dos peixes do grupo MP 1,5Se, reforçando a hipótese de uma ação antioxidante protetora do selênio. Ainda, segundo BLOKHINA et al. (2003), a atividade da SOD pode não se alterar durante o estresse oxidante, a menos que seja detectado um aumento substancial do O_2^{\bullet} e, segundo AGAY et al. (2005), a ausência de Se exerce uma modulação positiva sobre a atividade da SOD em ratos tratados com dietas deficientes deste mineral, corroborando com os resultados do presente estudo.

Além disso, BATTIN et al. (2006) evidenciaram que, *in vitro*, o selênio inibe o dano ao DNA induzido pelo Cu^{2+} , sugerindo um novo mecanismo de atividade antioxidante do Se. Estes autores, examinando a reatividade da selenocisteína com o Cu^{2+} verificaram que há formação de um complexo selenocisteína- Cu^{2+} . Esta capacidade do selênio em complexar-se com o cobre, que é constituinte e co-fator da SOD, também poderia alterar sua atividade.

É bem conhecido que contaminantes ambientais aumentam a produção das ERO nos organismos expostos, levando ao estresse oxidante e, várias ERO, se não neutralizadas, podem causar danos em biomembranas, o que é refletido pelo aumento da peroxidação lipídica. Os níveis de HP no músculo branco e nas brânquias dos peixes do grupo MP 1,5Se não aumentaram significativamente. Este resultado pode ser atribuído à inibição da cadeia de peroxidação lipídica iniciada pela exposição ao pesticida, como observado nos animais dos grupos MP 0Se e MP 0,22Se. Além disso, os peixes do grupo MP 1,5Se não apresentaram as diminuições dos níveis de GSH observadas em todos os tecidos e no sangue dos peixes dos grupos MP 0Se e MP 0,22Se. Desta forma, o Se inibiu a depleção da GSH no músculo e nas brânquias de matrinxãs durante o estresse oxidante induzido pelo metil paration, mostrando um forte efeito antioxidante deste mineral.

Os resultados relativos aos níveis de HP e GSH nos tecidos, bem como a atividade da GPx obtidos no presente trabalho também são corroborados por SARADA et al. (2002), que verificaram que a administração de Se em ratos albinos reverteu o estresse oxidante induzido pela hipóxia. Nesse estudo, animais que receberam selênio e foram submetidos à hipóxia apresentaram reduções significativas nos níveis de MDA no plasma e nos tecidos e

aumentos na concentração de GSH e na atividade da GPx, quando comparados aos animais controle que receberam apenas o veículo.

A glutatona é reconhecida como substrato tanto para as GSH-transferases quanto para as GSH-peroxidases, enzimas que catalizam as reações de desintoxicação de compostos xenobióticos e da antioxição das ERO e de radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). A concentração tissular de GSH pode ser regulada pela dieta e pelo estado nutricional (VANNUCHI et al., 1997). Isto foi inicialmente demonstrado em estudos onde a concentração hepática de GSH era baixa durante períodos de jejum em ratos alimentados com dietas com baixos teores de proteína ou dietas deficientes em aminoácidos sulfurados. A concentração de GSH aumentou quando os animais foram realimentados ou quando receberam dietas suplementadas com aminoácidos sulfurosos.

Outro aspecto interessante na regulação da concentração tissular de GSH é a influência do estado nutricional nas enzimas de sua síntese. O estado nutricional pode influenciar as concentrações tissulares de GSH, afetando o mecanismo de captação do GSH extracelular para tecidos extra-hepáticos, via γ -glutamil transpeptidase (γ -GT), e o transporte plasmático de aminoácidos para dentro dos tecidos (BRAY & TAYLOR, 1993).

O selênio aumenta a disponibilidade de GSH, que é um dos mais abundantes antioxidantes auxiliando a prevenção da peroxidação lipídica responsável por danos celulares (HSU & GUO, 2002; SARADA et al., 2002). Em ratos, foi demonstrado que a proteção do fígado e do rim, conferida pelo selênio, resulta do aumento da capacidade antioxidante da célula, evidenciado pelo aumento das atividades da SOD e GR e elevação no conteúdo de GSH (OTHMAN & EL-MISSIRY, 1998).

A manutenção da concentração de GSH pelo selênio ainda não é um processo bem esclarecido. VIDAL et al (2005) sugerem que o selênio pode manter os níveis de GSH por indução de uma retroalimentação que aumente os níveis de equivalentes redutores como o NADPH ou a síntese de GSH.

A glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é a enzima reguladora da via das pentoses fosfato e uma das principais funções desta via é fornecer o NADPH necessário para manter os níveis intracelulares de GSH (FRIDOVICH, 1998). Alguns estudos sugerem que a atividade da G6PDH pode ser induzida pela dieta e esta indução se daria por meio da regulação hormonal. Neste sentido, foi demonstrado um aumento na atividade da G6PDH em animais que receberam injeções de insulina (NEPOKROEFF, 1974) e de hormônios tireoideanos (MIKSICEK & TOWLE, 1982; COSTA ROSA et al., 1992). YILMAZ et al. (2006) observaram que a suplementação oral com 0,3 mg de Se, durante 30 dias, induziu um aumento significativo na atividade da G6PDH em fígado, rim, baço e coração de ratos. Estes mesmos autores sugerem que este aporte de NADPH seria utilizado para a redução da

GSSG a GSH pela glutathione redutase, mantendo, desta forma, os níveis de GSH necessários à proteção antioxidante. Apesar da atividade da G6PDH não ter sido medida no presente trabalho, a possibilidade da sua indução pela dieta suplementada com selênio e o conseqüente aumento na quantidade de NADPH, que auxiliaria na manutenção dos níveis de GSH, não podem ser descartados.

O tratamento oral com selênio na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ induziu, em ratos, um aumento significativo do conteúdo de tióis totais (-SH) concomitantemente a uma redução da peroxidação lipídica no plasma, fígado, rins e testículos (EL-DEMERDASH, 2004). De acordo com DIMITROV et al. (1987 *apud* EL-DEMERDASH, 2004), o selênio é importante no metabolismo de aminoácidos sulfurosos como a metionina e a cisteína, precursores da síntese de GSH. A biossíntese da glutathione é determinada principalmente pela concentração dos aminoácidos precursores e compete com a síntese protéica pelos aminoácidos disponíveis (ROEHRS et al., 2004). Em linhagens de células Hep G2 de hepatoma humano, 1 μM de selenito de sódio na cultura tende a aumentar a concentração de GSH intracelular (HELMY et al., 2000).

Por outro lado, o selenito de sódio em excesso pode causar a oxidação da GSH gerando, neste processo, o radical superóxido (STEWART et al., 1999). Níveis tóxicos marginais de selênio aumentam os níveis intracelulares de GSH como mecanismo de proteção. Entretanto, quando os níveis tóxicos de selênio são alcançados, acontece um pronunciado estresse oxidante seguido de drástica redução da GSH intracelular, com conseqüente lesão de DNA, proteínas e lipídios (SHEN et al., 2000).

Quando o Se inorgânico está em excesso, a sua combinação com a GSH forma um complexo que é responsável pela hepatotoxicidade e outras injúrias celulares (DEORE et al., 2005). O selênio está envolvido em mecanismos que modificam os resíduos de cisteína das proteínas, formando seleno-trissulfides (S-Se-S), selenilssulfides (S-Se) ou dissulfides (S-S) provocando, portanto, a diminuição da concentração de GSH intracelular e o conseqüente aumento do potencial redox (IP et al., 1991; SPALLHOLZ, 1994; SPALLHOLZ et al., 2001). A redução dos níveis de GSH leva ao acúmulo de peróxidos tóxicos, causando dano tissular e resultando na toxicidade do Se (SPALLHOLZ, 1997). Isso reforça ainda mais a idéia exposta anteriormente de que a concentração de 1,5 mg de selênio a partir do selenito de sódio, utilizada neste protocolo experimental para a suplementação da dieta de matrinxã, não foi tóxica, uma vez que não reduziu os níveis de GSH nos diferentes tecidos analisados.

Os resultados deste experimento demonstraram que a suplementação com selênio, um importante co-fator de um dos principais sistemas de defesa enzimático antioxidante das células – a GPx, pode modular o estresse oxidante induzido pelo MP em matrinxã, por

reduzir os níveis de hidroperóxido de lipídios formados e, dessa forma, preservar o sistema de membranas. Além disso, é capaz de impedir a redução da atividade da GPx e do conteúdo de GSH que ocorrem durante a exposição por 96 horas a 2 ppm do inseticida Folisuper 600 BR®.

A diminuição da relação HP/CAT+GPx no músculo branco e nas brânquias dos peixes do grupo MP 1,5Se, quando comparados ao seu controle (C 1,5Se), indica uma maior contribuição destas enzimas na redução da relação oxidante/antioxidante e caracteriza os efeitos positivos da dieta suplementada com Se frente à exposição ao MP. Esta mesma relação apresentou-se maior nestes mesmos tecidos dos peixes do grupo MP 0Se, quando comparados ao seu controle (C 0Se), num comportamento semelhante àquele observado no protocolo experimental I. Tais resultados indicam um aumento na peroxidação lipídica e, conseqüentemente, o estabelecimento de estresse oxidante, apesar da elevação da atividade da CAT. Ou seja, a falha na atividade da GPx nos peixes que receberam dieta livre de Se, mais uma vez, foi decisiva no aumento dos níveis de HP no músculo e nas brânquias após a exposição ao MP. Estes resultados mostram o efeito benéfico do selênio em aumentar as defesas antioxidantes e a resistência dos tecidos mais sensíveis a lipoperoxidação induzida pelo MP.

Modificações na dieta constituem uma estratégia importante para a manutenção da saúde dos peixes em situações de cultivo. Dessa forma, o selênio pode ser importante na reversão do estresse oxidante induzido pelo metil paration, que é amplamente utilizado em pisciculturas.

4.3 Interação entre Se e MP (Efeito do Se na Resposta ao MP)

Os resultados da interação entre os níveis de selênio e a exposição ao metil paration mostraram que, no fígado, a suplementação com 1,5 mg de Se interferiu no efeito da exposição ao MP em relação ao conteúdo de GSH hepático. Nestes animais, uma maior proporção de GSH poderia estar sendo sintetizada pelo fígado e destinada aos processos de desintoxicação em outros órgãos, via corrente sanguínea.

No músculo branco, a interação observada entre os fatores Se e MP foi evidenciada pelo efeito da suplementação com 1,5 mg de Se na resposta à exposição ao MP, impedindo que o conteúdo de HP e a atividade da CAT no músculo branco aumentassem de maneira significativa e que a atividade da GPx e o conteúdo de GSH fossem reduzidos com a exposição ao MP. Tais dados mostram que o Se interfere na resposta dessas enzimas à

exposição ao organofosforado. A manutenção do conteúdo de GSH muscular poderia dar suporte aos aumentos das atividades tanto da GST como da GPx. Desta forma, o aumento da atividade da GPx foi suficiente para a desintoxicação dos peróxidos, não sendo necessários aumentos na atividade da CAT. A manutenção dos níveis de GSH, que atua diretamente na neutralização de radicais livres e/ou como substrato para a GPx na desintoxicação de H₂O₂ e hidroperóxidos de lipídios, provavelmente foi a responsável pela manutenção dos níveis de HP.

Nas brânquias, por sua vez, a interação mostrou que o Se, na maior dose testada, foi capaz de reverter os efeitos provocados pelo MP como a redução no conteúdo de GSH, o aumento da atividade da SOD e da CAT e a diminuição da atividade da GPx. Isto evidencia que o Se, nesta dose, provavelmente contribuiu para o aumento da atividade e/ou indução da GPx em resposta à exposição ao MP, não sendo necessários aumentos significativos na atividade da CAT para desintoxicar os peróxidos. Além disso, a suplementação com 1,5 mg de selênio impediu a indução da atividade da SOD na presença de MP. Isto também poderia contribuir para a ausência de elevação na atividade da CAT, pois não havendo produção de ânions superóxido em quantidade suficiente para induzir o aumento na atividade da SOD, a produção de H₂O₂ também estaria reduzida.

Altas concentrações de H₂O₂, favorecidas pela atividade catalítica da SOD, estimulariam a peroxidação lipídica de maneira significativa. Conseqüentemente, nenhuma alteração foi observada nos níveis de HP das brânquias dos peixes do grupo MP 1,5Se. Estes resultados indicam que a presença de selênio na dieta é fundamental para a manutenção ou elevação do "status" antioxidante das brânquias dos matrinxãs frente ao estresse oxidante induzido pelo MP. Esta premissa é corroborada pelo acúmulo significativo de Se neste tecido após 60 dias de arraçoamento. Nos peixes alimentados com dietas contendo 0 ou 0,22 mg de Se, a elevação acentuada da SOD, somada a uma certa ineficiência do sistema enzimático responsável pela desintoxicação do H₂O₂, incluindo a participação indireta da GSH, via GPx, poderia explicar os consideráveis aumentos nos níveis endógenos de peroxidação lipídica observados com a exposição ao MP. Alguns autores postulam que a SOD pode atuar como agente potencializador do processo de estresse oxidante em situações onde há um aumento substancial dos níveis de H₂O₂ (KURATA et al., 1993).

Nos eritrócitos, como resultado da interação entre os fatores Se e MP, as respostas dos níveis endógenos de HP à exposição ao MP mostraram-se Se-dependentes. Na ausência deste mineral (MP 0 Se), o MP induziu um aumento significativo na peroxidação lipídica, o que não ocorreu nos peixes do grupo MP 0,22Se. Além disso, houve uma redução significativa no conteúdo de HP intraeritrocitário no grupo MP 1,5 Se, com concomitante

redução da atividade da CAT e aumento da atividade da GPx frente à exposição ao MP. Mais uma vez, a influência dos níveis de Se na dieta, em relação ao comportamento dos sistemas de defesa antioxidante frente ao estresse oxidante induzido pelo MP, fica demonstrada. O Se, na dose de $1,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$, provavelmente contribui para o aumento da atividade e/ou indução da GPx em resposta à exposição ao MP, não sendo necessária a ação da CAT. A diminuição da atividade da CAT é, provavelmente, um mecanismo compensatório da superexpressão da GPx, resultante da suplementação com $1,5 \text{ mg}$ de Se na dieta. Este aumento da atividade da GPx foi acompanhado pela manutenção dos níveis sanguíneos de GSH.

No plasma, a interação indica que a suplementação com $1,5 \text{ mg}$ de selênio frente à exposição ao MP teve como efeitos a manutenção dos níveis de HP plasmáticos e o aumento significativo da atividade da GPx revertendo o padrão das alterações induzidas pelo MP nos peixes que receberam dietas com 0 ou $0,22 \text{ mg}$ de Se. Isto mostra, mais uma vez, a importância do aumento dos níveis deste mineral na dieta para o combate ao estresse oxidante.

Verificou-se uma correlação negativa entre os valores de GPx e o conteúdo de HP em função dos níveis de Se na dieta tanto no músculo branco ($r = -0,66$ e $P = 0,02$) como nas brânquias ($r = -0,66$ e $P = 0,005$) e nos eritrócitos ($r = -0,80$ e $P = 0,004$). Esta correlação negativa também foi verificada entre os níveis de GSH e o conteúdo de HP para os mesmos tecidos (músculo branco: $r = -0,67$ e $P = 0,03$; brânquias: $r = -0,53$ e $P = 0,05$ e eritrócitos: $r = -0,65$ e $P = 0,02$). Os níveis de HP foram inversamente proporcionais à atividade da GPx e aos níveis de GSH nos animais expostos ao MP em função dos 3 diferentes tipos de arraçoamento. Isto se torna claro quando os valores da GPx e do conteúdo de GSH são plotados em relação aos níveis de HP nas três condições de tratamento e sob a ação do MP (**Apêndices 4A, 5A e 6A** para HP versus GPx e **Apêndices 4B, 5B e 6B** para HP versus GSH).

Assim, o processo de peroxidação lipídica no músculo branco, nas brânquias e nos eritrócitos estaria sendo atenuado pelos níveis mais elevados de GSH e pela maior atividade da GPx, ambos decorrentes da suplementação da dieta com $1,5 \text{ mg}$ de selênio, corroborando as hipóteses anteriores.

Nas brânquias e nos eritrócitos, não foram observadas correlações nítidas entre os grupos MP 0Se e MP $0,22\text{Se}$, o que poderia ter sido decorrente da utilização de diferentes lotes de peixes durante os experimentos. Além disso, estes experimentos foram realizados em diferentes épocas do ano o que, segundo RONISZ et al. (1999) e WILHELM-FILHO et al. (2001), pode interferir no comportamento do sistema de defesa antioxidante. Entretanto, estes resultados não deixam de ressaltar as correlações negativas existentes entre os

diferentes parâmetros destes grupos experimentais e daquele suplementado com selênio na concentração de 1,5 mg. Tais resultados evidenciam que a resposta dos sistemas de defesa antioxidantes à exposição ao MP depende da presença de Se em níveis adequados e suficientes na dieta.

Além disso, o nível de 0,22 mg de Se.Kg⁻¹, presente na ração comercial utilizada no protocolo experimental I, é garantido pelo fabricante. Não foi realizada a análise da concentração de selênio nesta ração, já que o objetivo inicial era somente investigar se o MP, na dose normalmente utilizada na piscicultura, induzia estresse oxidante em matrinxãs. Desta forma, não foi possível garantir que a ração comercial utilizada tivesse realmente 0,22 mg de Se.Kg⁻¹ e não concentrações menores ou até mesmo bem maiores que esta, superando aquela fornecida ao grupo 1,5Se. Neste sentido, vale ressaltar que, conforme discutido anteriormente, tanto a deficiência quanto o excesso de Se podem induzir efeitos deletérios (REILLY, 1998). Entretanto, é com esta informação dos fabricantes que os piscicultores trabalham e, daí, a necessidade de se avaliar o efeito de tal dieta, comumente empregada no cultivo dos peixes.

Outro aspecto interessante observado nos animais expostos ao MP foi a correlação existente entre os níveis endógenos de GSH e a atividade da GPx em função das concentrações de Se na dieta. No músculo branco, nas brânquias e nos eritrócitos, as correlações positivas entre estes parâmetros foram significativas ($r = 0,78$ e $P = 0,007$; $r = 0,51$ e $P = 0,03$; $r = 0,79$ e $P = 0,02$, respectivamente) (**Apêndices 4C, 5C e 6C**). Tais correlações positivas em músculo branco, brânquias e eritrócitos de matrinxãs expostos ao MP corroboram a existência de uma interdependência funcional entre os sistemas de defesa GPx e GSH, o que é completamente viável, uma vez que a selenoenzima GPx tem sua ação baseada na oxidação da GSH, que é seu substrato específico, funcionando como doador de hidrogênio. Assim, quanto maior a atividade da GPx em função dos níveis de Se na ração, maior deve ser o conteúdo de GSH a fim de dar suporte ao trabalho enzimático da mesma.

Outra correlação importante é a existente entre as atividades da GPx e da CAT no músculo branco ($r = - 0,56$ e $P = 0,04$), em função das concentrações de Se na dieta (**Apêndice 4D**). Isto reforça a dualidade funcional entre estas enzimas nos processos ligados à proteção antioxidante, uma vez que o aumento da atividade da GPx, induzido pelos níveis crescentes de Se na dieta, foi acompanhado pela diminuição da atividade da CAT. Como tais enzimas compartilham a função de desintoxicação do H₂O₂, não seria necessária uma expressão significativa da CAT para compensar a falha da GPx, uma vez que esta mostra atividade crescente com o aumento da concentração de Se na dieta. Tais resultados evidenciam que a resposta da GPx à exposição ao MP depende das concentrações de Se na dieta.

Nenhuma outra correlação significativa foi encontrada entre os demais parâmetros analisados nos diferentes tecidos.

Independentemente da exposição ao MP, houve uma redução na atividade da SOD em todos os tecidos dos peixes arraçoados com 1,5 mg de Se, quando comparados aos peixes arraçoamentos com 0 e 0,22 mg de Se. Isto pode ser o reflexo de uma melhoria no “*status*” antioxidante promovido pela suplementação com selênio.

Os aumentos na atividade da GPx no fígado, brânquias e eritrócitos dos peixes arraçoados com 1,5 mg de Se ocorreram independentemente da exposição ao MP. Conforme já discutido anteriormente, a GPx é uma selenoproteína e, portanto, é de se esperar uma maior atividade dessa enzima na maior dose de selênio, uma vez que a atividade da mesma pode ser promovida pela suplementação dietética com selênio (MAXWELL, 1995). Além disso, o Se se acumulou significativamente no fígado e nas brânquias, corroborando a idéia de que uma maior disponibilidade de Se aumentaria a expressão/indução da GPx. Níveis reduzidos de selênio têm como conseqüência a redução da atividade da enzima antioxidante GPx nas células e tecidos, resultando em maior susceptibilidade do organismo aos danos oxidantes induzidos pelas ERO (SCIESZKA et al., 1997). Reforçando esta idéia, HILTON et al. (1980), GATLIN & WILSON (1984), BELL et al. (1987) verificaram que a deficiência de Se na dieta reduz o crescimento e a atividade da GPx em *O. mykiss*, *S. salar* e *I. punctatus*, respectivamente.

Nas brânquias, independentemente da exposição ao MP, houve um aumento nos níveis de GSH nos peixes que receberam dietas contendo selênio, o que não ocorreu na ausência da suplementação. Além disso, houve um aumento na atividade da GST nos peixes arraçoados com 1,5 mg de Se. Esta maior disponibilidade de Se poderia estar permitindo um aumento na atividade da GST, uma vez que esta enzima é responsável pela conjugação da GSH com xenobióticos eletrofílicos, como o MP, como mecanismo de desintoxicação. A elevada atividade da GST pode refletir a possibilidade de uma melhor proteção contra a toxicidade do pesticida (ORUC et al., 2004).

O metil paration, independentemente dos diferentes tipos de arraçoamento, em linhas gerais, apresentou como efeitos os aumentos das atividades da SOD, da CAT, da GST e do processo de peroxidação lipídica, além de diminuições na atividade da GPx e do conteúdo de GSH nos diferentes tecidos.

A interação entre os níveis de selênio presentes na ração e o efeito do metil paration sobre biomarcadores de estresse oxidante mostra os efeitos benéficos da suplementação deste mineral, deixando claro que a presença de antioxidantes na dieta é um importante mecanismo de defesa contra os radicais livres.

O aumento significativo da atividade de aqüicultura e sua intensificação requereram o aumento na produção de rações específicas para esta finalidade. No entanto, as exigências vitamínicas e minerais das espécies de peixes tropicais cultiváveis não se encontram precisamente determinadas. As recomendações adotadas para a formulação de rações para peixes tropicais se baseiam em valores médios disponíveis na literatura especializada, que em sua maioria, refere-se a estudos realizados com peixes de ambiente temperado. Desta forma, as formulações das rações comercializadas no Brasil podem não atender às exigências nutricionais de nossas espécies. Adicionalmente, a utilização do metil paration nos tanques de alevinagem para combate a larvas de insetos é uma prática comum, como exposto anteriormente, o que seria agravado pela utilização de uma dieta inadequada.

Desta forma, a utilização de agentes antioxidantes como o Se pode permitir que os animais superem, de maneira saudável e sem danos, este tipo de condição adversa a que estão freqüentemente sujeitos, resistindo a tais manejos.

Em resumo, o presente trabalho mostrou que o inseticida organofosforado metil paration na concentração de 2 ppm, comumente utilizada no combate a larvas de insetos em tanques de piscicultura, é um potente indutor de estresse oxidante em matrinxã, *Brycon cephalus*, e que a suplementação da dieta com 1,5 mg de Se por Kg de ração é eficiente em prevenir os efeitos deste OP sobre os biomarcadores de estresse oxidante (**Tabela 18**). A **Figura 25** mostra um diagrama dos efeitos do MP e do Se no metabolismo oxidante celular de *B. cephalus*.

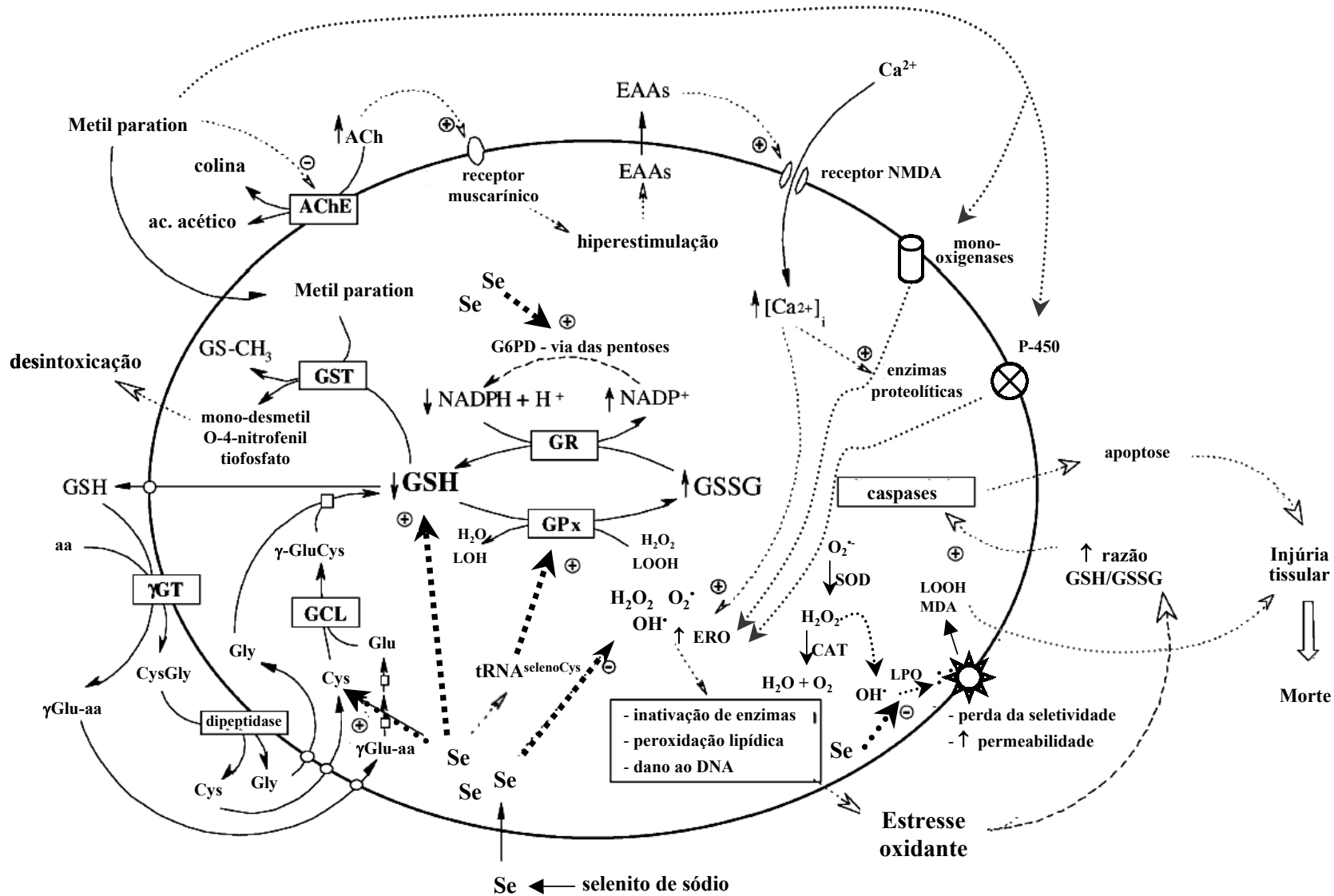


Figura 25: Diagrama mostrando as possíveis vias de ação do metil paration e do selênio no metabolismo oxidante celular de *Brycon cephalus*. Adaptado de PEÑA-LLOPIS et al. (2003).

Tabela 18: Quadro sinóptico das respostas observadas nos diversos parâmetros analisados em *Brycon cephalus* expostos a 2 ppm de Folisuper 600 BR® e arraçoados com 0; 0,22 e 1,50 mg Se.Kg⁻¹ de ração, quando comparados à condição dos controles.

Parâmetros	Tecido	Metil paration 0 mg de Se Kg ⁻¹ dieta	Metil paration 0,22 mg de Se Kg ⁻¹ dieta	Metil paration 1,50 mg de Se Kg ⁻¹ dieta	Observações
SOD (defesa antioxidante)	Fígado	aumentou	aumentou	aumentou	
	Músculo branco	aumentou	aumentou	aumentou	
	Brânquias	aumentou	aumentou	não variou	
	Eritrócitos	aumentou	aumentou	aumentou	
	Plasma	não variou	não variou	não variou	
CAT (defesa antioxidante)	Fígado	aumentou	aumentou	aumentou	
	Músculo branco	aumentou	aumentou	não variou	
	Brânquias	aumentou	aumentou	aumentou	
	Eritrócitos	aumentou	aumentou	diminuiu	
GPx (defesa antioxidante)	Fígado	não variou	não variou	não variou	A suplementação com 1,5 mg Se reverteu a inibição ou até mesmo induziu a atividade da GPx.
	Músculo branco	diminuiu	diminuiu	não variou	
	Brânquias	diminuiu	diminuiu	não variou	
	Eritrócitos	não variou	não variou	aumentou	
	Plasma	não variou	não variou	aumentou	
GST (defesa antioxidante)	Fígado	aumentou	aumentou	aumentou	
	Músculo branco	aumentou	aumentou	aumentou	
	Brânquias	aumentou	aumentou	aumentou	
GSH (defesa antioxidante)	Fígado	diminuiu	diminuiu	não variou	A suplementação com 1,5 mg Se aumentou a disponibilidade de GSH
	Músculo branco	diminuiu	diminuiu	não variou	
	Brânquias	diminuiu	diminuiu	não variou	
	Sangue	diminuiu	diminuiu	não variou	
HP (dano celular)	Fígado	não variou	não variou	não variou	A suplementação com 1,5 mg Se impediu o aumento ou até mesmo diminuiu a peroxidação lipídica.
	Músculo branco	aumentou	aumentou	não variou	
	Brânquias	aumentou	aumentou	não variou	
	Eritrócitos	aumentou	não variou	diminuiu	
	Plasma	aumentou	aumentou	não variou	

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho, o estudo do comportamento dos sistemas de defesas antioxidantes em *Brycon cephalus* (matrinã) expostos por 96 horas à concentração subletal de 2 ppm de Folidol 600 BR[®] (metil paration 600 g.L⁻¹) e do papel da suplementação de selênio na ração (1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração) nas respostas desses sistemas de defesas permitiram as seguintes conclusões:

1. A exposição ao Folisuper 600 BR[®] é capaz de induzir estresse oxidativo.
2. A exposição ao Folisuper 600 BR[®] induz respostas tecido-específicas relacionadas às defesas antioxidantes e aos danos oxidativos, sendo as brânquias e o músculo branco os tecidos mais sensíveis ao estresse oxidativo induzido pelo organofosforado. Isto mostra que diferentes tecidos apresentam diferentes taxas de geração das ERO e diferentes potenciais antioxidantes.
3. Os parâmetros analisados se constituem em bons biomarcadores de exposição ao estresse oxidativo induzido por metil paration, uma vez que alterações características como a redução do conteúdo de GSH e da atividade da GPx com elevação dos níveis de HP ocorreram em vários tecidos.
4. A suplementação da ração com 1,5 mg de selênio previne o estresse oxidativo induzido pelo Folisuper 600 BR[®]. Há um efeito benéfico do selênio em manter e/ou aumentar as defesas antioxidantes e a resistência dos tecidos mais sensíveis à lipoperoxidação induzida pelo MP.
5. A concentração de 1,5 mg de Se.Kg⁻¹ de ração, proveniente do selenito de sódio, não foi tóxica após 60 dias de arraçoamento, uma vez que não causou nenhum dos efeitos característicos de selenose descritos na literatura.
6. A suplementação com Se recomendada pelos fabricantes de ração comercial para peixes onívoros (0,22 mg de Se.Kg⁻¹) não proporcionou nenhum efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido pelo metil paration, uma resposta semelhante àquela obtida quando uma ração livre de selênio foi utilizada.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

As informações básicas relativas à proteção antioxidante e ao dano celular em resposta à exposição ao metil paration e o efeito da suplementação de selênio nestas repostas indicam a necessidade de novas investigações que poderão ajudar na elucidação dos diversos pontos levantados ao longo da discussão. Merecem destaque:

1. Avaliar o efeito do metil paration no ciclo redox da glutathiona, incluindo as enzimas glutathiona redutase e glicose 6-fosfato desidrogenase, o conteúdo de GSSG e a razão GSH/GSSG, para esclarecer as alterações encontradas em alguns desses parâmetros.
2. Avaliar a exigência nutricional de selênio para *Brycon cephalus* e quais os melhores níveis de Se para a atividade da GPx.
3. Verificar o nível de expressão da GPx nos animais arraçados com diferentes níveis de Se e analisar curva dose-resposta por meio de cinética da enzima incubada com níveis crescentes de Se.
4. Investigar como o selênio, em níveis não tóxicos, melhora a disponibilidade de GSH nos tecidos.
5. Comparar as diferenças entre fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na suplementação da dieta para *Bycon cephalus*.
6. Investigar a influência da ausência do selênio no canibalismo, que é característico da espécie.
7. Avaliar a possível interação entre a suplementação da dieta com selênio e os hormônios tireoideanos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes. Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CVRANDI – A Revista da Clínica Médica**, v. 26, p. 141-164, 1993.

ABOU-ARAB, A.A.K. et al. Characteristic levels of some pesticides and heavy metals in important fish. **Food Chem.**, v. 57, p. 487-492, 1996.

ADAD, J.M.T. **Controle químico de qualidade**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 204 p.

ADAMS, S.M.; GREELEY, M.S. Ecotoxicological indicators of water quality: using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. **Water Air Soil Poll.**, v. 123, p. 103-115, 2000.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth. Enzymol.**, v.105, p. 121-126, 1984.

AEBI, H. Catalase. In: Bergmayer, H.U. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. London: Academic Press, 1974.p. 671-684.

AGAY, D. et al. Optimization of selenium status by single intraperitoneal injection of Se in Se-deficient rat: possible application to burned patient treatment. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 39, p. 762-768, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Toxicologia**. Disponível em: <<http://www.anvisa.saude.gov.br>>. Acesso em: 20 nov. 2004.

AGUIAR, L.H. **Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (Folidol 600®) sobre o teleósteo de água doce, matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869): aspectos do metabolismo intermediário**. 2002. 102 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

AGUIAR, L.H. et al. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environ. Res.**, v. 95, p. 224-230, 2004.

AHMAD, I., et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1519, p. 37-48, 2000.

AKSNES, A.; NJAA, L.R. Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in different fish species. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 69B, p. 893-896, 1981.

ALBANIS, T.A. et al. Monitoring of pesticide residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. **J. Chromatog.**, v. 823A, p. 59-71, 1998.

ALLAN, C.B.; LACOURCIERE, G.M.; STADTMAN, T. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 9, p. 1-16, 1999.

ALLAWAY, W.H. Selenium in food chain. **Cornell Vet.**, v. 63, p. 151-168, 1973.

- ALMEIDA, J.A., et al. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environ. Intern.**, v. 27, p. 673-679, 2002.
- ALTOE, A.; MARANHÃO, M.; ZANIN, M. **Agrotóxicos, a realidade do Paraná**. Paraná: Secretaria do Meio Ambiente, 1992, 94 p.
- ALVES, S.R.C.; SEVERINO, P.C.; IBBOTSON, D.P. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Mar. Environ. Res.**, v. 54, p. 1-5, 2002.
- ANDERSON, D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutat. Res.**, v. 350, p. 103-108, 1996.
- ANDRADE JÚNIOR, D.R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. Bras. Pneumol.**, v. 31, p. 60-68, 2005.
- ANTECIO-GARCIA, V. et al. Influência da primeira alimentação na larvicultura e alevinagem do yamú *Brycon siebenthalae* (Characidae). **Maringá**, v. 25, p. 61-72, 2003.
- ANTUNES, F. et al. On the antioxidant activity of melatonin. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, p. 117-128, 1999.
- ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and glutathione system. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 10, p. 153-158, 2001.
- ARTHUR, J.R. Selenium biochemistry and function. In: FISCHER, P.W.F. et al. (Eds). **Trace elements in man and animals**. Canadá: Research Press, 1997. p. 1-5.
- ARUOMA, O.I. et al. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. **J. Biol. Chem.**, v. 20, p. 509-512, 1989.
- ASCHERIO, A. et al. Correlations of vitamin A and intakes with the plasma concentrations of carotenoids and tocopherols among american men and women. **J. Nutrition**, v. 122, p. 1792-1801, 1992.
- ATROSHI, F. et al. Fumonisin B₁-induced DNA damage in rat liver and spleen: effects of pretreatment with coenzyme Q₁₀, L-carnitine, α -tocopherol and selenium. **Pharmacol. Res.**, v. 40, p. 459-467, 1999.
- AYUB, M.A.Z. et al. Studies on plasmid stability, cell metabolism and superoxide dismutase production by PGK-strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **App. Microbiol.**, v. 37, p. 615-620, 1992.
- BABER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Am. Pharm.**, v. 34, p. 26-35, 1994.
- BABIOR, B.M. Superoxide: a two-edged sword. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 141-155, 1997.
- BAGNASCO, M. et al. Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted seawater. **Mutat. Res.**, v. 262, p. 129-137, 1991.

- BAINY, A.C.D. et al. Differential effects of short-term lindane administration on parameters related to oxidative stress in rat liver and erythrocytes. **J. Biochem. Toxicol.**, v. 8, p. 187-194, 1993.
- BAINY, A.C.D. Oxidative stress as biomarker of polluted aquatic sites. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 101-110.
- BAINY, A.C.D.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir Sao Paulo, Brazil. **Aquat. Toxicol.**, v. 44, p. 289-305, 1999.
- BANERJEE, B.D. The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemicals. **Toxicol. Lett.**, v. 107, p. 21-31, 1999.
- BANERJEE, B.D. et al. Oxidative stress in human poisoning cases following malathion and propoxur ingestion. **Toxicol. Lett.**, v. 95, p. 58, 1998.
- BANERJEE, B.D. et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. **Toxicol. Lett.**, v. 107, p. 33-47, 1999.
- BANERJEE, B.D.; SETH, V.; AHMED, R.S. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. **Rev. Env. Health**, v. 16, p. 1-40, 2001.
- BANNISTER, J.V.; ANASTASI, A.; BANNISTER, W.H. Cytosol superoxide dismutase from swordfish (*Xiphias gladius* L.) liver. **Comp. Biochem. Physiol.**, v 56B, p. 235-238, 1977.
- BARAS, E.; JOBLING, M. Dynamics of intracohort cannibalism in culture fish. **Aquaculture Res.**, v. 33, p. 461-479, 2002.
- BARLING, D. et al. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **Europ. J. Biochem.**, v. 216, p. 579-586, 1993.
- BASHA, P.S.; RANI, A.U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 56, p. 218-221, 2003.
- BATTIN, E.E.; PERRON, N.R.; BRUMAGHIM, J.L. The central role of metal coordination in selenium antioxidant activity. **J. Inorg. Chem.**, v. 45, p. 499-501, 2006.
- BEAL, M.F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann. Neurol.**, v. 38, p. 357-366, 1995.
- BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 548-581, 1998.
- BEHNE, D.; WOLTERS, W. Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. **J. Nutr.**, v. 113, p. 456-461, 1983.
- BELL, J. G.; COWEY, C. B. Some effects of selenium deficiency on enzyme activities and indices of tissue peroxidation in Atlantic salmon parr (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 65, p. 43-54, 1987.

- BELL, J. G.; COWEY, C. B. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 81, p. 61-68, 1989.
- BELL, J.G. et al. Some effects of selenium deficiency on glutathione peroxidase (E.C.1.11.1.9) activity and tissue pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Br. J. Nutr.**, v. 55, p. 305-311, 1986.
- BENNET, W.N.; BROOKS, A.S.; BORAAS, M.E. Selenium uptake and transfer in an aquatic food chain and its effects on fathead minnow larvae. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 15, p. 513-517, 1986.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v. 47, p. 233-261, 1996.
- BERRY, M.J. et al. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in Type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. **Nature**, v. 353, p. 273-276, 1991.
- BESSER, J.M.; CANFIELD, T.J.; LA POINT, T.W. Bioaccumulation of organic and inorganic selenium in a laboratory food chain. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 62, p. 1-12, 1993.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Méd.**, v. 61, p. 882-888, 1963.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BIELSTEIN, M.A.; WHANGER, P.D. Glutathione peroxidase activity and chemical forms of selenium in tissues of rats given selenite or selenomethionine. **J. Inorg. Biochem.**, v. 33, p. 31-46, 1988.
- BIESALSKI, H.K. The role of antioxidants in nutritional support. **Nutrition**, v. 16, p. 593-596, 2000.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann. Bot.**, v. 91, p. 179-194, 2003.
- BLUM, J.; FRIDOVICH, I. Inactivation of GPx by superoxide radical. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 240, p. 500-508, 1985.
- BONDY, S.C.; NADERI, S. Contribution of hepatic cytochrome p-450 systems to the generation of reactive oxygen species. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, p. 155-159, 1994.
- BONORDEN, W.R.; PARIZA, N.W. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: KOTSONIS, F.N. et al. (Eds.). **Nutritional Toxicology**. New York: Raven Press, 1994., p. 19-48.
- BOONE, J.S.; CHAMBERS, J.E. The time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities, and nonprotein sulfhydryl levels following exposure to organophosphorous insecticides in mosquitofish (*Gambusia affinis*). **Fund. Applied. Toxicol.**, v. 29, p. 202-207, 1996.
- BORDÓN, A. et al. Selenium supplementation can protect culture rat cardiomyocytes from hypoxia-reoxygenation damage. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 1736-1740, 2003.

- BORELA, M.L.L.; VARELA, Q.D. Antioxidantes enzimáticos. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. (Eds.). **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**, 2004. p. 35-42.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina**, v. 58, p. 350-356, 1998.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, v. 34, p. 707-717, 1973.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGIGAND, V.; BERTHET, B. Some methodological aspects of metlothionein evaluation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134A, p. 55-61, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 371, de 04/09/97. **Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos**, Brasília, 1997.
- BRAY, T.M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. **Nutrition**, v. 16, p. 578-581, 2000.
- BRAY, T.M.; TAYLOR, C.G. Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 71, p. 746-751, 1993.
- BRIGHT, M.W.R. et al. Effect of pancreatic enzyme preparations on erythrocyte glutathione peroxidase activities and plasma selenium concentrations in cystic fibrosis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 25, p. 242-249, 1998.
- BROSVIE, G.M. et al. Influences of hypothyroidism on the taste detection performance of rats – a signal detection analysis. **Behav. Neurosci.**, v. 106, p. 992-998, 1992.
- BURGESS, P.; BAILEY, M.; EXELL, A. **A-Z of tropical fish: diseases & health problems**. New York: Howell Book House, 1998. 392p.
- BUTLER, A.M.; MURRAY, M. Biotransformation of parathion in human liver: participation of CYP3A4 and its inactivation during microsomal parathion oxidation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 280, p. 966-973, 1997.
- CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 79-110, 1989.
- CALDAS, E.D.; SOUZA, L.C.K.R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Rev. Saúde Pub.**, v. 34, p. 529-537, 2000.
- CARLSON, K.; EHRICH, M. Organophosphorus compound-induced modification of SH-SY5Y human neuroblastoma mitochondrial transmembrane potential. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 160, p. 33-42, 1999.
- CARLSON, K.; JORTNER, B.S.; EHRICH, M. Organophosphorous compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 168, p. 102-113, 2000.

- CARR, R.L.; SATRUSS, D.L.; CHAMBERS, J.E. Inhibition and aging of catfish brain acetylcholinesterase following exposure to two phosphorotionate insecticide and their active metabolites. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 45, p. 325-336, 1995.
- CASSINI, A.; FAVERO, M.; ALBERGONI, V. Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and white-blooded Antarctic teleost fish, *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106C, p. 333-336, 1993.
- CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal:UNESP, 1992, 189p.
- CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 21, p. 1-5, 1991.
- CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v. 344, p. 862-863, 1994.
- CHAMBERS, I.; HARRISON, P.R. A new puzzle in selenoprotein biosynthesis: selenocysteine seems to be encoded by the "stop" codon, UGA. **Trends Biochem. Sci.**, v. 12, p. 255-256, 1987.
- CHANCE, B. Effect of pH upon the reaction kinetics of the enzyme-substrate compounds of catalase. **J. Biol. Chem.**, v. 194, p. 483-496, 1952b.
- CHANCE, B.; GREENSTEIN, D.S.; ROUGHTON, F.J.W. The mechanism of catalase action. I. Steady-state analysis. **Arch. Biochem.**, v. 37, p. 301-321, 1952.
- CHANCE, B. et al. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 527-602, 1979.
- CHEUNG, C.C.C. et al. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Environ. Pollut.**, v. 128, p. 393-403, 2004.
- CHOW, C. K. Vitamin-E and oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 11, p. 215-232, 1991.
- CIRIOLO, M.R. et al. Age-related changes in Cu, Zn superoxide dismutase, Se-dependent and -independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. **Mech. Ageing Dev.**, v. 61, p. 287-297, 1991.
- COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochem.**, v. 2, p. 1420-1428, 1963.
- COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann. Intern. Med.**, v. 111, p. 918-931, 1989.
- COMBS, G.F.; COMBS, S.B. **The role of selenium in nutrition**. New York: Academic Press, 1986. 532 p.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução CONAMA n. 20 de 18 de junho de 1986, classifica segundo seus usos preponderantes as águas do Território Nacional em águas doces, salobras e salinas em 9 classes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de julho de 1986. Seção I.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução n. 357 de 17 de março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de março de 2005. Seção I.

- COSTA ROSA, L.F.; CURY, Y.; CURI, R. Effects of insulin, glucocorticoids and thyroid hormones on the activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, the pentose-phosphate pathway and the Krebs cycle in rat macrophages. **J. Endocrinol.**, v. 135, p. 213-219, 1992.
- COSTA, V. et al. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. **Microbiol.**, v. 143, p. 1649-1656, 1997.
- CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, p. 235-241, 1981.
- CULOTTA, V. C. et al. A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 29991-29997, 1995.
- CUNHA BASTOS, J. et al. Activation of parathion by liver of *Hypostomus punctatus*, a Brazilian benthic fish (cascudo). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 102C, p. 561-566, 1992.
- DAFRÉ, A.L.; REISCHL, E. High hemoglobin mixed disulfite content in hemolysates from stressed saharaks. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 96B, p. 215-219, 1990.
- DALLINGER, R. et al. Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. **Oecologia**, v. 73, p. 91-98, 1987.
- DANDAPAT, J.; CHAINY, G.B.N.; RAO, K.J. Dietary vitamin E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127C, p. 101-115, 2000.
- DE LA VEJA SALAZAR, M.Y.; TABCHE, L.M.; GARCIA, C.M. Bioaccumulation of methyl parathion and toxicology in several species of freshwater community in Ignacio Ramirez Dam in Mexico. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 38, p. 53-62, 1997.
- DeFOREST, D.K.; BRIX, K.V.; ADAMS, W.J. Critical review of proposed residue-based selenium toxicity thresholds for freshwater fish. **Hum. Ecol. Risk Ass.**, v. 5, p. 1187-1228, 1999.
- DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 163-173, 1989.
- DENICOFF, K.D. et al. Neuropsychiatric manifestations of altered thyroid state. **Am. J. Psychiatry**, v. 147, p. 94-99, 1990.
- DEORE, M.D.; SRIVASTAVA, A.K.; SHARMA, S.K. Effect of reduced glutathione treatment on selenosis, blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity after repeated short-term selenium exposure in buffalo calves. **Toxicol.**, v. 213, p. 169-174, 2005.
- DIAZ, J. et al. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clin. Chem.**, v. 44, p. 2215-2217, 1998.
- DIMITROVA, M.S.T.; TISHINOVA, V.; VELCHAVA, V. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 108C, p. 43-46, 1994.

- DODMAN, N.H.; MERTENS, P.A.; ARONSON, L.P. Aggression in two hypothyroid dogs, behavior case of the month. **J. Am. Vet. Méd. Assoc.**, v. 207, p. 1168-1171, 1995.
- DORES, E.F.G.C.; FREIRE, E.M.L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. **Quím. Nova**, v. 24, p. 27-36, 2001.
- DOYOTTE, A. et al. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers or experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquat. Toxicol.**, v. 39, p. 93-110, 1997.
- DRABKIN, D.L. The standardization of hemoglobin measurement. **Am. J. Med. Sci.**, v. 215, p. 110-111, 1948.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DUDLER, R. et al. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 4, p. 14-18, 1991.
- DUNIER, M.; SIWICKI, A.K. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 3, p. 423-438, 1993.
- EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 118, p. 3-4, 1991.
- EL-DEMERDASH, F.M. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. **J. Trace Med. Biol.**, v. 18, p. 113-121, 2004.
- ELIA, A.C. et al. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 55, p. 162-167, 2003.
- EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Tecnologia para tratamento de resíduos químicos é lançada na Coopavel**. Disponível em: <http://www.cnpdia.embrapa.br>. Acesso em: 10 mar. 2003.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. **Office of Pesticide Programs Health Effects Division (7509C)**. Washington, 1999. 313 p.
- EPE, B. Genotoxicity of singlet oxygen. **Chem. Biol. Interac.**, v. 80, p. 239-260, 1991.
- EUBANKS, M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, p. 50-56, 1994.
- EVANS, D. H. **The physiology of fishes**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 592 p.
- EXTOXNET - Extension toxicology network. **Pesticides active ingredient profiles**. 11.03.1999. Disponível em: <<http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/methylparation>>. Acesso em: 20 abr. 2004.
- FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

- FATIMA, M. et al. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissue. **Aquat. Toxicol.**, v. 49, p. 243-250, 2000.
- FEILLET-COUDRAY, C. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. **Clin. Chim. Acta**, v. 284, p. 31-43, 1999.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FIALA, E.S. et al. Inhibition of DNA cytosine methyltransferase by chemopreventative selenium compounds, determined by an improved assay for DNA cytosine methyltransferase and DNA cytosine methylation. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 597-604, 1998.
- FIGUEIREDO, G.M.; SENHORIN, J.A. Influência de biocidas no desenvolvimento de carpa comum (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) e sobre o zooplâncton, durante o período de larvicultura. **Bol. Tec. Cepta.**, v. 31, p. 5-21, 1990.
- FILHO, J.L.B.N.; NOVELLI, E.L.B. Estresse oxidativo e inflamação: o efeito de anti-inflamatórios. In: NOVELLI, E.L.B. (Ed.). **Nutrição e vida saudável. Estresse oxidativo e metabolismo energético**. Ribeirão Preto: Tecmedd Editora, 2005. p. 123-135.
- FLOHÉ, L. Glutathione peroxidase brought into focus. In: PRYOR, W.A. (Ed.). **Free radical in biology**. Orlando: Academic Press, 1982. p. 223- 255.
- FLOHE, L.; GUNZLER, W.A.; SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS Lett.**, v. 32, p. 132-134, 1973.
- FLOYD, R. A. **Free radicals in molecular biology. Aging and disease**. New York: Raven, 1984. 416 p.
- FORSTROM, J.W.; ZAKOWSKI, J.J.; TAPPEL, A.L. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. **Biochem.**, v. 17, p. 2639-2644, 1978.
- FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Selenium in health and disease: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 37, p. 211-228, 1997.
- FOSTER, L.H.; SUMAR, S. Selenium in the environment, food and health. **Nutrit. Food Sci.**, v. 5, p. 17-23, 1995.
- FOURNIER, D. et al. Insect glutathione S-transferase, biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 1840-1845, 1992.
- FRAGA, C.G. et al. Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 323-330.
- FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.**, v. 47, p. 412-426, 1982.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. **Adv. Enzymol.**, v. 41, p. 35-97, 1974.
- FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. **Horiz. Biochem. Biophys.**, v. 1, p. 1-37, 1975.

- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.
- FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 97-112, 1995.
- FULLER, B. J. et al. Free radical damage and organ preservation: fact or friction. A review of the interrelationship between oxidative stress and physiological ion disbalance. **Cryobiology**, v. 25, p. 377-393, 1988.
- GAETANI, G.F. et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v. 73, p. 334-339, 1989.
- GAETANI, G.F. et al. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. **Blood**, v. 87, p. 1595-1599, 1996.
- GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1271, p. 321-326, 1995.
- GANTHER, H.E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1657-1666, 1999.
- GATLIN, D. M.; WILSON, R. P. Dietary selenium requirement of fingerling catfish. **J. Nutr.**, v. 114, p. 627-633, 1984.
- GEORGE, S.G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: MALINS, D.C.; OSTRANDER, G.K. (Eds.). **Aquatic toxicology; molecular, biochemical and cellular perspectives**. London: Lewis Publishers, CRC press, 1994. p. 37-85.
- GODOY, M.P. **Peixes do Brasil: Subordem Characoidei – Bacia do Rio Mogi Guassú**. Piracicaba: Franciscana, v. 2, 1975. p. 217-397.
- GOLTERMAN, H.L.; CLIMO, R.S. **Methods for chemical analysis of freshwater**. IBP Handbook 8. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1969, 171p.
- GONZÁLEZ, F.H.; SILVA, S.C. **Introdução à Bioquímica Veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003, 198 p.
- GONZALEZ-FLECHA et al. Inhibition of microsomal lipid peroxidation by α -tocopherol acetate. **Xenobiotica**, v. 21, p. 1013-1022, 1991.
- GONZALEZ, M.J. Lipid peroxidation and tumor growth: an inverse relationship. **Med. Hypotheses**, v. 38, p. 106-110, 1992.
- GORDON, B.W. et al. Abnormal taste preference for saccharin in hypothyroid rats. **Physiol. Behav.**, v. 52, p. 385-388, 1992.
- GRAHAM, J. B. Ecological, evolutionary, and physical factors influencing aquatic animal respiration. **Am. Zool.**, v. 30, p. 137-146, 1990.

- GRALLA, E.B.; OSMAN, D.J. Molecular genetics of superoxide dismutase in yeasts and fungi. **Adv. Gen.**, v. 30, p. 251-319, 1992.
- GREENBERG, A.E.; TARAS, M.J.; RAND, M.C. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 14 ed. Illinois: Springfield Bru-El Graphic, 1976. 310 p.
- GUENGUERICH, F.P. Metabolism of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 345-351, 2000.
- GUIDOT, D.M. et al. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 26699-26703, 1993.
- GÜL, S. et al. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dan Lake, Turkey. **Environ. Int.**, v. 30, p. 605-609, 2004.
- GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. The measurements and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 15, p. 129-135, 1990.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.
- HABERLAND, M.E.; SMITH, C. Modificações das lipoproteínas dependentes dos peróxidos lipídicos na aterosclerose. In: MOSLEN, M.T.; SMITH, C.V. (Eds.). **Radicais Livres. Mecanismos de lesão tecidual**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1995. p. 203-215.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.
- HAFEMAN, D.G.; SUNDE, R.A.; HOEKSTRA, W.G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **J. Nutr.**, v. 104, p. 580-587, 1974.
- HAI, D.Q.; VARGA, S.I.; MATKOVICS, B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 117C, p. 83-88, 1997.
- HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J.**, v. 1, p. 358-364, 1987.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutrition antioxidant intake in humans. **Free. Rad. Res.**, v. 25, p. 25-57, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, v. 219, p.1-14, 1984.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 246, p. 501-514, 1986.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989. 469 p.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. UK: Oxford University Press, 2000. 936 p.
- HAMILTON, S.J. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. **Sci. Total Environ.**, v. 326, p. 1-31, 2004.
- HARPER, H. A. **Review of physiological chemistry**. 15. ed. Los Altos: Lange Medical Publications, 1973.
- HASSPIELER, B.M.; BEHAR, J.V.; DI GIULIO, R.T. Glutathione dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 28, p. 82-90, 1994.
- HATHERILL, J.R.; TILL, G.O.; WARD, P.A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents Actions**, v. 32, p. 351-358, 1991.
- HAZARIKA, A. et al. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. **Toxicol.**, v. 185, p. 1-8, 2003.
- HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. 2 ed. Boca Raton: Lewis Publishers CRC Press, 1995. 359 p.
- HELMY, M.H. et al. Effect of selenium supplementantation on the activities of glutathione metabolizing enzymes in human hepatoma Hep G2 cell line. **Toxicol.**, v. 144, p. 57-61, 2000.
- HENRIQUE, M. M. F. et al. Influence of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic-stress of Seabream, (*Spaurus aurata*). **Aquaculture**, v. 161, p. 415-426, 1998.
- HERMES-LIMA, M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120B, p. 437-448, 1998.
- HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.; STOREY, K.B. Quantification of peroxides in animal tissues based on Fe(II)-xylenol orange formation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 19, p. 271-280, 1995.
- HICKS, D. B. et al. Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson. **J. Fish Dis.**, v. 7, p. 379-389, 1984.
- HILTON, J.W.; HODSON, P.V.; SLINGER, S.J. The requeriment and toxicity of selenium in raibow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Nutr.**, v. 110, p. 2527-2535, 1980.
- HIRAKU, Y.; MURATA, M.; KAWANISHI, S. Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1570, p. 47-52, 2002.
- HODGSON, E.; LEVI, P.E. Pesticides: an important but underused model for the environmental health sciences. **Environ. Health Perspect.**, v. 104, p. 97-106, 1996.

- HODSON, P. V.; HILTON, J. W. The nutritional requirements and toxicity to fish of dietary and waterborne selenium. **Ecol. Bull.**, v. 35, p. 335-340, 1983.
- HOFFMAN, D.J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. Lewis Publishers: CRC Press, 1995. 755 p.
- HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation. **Free Rad. Res.**, v. 28, p. 593-600, 1998.
- HOWARD, P.H. **Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals**. v. 3. Chelsea: Lewis Publishers, 1989. 574 p.
- HOWES, G.J. Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.**, v. 43, p. 1-47, 1982.
- HSU, P.C.; GUO, Y.L. Antioxidant nutrients and lead toxicity. **Toxicol.**, v. 180, p. 33-44, 2002.
- HUANG, L. Effect of triiodothyronine on stomach formation and pigmentation in larval striped bass (*Morene saxatilis*). **J. Exp. Zool.**, v. 280, p. 231-237, 1998.
- HUGHES, D.A. Dietary antioxidants and human immune function. **Nutrit. Bull.**, v. 25, p. 35-41, 2000.
- HUSSEY, A.J. et al. Variation in the expression of Mu-class glutathione S-transferase isoenzymes from human skeletal muscle. Evidence for the existence of heterodimers. **J. Biochem.**, v. 273, p. 323-332, 1991.
- IP, C. et al. Chemical form of selenium, critical metabolites and cancer prevention. **Cancer Res.**, v. 51, p. 595-600, 1991.
- IZEL, A.C.U. et al. Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Acta Amazonica**, v. 34, p. 179-184, 2004.
- JAMIESON, D.J., RIVERS, S.L., STEPHEN, D.W.S. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. **Microbiology**, v. 40, p. 3277-3283, 1994.
- JESUS, E. G.; TOLEDO, J.D.; SIMPAS, M.S. Thyroid hormones promote early metamorphosis in grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 112, p. 10-16, 1998.
- JIALAL, I.; GRUNDY, S.D. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. **Ann. New York Acad. Sci.**, v. 669, p. 239-248, 1992.
- JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and iodometric method. **Lipids**, v. 26, p. 777-860, 1991.
- JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density lipoprotein. **Anal. Biochem.**, v. 202, p. 384-389, 1992.

- JOHN, S. et al. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **J. Nutr. Biochem.**, v. 12, p. 500-504, 2001.
- JOHNSON, M.K. The target for initiation of delayed neurotoxicity by organo-phosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. **Rev. Biochem. Toxicol.**, v. 4, p. 141-212, 1982.
- JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicol.**, v. 166, p. 139-160, 2001.
- JONES, D.P. Glutathione distribution in natural products: absorption and tissue distribution. **Meth. Enzymol.**, v. 252, p. 3-13, 1995.
- JORDÃO JÚNIOR, A.A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.
- JORGENSON, J.L. Aldrin and dieldrin: a review of research on production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, p. 113-139, 2001.
- JULKA, D.; PAL, R.; GILL, K.D. Neurotoxicity of dichorvos: effect of antioxidant defense system in the rat central nervous system. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 56, p. 144-152, 1992.
- KAGI, J.H.R.; SCHAFFER, A. Biochemistry of metallothionein. **Biochemisry**, v. 27, p. 8509-8515, 1988.
- KAGI, J.H.R. et al. Metallothionein induction by cadmiun, cytokines, thrombin and endotelian-1 in cultured vascular endothelial cells. **Life Sci.**, v. 53, p. 1185-1191, 1993.
- KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Sci.**, v. 36, p. 169-189, 1994.
- KAPLOWITZ, N.; AW, T.Y.; OOKHTENS, M. The regulation of hepatic GSH. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 25, p. 714-744, 1985.
- KAPPUS, H.; SIES, H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. **Experientia**, v. 37, p. 1223-1241, 1981.
- KARBOWNIK, M.; REITER, R.J. Melatonin protects against oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid: implications for cancer reduction. **Canc. Inves.**, v. 20, p. 276-286, 2002.
- KAY, M.M.B. et al. Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 2463-2467, 1986.
- KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.
- KESTEMONT, P.; BARAS, E. Environmental factors and feed intake in fish. In: HOULIHAN, D.F.; BOUJARD, T; JOBLING, M. (Eds.). **Food intake in fish**. Oxford: Blackwel Science, 2001. p. 131-156.
- KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 4343-4347, 1984.

- KIRKMAN, H. N. et al. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 13908-13914, 1999.
- KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 239-267, 2004.
- KLEINOW, K.M.; BROOKS, A.S. Selenium compounds in the fathead minnow (*Phimephales promelas*) - I. Uptake, distribution and elimination of orally administered selenate, selenite and 1-selenomethionine. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 83C, p. 61-69, 1986.
- KONDO, H. et al. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition. by antioxidants. **FEBS Lett.**, v. 413, p. 236-238, 1997.
- KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 5751-5754, 1982.
- KOWLURU, R.A; ENGERMAN, R.L.; KERN, T.S. Diabetes-induced metabolic abnormalities in myocardium: effect of antioxidant therapy. **Free Rad. Res.**, v. 32, p. 67-74, 2000.
- KRAMER, D. L. Dissolved oxygen and behavior. **Environ. Biol. Fish**, v. 18, p. 81-92. 1987.
- KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 48, p. 439-446, 1996.
- KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. **Meth. Mol. Biol.**, v. 32, p. 9-15, 1994.
- KUBITZA, F. Transporte de peixes vivos. **Panorama da Aqüicultura**, v. 7, p. 20-26, 1997.
- KUBOTA, A. H. Metodologia de indicadores de dose interna para avaliação em trabalhadores expostos a pesticidas organofosforados. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, p. 879-881, 2000.
- KUMAR, A.; CHAPMAN, J. C. Profenofos toxicity to the eastern rainbow fish (*Melanotaenia duboulayi*). **J. Environ. Toxicol. Chem.**, v. 17, p. 1799-1806, 1998.
- KURATA, M.; SUZUKI, M.; AGAR, N.S. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106B, p. 477-487, 1993.
- LATHA, M.; PARI, L. Effect of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose, plasma insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 577-586, 2004.
- LE COUTEUR, D.G. et al. Pesticides and Parkinson's disease. **Biomed. Pharmacother.**, v. 53, p. 122-130, 1999.
- LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. **Aquaculture**, v. 191, p. 121-131, 2000.
- LEHMANN, C. et al. Bioelectrocatalysis by a selenoenzyme. **J. Electroanal. Chem.**, v. 455, p. 259-263, 1998.

- LEMLY, A.D. Response of juvenile centrarchids to sublethal concentration of waterborne selenium. I. Uptake, tissue distribution, and retention. **Aquatic Toxicol.**, v. 2, p. 235-252, 1982.
- LEMLY, A.D. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example. **Aquatic Toxicol.**, v. 57, p. 39-49, 2002.
- LEUNG, F.Y. Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition. **J. Nutr. Biochem.**, v. 9, p. 304-307, 1998.
- LI, H.; ZHANG, S. In vitro cytotoxicity of the organophosphorus pesticide parathion to FG-9307 cells. **Toxicol. in Vitro**, v. 15, p. 643-647, 2001.
- LIEBLER, D.C.; REED, D.J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: WALLACE, K.B. (Ed.). **Free Radical Toxicology**. USA: Taylor & Francis, 1997. p. 141-171.
- LIMA, E.S.; CARATIN, R.F.; DOLIS, V.S. Peroxidação dos ácidos graxos. In: CURI, R. Et al. (Eds.). **Entendendo a gordura – Os ácidos graxos**. Editora Manole LTDA, 2002. p. 406-418.
- LIN, F.; THOMAS, J.P.; GIROTTI, A.W. Hyperexpression of catalase in selenium-deprived murine L1210 cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 305, p. 176-185, 1993.
- LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.120A, p. 43-49, 1998.
- LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 42, p. 656-666, 2001.
- LIVINGSTONE, D.R. et al. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 26, p. 602-606, 1993.
- LOPEZ, P.A. et al. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides complex*) to inorganic pollutants exposure. **Sci. Total Environ.**, v. 280, p. 153-163, 2001.
- LORENTZEN, M. et al. Effects of dietary selenite or seleniomethionine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 121, p. 359-367, 1994.
- LU, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **FASEB J.**, v. 13, p. 1169-1183, 1999.
- MACCAY, P.B. et al. An update on antioxidant theory: spin trapping of the trichloromethyl radicals in vivo. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 393, p. 23-32, 1982.
- MACHADO, M.R.; FANTA, E. Effects of the organophosphorus methyl parathion on branchial epithelium of freshwater fish *Metynnis roosevelti*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 46, p. 361-372, 2003.
- MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J.**, v. 1, p. 441-445, 1987.

- MACKENZIE, D.S.; VANPUTTE, C.M.; LEINER, K.A. Nutrient regulation of endocrine function in fish. **Aquaculture**, v. 161, p. 3-25, 1998.
- MAIER, K.J.; KNIGHT, A.W. Ecotoxicology of selenium in freshwater systems. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 134, p. 31-48, 1994.
- MAIORINO, M. et al. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 7728-7732, 1991.
- MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.**, v. 113, p. 490-495, 1985.
- MANNERVIK, B.; DANIELSON, U. H. Glutathione transferases: structure and catalytic activity. **Crit. Ver. Biochem.**, v. 23, p. 283-337, 1988.
- MARCHLER, G. et al. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. **EMBO J.**, v. 12, p. 1997-2003, 1993.
- MARCON, J. L. **Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa.** 1996. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). INPA, Universidade Federal da Amazônia, Manaus.
- MARKLUND, S.L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 7634-7638, 1982.
- MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. **Basic medical biochemistry: a clinical approach.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 327-340.
- MARQUES, N.R. et al. Influência da densidade de estocagem no cultivo de alevitos de matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em condições experimentais. **Maringá**, v. 26, p. 55-59, 2004.
- MATES, J.M; PEREZ-GOMES, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.**, v. 32, p. 595-603, 1999.
- MATKOVICS, B. et al. A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 56B, p. 31-34, 1977.
- MATSUMURA, F. **Toxicology of insecticides.** 2 ed. New York: Plenum Press, 1985.
- MAXWELL, S.R. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, v. 49, p. 345-361, 1995.
- McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.
- McDONALD, P. et al. **Animal nutrition.** 6 ed. Pearson: Edinburgh, 2002. 693p.
- MEDH, R.D. et al., 1991 Characterization of a novel glutathione S-transferase isoenzyme from mouse lung and liver having structural similarity to rat glutathione S-transferase. **Biochem J.**, v. 278, p. 793-799, 1991.

- MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Meth. Enzymol.**, v. 251, p. 3-7, 1995.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 711-760, 1983.
- MENDONÇA, J.O.J. O gênero *Brycon*. **Rev. Panorama da Aqüicultura**, p. 14-16, 1996.
- MIKSICEK, R.J.; TOWLE, H.C. Changes in the rates of synthesis and messenger RNA levels of hepatic glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases following induction by diet or thyroid hormone. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 11829-11835, 1982.
- MILLS, G.C. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 234, p. 502-506, 1959.
- MOREIRA, J.C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, Rio de Janeiro. **Ciênc. Saúde Colet.**, v. 7, p. 299-311, 2002.
- MOSLEN, M.T. Proteção contra lesão tecidual mediada pelos radicais livres. In: MOSLEN, M.T. & SMITH, C. (Eds.). **Radicais livres. Mecanismos de lesão tecidual**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1995. p. 203-215.
- MOTOYAMA, N.; DAUTERMAN, W.C. Glutathione S-transferases: their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. **Rev. Biochem. Toxicol.**, v. 2, p. 49-69, 1980.
- MYERS, C.R. Subcellular sites of xenobiotic-induced free-radical generation. In: WALLACE, K.B. (Ed.). **Free Radical Toxicology**. London: Taylor & Francis, 1997. p. 25-44.
- NAKAMURA, W. et al. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 358, p. 251-261, 1974.
- NAM, Y.K. et al. Alteration of antioxidant enzymes at the mRNA level during short-term starvation of rockbreem *Oplegnathus fasciatus*. **Fish. Sci.**, v. 71, p. 1385-1387, 2005.
- NAQVI, S.M.; HANSAN, M. Acetylhomocysteine thiolactone protection against phosphamidon – induced alteration of regional superoxide dismutase activity in central nervous system and its correlation with altered lipid peroxidation. **Ind. J. Exp. Biol.**, v. 30, p. 850-852, 1992.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of fish**. Washington: National Academy Press, 1993. 114 p.
- NATOLI, G. et al. Icefish (*Chaenocephalus aceratus*) Cu Zn superoxide dismutase: conservation of the enzyme properties in extreme adaptation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 95B, p. 23-33, 1990.
- NEPOKROEFF, C.M. et al. Coordinate control of rat liver lipogenic enzymes by insulin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 162, p. 340-344, 1974.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v.31, p. 1287-1312, 2001.

- NOVELLI, E.L.B. Radicais livres e estresse oxidativo. In: _____ (Ed.). **Nutrição e vida saudável. Estresse oxidativo e metabolismo energético**. Ribeirão Preto: Tecmedd Editora, 2005. p. 93-113.
- OAKES, K.D.; MCMASTER, M.E.; VAN DER KRAAK, G.J. Oxidative stress responses in long nose sucker (*Catostomus catostomus*) exposed to pulp and paper mill and municipal sewage effluents. **Aquat. Toxicol.**, v. 67, p. 255-271, 2004.
- OGA, Z. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 530 p.
- OMAYE, S.T.; TAPPEL, A.L. Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick. **J. Nutr.**, v. 104, p. 747-753, 1974.
- ORUC, E.O.; UNER, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127C, p. 291-296, 2000.
- ORUC, E.O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 137C, p. 43-51, 2004.
- OTERO, J.; TONI, P.; GARCIA MORATO, Y.V. Superóxido dismutase: método para su determinación. **Rev. Iberoam. Invest. Clin.**, v. 2, p. 121-127, 1983.
- OTHMAN, A.I.; EL-MISSIRY, M.A. Role of selenium against lead toxicity in male rats. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 12, p. 345-349, 1998.
- OTTO, D.M.; MOON, T.W. 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 77, p. 281-287, 1995.
- PANDEY, S. et al. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper pre-exposure. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 41, p. 345-352, 2001.
- PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **Sci. Total Environ.**, v. 309, p. 105-115, 2003.
- PARIHAR, M.S. et al. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. **J. Therm. Biol.**, v. 22, p. 151-156, 1997.
- PARIPATANANONT, T.; LOVELL, R. T. Comparative net absorption of chelated and inorganic trace minerals in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) diets. **J. World Aquacult. Soc.**, v. 28, p. 62-67, 1997.
- PASCHOAL, J.J.; ZANETTI, M.A.; CUNHA, J.A. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, p. 249-255. 2003.
- PATTERSON, B.H.; LEVANDER, O.A. Naturally occurring selenium compounds in cancer chemoprevention trials: a workshop summary. **Cancer Epidem. Biomar. Prev.**, v. 6, p. 63-69, 1997.

- PATTERSON, M.S.; MADSEN, S.J.; WILSON, B.C. Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring in vivo during photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 5B, p. 69-84, 1990.
- PAWLAK, W. et al. Effect of long term bed rest in man on enzymatic antioxidative defense and lipid peroxidation in erythrocytes. **J. Gravitat. Physiol.**, v. 5, p. 163-1644, 1998.
- PEAKALL, D.W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicol. Ecotoxicol. News**, v. 1, p. 55-60, 1994.
- PEARSON, A. M. et al. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technol.**, v. 37, p. 121-129, 1983.
- PEDRO, N. et al. CRF effect on thyroid function is not mediated by feeding behavior in goldfish. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 51, p. 885-890, 1995.
- PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. **Aquat. Toxicol.**, v. 65, p. 337-360, 2003.
- PEREIRA, B. et al. Changes in the TBARS content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscle of adrenodemedullated rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 827-833, 1998.
- PEREZ CAMPO, R. et al. A comparative study of free radicals in vertebrates – 1. Antioxidants enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 105B, p. 749-755, 1993.
- PIPE, A.A.R.; COLES, J.A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve mollusks. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 5, p. 581-595, 1995.
- PLECKO, S. et al. Determination and distribution of human plasma selenoproteins. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 363, p. 517-619, 1999.
- PLOCH, S.A. et al. Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to tert-butyl hydroperoxide. **Aquat. Toxicol.**, v. 46, p. 231-240, 1999.
- POLLACK, M.; LEEUWENBURG, C. Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. In: SEN, C.K.; PACKER, L.; HÄNNINEN, O. (Eds.). **Handbook of oxidants and antioxidants in exercise**. Elsevier Science, 1999. p. 881-923.
- POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. I. **J. Vitamin Nutrit. Res.**, v.67, p. 289-297, 1997.
- PORTE, C.M. et al. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzymes system of *Mytilus* sp to organic pollution. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100C, p. 183-186, 1991.
- POSTON, H. A.; COMBS, G.F. Interrelationships between requirements for dietary selenium, vitamin E, and L-ascorbic acid by Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed a semipurified diet. **Fish Health News**, v. 4, p. 6-7, 1979.
- POSTON, H. A. et al. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Gross, histological and biochemical deficiency signs. **J. Nutr.**, v. 106, p. 892-904, 1976.

- PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species their formation, lifetimes and reactions. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 48, p. 657-667, 1986.
- PUCHEU, S. et al. Effect of dietary antioxidant trace element supply on cardiac tolerance to ischemia-reperfusion in the rat. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 27, p. 2303-2314, 1995.
- RABIE, F. O. et al. Evolution of catalase in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 43A, p. 1053-1055, 1972.
- RACEK, J. et al. What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood? **Physiol. Res.**, v. 50, p. 383-388, 2001.
- RAMOS, D. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. Bras. Pneumol.**, v. 31, p. 60-68, 2005.
- RAND, G.M.; PETROCELLI, S.M. **Fundamentals of aquatic toxicology methods and applications**. Australia: McGraw-Hill International Book Company, 1984. 666 p.
- RAO, K. S. P.; RAO, K. V. R. Lipid derivatives in the tissues of the freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* (Tilapia mossambica) (Peters) - effect of methyl parathion. **Proc. Indian Natl. Sci. Acad.**, v. 47B, p. 53-57, 1981.
- REGOLI, F. et al. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Mar. Pollut. Bull.**, v. 44, p. 912-922, 2002.
- REGOLI, F. et al. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 22, p. 2120-2129, 2003.
- REILLY, C. Selenium: a new entrant into the functional food arena. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 9, p. 114-118, 1998.
- REITER, R.J.; MAESTRONI, G.J. M. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. **J. Mol. Med.**, v. 77, p. 36-39, 1999.
- REITER, R.J. et al. Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. **Free Rad. Res.**, v. 36, p. 1323-1329, 2002.
- REMACLE, J. et al. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. **Biochem. J.**, v. 286, p. 41-46, 1992.
- RISSATO, S.R. et al. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Quim. Nova**, v. 27, p. 739-743, 2004.
- RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoate 500. **Rev. Bras. Zool.**, v. 15, p. 441-450, 1998.

- RODRIGUES, E.L. et al. Histopathologic lesions in the livers of *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to a sublethal concentration of the organophosphate insecticide Dipterex 500® (Trichlorfon). **Maringá**, v. 23, p. 503-505, 2001.
- RODRIGUEZ-ARIZA, A. et al. Biochemical effects of environmental pollution in fishes from Spanish South-Atlantic littoral. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 19, 301S, 1991.
- ROEHRS, R.; GUECHEVA, T.N.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. Alvos redox-sensíveis nas cascatas de sinalização. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. (Eds.). **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, 2004. p. 161-184.
- RONISZ, D.; LARSSON, D.G.J.; FORLIN, L. Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 124C, p. 271-279, 1999.
- ROSA, C. R. et al. Effect of modifiers on thermal behavior of Se in acid digestates and slurry of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chem.**, v. 79, p. 517-523, 2002.
- ROTRUCK, J.T. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, p. 588-90, 1973.
- ROVER, J.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.
- RUDNEVA, I.I. Blood antioxidant system of black sea elasmobranch and teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118C, p. 255-260, 1997.
- SACHDEV, S.W.; SUNDE, R.A. Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver. **Biochem. J.**, v. 357, p. 851-858, 2001.
- SALLUM, W.B. et al. Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo de ingredientes de ração para o matrinhã (*Brycon cephalus*, GUNTHER 1869) (Teleostei, Characidae). **Cienc. Agrotec.**, v. 26, p. 174-181, 2002.
- SALONEN, J.T. et al. Interactions of serum copper, selenium, and low density lipoprotein cholesterol in atherogenesis. **Brit. Med. J.**, v. 302, p. 756-760, 1991.
- SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. 1 ed. Canoas: ULBRA, 2004. 200p.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Inhibition of gill Na⁺, K⁺-ATPase activity in the eel, *Anguilla anguilla*, by fenitrothion. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 38, p. 132-136, 1997.
- SARADA, S.K.S. et al. Role of selenium in reducing hypoxia-induced oxidative stress: an in vivo study. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, p. 173-178, 2002.
- SARAFIN, T.A.; BREDESEN, D.E. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? **Free Rad. Res.**, v. 21, p. 1-8, 1994.
- SATO, M.; BREMMER, I. Oxygen free radicals and metallothionein. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 14, p. 325-337, 1993.

- SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 56, p. 295-301, 2003.
- SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 995-1014, 2005.
- SCHLENK, D.; DAVIS, K.B.; GRIFFIN, B.R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. **Aquaculture**, v. 177, p. 367-379, 1999.
- SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Brás. Méd. Esporte**, v. 10, p. 308-312, 2004.
- SCIENZKA, M. et al. Plasma selenium concentration in patients with stomach and colon cancer in the Upper Silesia. **Neoplasma**, v. 44, p. 395-397, 1997.
- SCORVO-FILHO, J.D.; MARTINS, N.B.; AYROSA, L.M.S. Piscicultura em São Paulo: custos e retornos de diferentes sistemas de produção na safra de 1996/1997. **Inform. Econôm.**, v. 28, p. 41-60, 1998.
- SCOTT, M.D. et al. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 118, p. 7-16, 1991.
- SEIXAS, T. G. **Selênio total em tecidos de quatro diferentes organismos marinhos da Baía de Guanabara, RJ, Brasil**. 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SERGENT, O.; MOREL, I.; CILLARD, J. Involvement of metal ions in lipid peroxidation: biological implications. In: SIGEL, A.; SIGEL, H. (Eds.). **Metal ions in biological systems**. v. 36. New York: Basel, 1999. p. 252-277.
- SETHUNATHAN, N. Biodegradation of pesticides in tropical rice ecosystems. In: BOURDEAU, P. et al. (Eds.). **Ecotoxicology and climate**. London: John Wiley & Sons Ltd, 1989, p. 251-264.
- SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol. Ther.**, v. 47, p. 61-71, 1990.
- SHEN, H. Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. **Free Radic. Biol Med.**, v. 28, p. 1115-1124, 2000.
- SHEPHERD, C.J.; BROMAGE, N.R. **Intensive farming**. UK: BSP Professional Books, 1995. 400 p.
- SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical applications. **Am. J. Med.**, v. 91, p. 315-338, 1991.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1993.

- SIES, H. Glutathione and its role in cellular function. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 27, p. 916-921, 1999.
- SIJM, D.T.H.M.; OPPERHUIZEN, A. Biotransformation of organic chemicals by fish: enzyme activities and reactions. In: HUTZINGER, O. (Ed.). **Handbook of environmental chemistry reactions and processes**. v. 2 E. Berlin: Springer, 1989. p. 163-235.
- SILVA, A.M.M. et al. Impact of an environmentally realistic intake of water contaminants and superoxide formation on tissues of rats. **Environ. Poll.**, v. 105, p. 243-249, 1999.
- SILVA, H.C. et al. Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 105C, p. 197-201, 1993.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Boletim Técnico 1. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 72p.
- SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.**, v. 222, p. 1-15, 1984.
- SMITH, C.; REAY, P. Cannibalism in teleost fishes. **Rev. Fish Biol. Fish.**, v. 1, p. 41-64, 1991.
- SMITH, A. C. Catalase and fish red blood cells. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 54B, p. 331-332, 1976.
- SMITH, C.A. et al. Ethanol-mediated CYP1A1/2 induction in rat skeletal muscle tissue. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 69, p. 223-232, 2000.
- SMITH, C.V. Radicais livres: mecanismos de lesão tecidual. In: MOSLEN, M.T.; SMITH, C.V. (Eds.). **Radicais Livres. Mecanismos de lesão tecidual**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1995. p. 1-22.
- SOLBERG, Y.; BELKIN, M. The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, p. 183-185. 1997.
- SOLE, M.; NASCI, C.; LIVINGSTONE, D.R. Study of the biological impact of organic contaminants on mussels (*Mytilus galloprovincialis* L.) from the Venice Lagoon, Italy: responses of CYP1A-immunopositive protein and benzo[a]pyrene hydroxylase activity. **Biomarkers**, v. 5, p. 129-140, 2000.
- SOUMIS, N. et al. Presence of organophosphate insecticides in fish of the Amazon river. **Acta Amazon.**, v. 33, p. 325-338, 2003.
- SPADA, P.K.W.D.S.; SILVA, C.O. Antioxidantes não enzimáticos. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. (Eds.). **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, 2004. p. 51-67.
- SPALLHOLZ, J.E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 45-64, 1994.
- SPALLHOLZ, J.E. Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 10, p. 260-270, 1997.

- SPALLHOLZ, J.E.; SHRIVER, B.J.; REID, T.W. Demethylselenide and methylseleninic acid generate superoxide in vitrochemiluminescence assay in the presence of glutathione: implications for the anticarcinogenic activity of L-selenomethionine and L-Se-methylselenocysteine. **Nutr. Cancer**, v. 40, p. 34-41, 2001.
- SPEERS-ROESCH, B.; BALLANTYNE, J.S. Activities of antioxidant enzymes and cytochrome c oxidase in liver of Arctic and temperate teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140, p. 487-494, 2005.
- SPITZ, D.R.; OBERLEY, L.W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. **Anal. Biochem.**, v. 179, p. 8-18, 1989.
- STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Science**, v. 257, p. 1120-1124, 1992.
- STEWART, M.S. et al. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 42-48, 1999.
- STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Braz. J. Med. Res.**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.
- SULTATOS, L.G. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 43, p. 271-289, 1995.
- TABATABAIE, T.; FLOYD, R.A. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 314, p. 112-119, 1994.
- TARHAN, L.; TUZMEN, M.N. Some properties of Cu, Zn-superoxide dismutase from sheep erythrocyte. **Turk. J. Chem.**, v. 24, p. 109-116, 2000.
- TAYLOR, C.G.; BRAY, T.M. Effect of hiperoxia on oxygen free radical defense enzymes in lung of zinc deficient rats. **J. Nutri.**, v. 121, p. 460-466, 1991.
- THANNICKAL, V.; FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 279, p. 1005-1028, 2000.
- THOMAS, J.P. et al. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1045, p. 252-260, 1990.
- TIMBRELL, J.A. Biomarkers in toxicology. **Toxicology**, v. 129, p. 1-12, 1998.
- TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**. 3 ed. London: Taylor & Francis, 2000. 408 p.
- UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Sci.**, v. 51, p. 1083-1094, 1992.
- UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. 3 ed. Wallingford: CABI Publishers, 1999. 614 p.
- URUC, E.O.; UNER, S.N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 137C, p. 43-51, 2004.

- USDOJ- US DEPARTMENT OF THE INTERIOR. **Guidelines for interpretation of the biological effects of selected constituents in biota, water, and sediment. (National irrigation water quality program information report n. 3)**. Denver: CO, 1998. 198p.
- VAL, A.L.; HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia**. Manaus: INPA, 1995. 149 p.
- VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. xx, p. xx-xx, 2005 (in press).
- VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 687-721, 1998.
- VAN DEN BEUKEL, I.; VAN KLEEF, R.G.; OORTGIGIESEN, M. Deferential effects of physostigmine and organophosphates on nicotinic receptors in neuronal cells of different species. **Neurotoxicol.**, v. 19, p. 777-787, 1998.
- VAN DER AAR, E.M. et al. Enzyme kinetics and substrate selectivities of rat glutathione S-transferase isoenzymes towards a series of new 2-substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes. **Xenobiotica**, v. 26, p. 143-155, 1996.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 13, p. 57-149, 2003.
- VAN DER OOST et al. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. **Aquatic Toxicol.**, v. 35, p. 21-46, 1996.
- VAN DER WEIDEN, M.E.J. et al. Concurrence of P450 1A1 induction and toxic effects after administration of a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, v. 24, p. 123-142, 1992.
- VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, p. 217-225, 1996.
- VANNUCHI, H. et al. Effect of different dietary levels of vitamin E on lipid peroxidation in rats. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 47, p. 34-37, 1997.
- VARANASI, U. et al. Chemical carcinogenesis in feral fish: uptake, activation, and detoxification of organic xenobiotics. **Environ. Health. Perspect.**, v. 71, p. 155-170, 1987.
- VIDAL, D.; BAY, S.M.; SCHLENK, D. Effects of dietary selenomethionine on larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 49, p. 71-75, 2005.
- VIDEIRA, R.A. et al. Changes induced by malathion, methyl parathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1411, p. 360-368, 2001.
- VIG, E. et al. Purification and characterization of Cu Zn superoxide dismutase from common carp liver. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94B, p. 395-397, 1989.
- VINATEA-ARANA, L. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura**. Florianópolis: Ed. UFSC, 1997. 166p.

- VITTOZZI, L.; DE ANGELIS, G. A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. **Aquatic Toxicol.**, v. 19, p. 167-204, 1991.
- WANG, C.; LOVELL, R. T. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 152, p. 223-234, 1997.
- WATANABE, T.; KIRON, V.; DATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v. 151, p. 185-207, 1997.
- WAUCHOPE, R.D. et al. Pesticide properties database for environmental decision making. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 123, p. 1-157, 1992.
- WDZIECZAK, J. et al. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 73B, p. 361-365, 1982.
- WELZ, B. et al. Palladium nitrate - magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry: Performance for 21 elements. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v. 7, p. 1257-1262, 1992.
- WENDEL, A. et al. Substrate induced redox change of selenium in glutathione peroxidase as studied by x-ray photoelectron spectroscopy. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 377, p. 211-215, 1975.
- WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 591-625, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO **International Programme on Chemical Safety. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155.** Geneva, 1993. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/en/>>. Acesso em: 16 set. 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Environment monitoring system. Codex alimentations commission. Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues.** Geneva, 1997. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/en/>>. Acesso em: 10 jan. 2005.
- WIEACKER, P. et al. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. **Ann. Genet.**, v. 23, p. 73-77, 1980.
- WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1205, p. 1-18, 1994.
- WILHELM-FILHO, D. **Análise comparativa das defesas antioxidantes em peixes.** 1994. 120 f. Tese (Doutorado em Fisiologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- WILHELM-FILHO, D.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish. II-Elasmobranchs. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106C, p. 415-418, 1993.
- WILHELM-FILHO, D.; GIULIVI, C.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish – I. Teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106C, p. 409-413, 1993.

- WILHELM-FILHO, D.; GONZALEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2879-2882, 1994.
- WILHELM-FILHO, D.; MARCON, J. L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 299-312.
- WILHELM-FILHO, D. et al. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 719-726. 2001.
- WILHELM-FILHO, D. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, p. 349-357, 2005.
- WILLIAMS, K.; FRAYNE, J.; HALL, L. Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 841-848, 1998.
- WINSTON, G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.100C, p. 173-176, 1991.
- WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms. **Aquatic. Toxicol.**, v. 19, p. 137-161, 1991.
- WISE, D.J. et al. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. **J. Aquatic Ani. Health**, v. 5, p. 177-182, 1993.
- YAMANO, K. The role of thyroid hormone in fish development with reference to aquaculture. **JARQ**, v. 39, p. 161-168, 2005.
- YAMANO, T.; MORITA, S. Hepatotoxicity of trichlorfon and dichlorvos in isolated rat hepatocytes. **Toxicology**, v. 76, p. 69-77, 1992.
- YAN, L.; SPALLHOLZ, J. E. Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 45, p. 429-437; 1993.
- YANG, Z.P.; DETTBARN, W.D. Diisopropylphosphofluoridate induced cholinergic hyperactivity and lipid peroxidation. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 138, p. 48-53, 1996.
- YANG, Z.P. et al. Diisopropylphosphofluoridate induced muscle hyperactivity associated with enhanced lipid peroxidation in vivo. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, p. 357-361. 1996.
- YARSAN, E. et al. Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 63, p. 575-581, 1999.
- YILMAZ, S. et al. Effects of additional vitamin E and selenium supply on G6PDH activity in rats treated with high doses of glucocorticoid. **Neurosci. Lett.**, v. 393, p. 85-89, 2006.
- YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 139-162, 1994.

YU, T.W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species--induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutat. Res.**, v. 379, p. 201-210, 1997.

ZANIBONI-FILHO, E.; RESENDE, E. Anatomia de gônadas, escala de maturidade e tipo de desova de matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 48, p. 833-844, 1988.

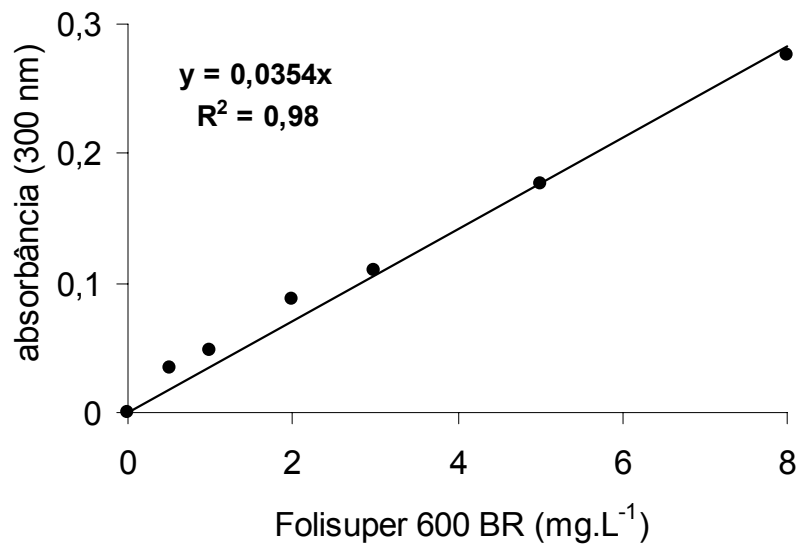
ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison on the CuZn-Sod (SOD1), Mn-Sod (SOD2) and EC-Sod (SOD3) gene structure, evolution and expression. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 33, p. 337-349, 2002.

ZHANG, J. et al. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 55, p. 167-174, 2004.

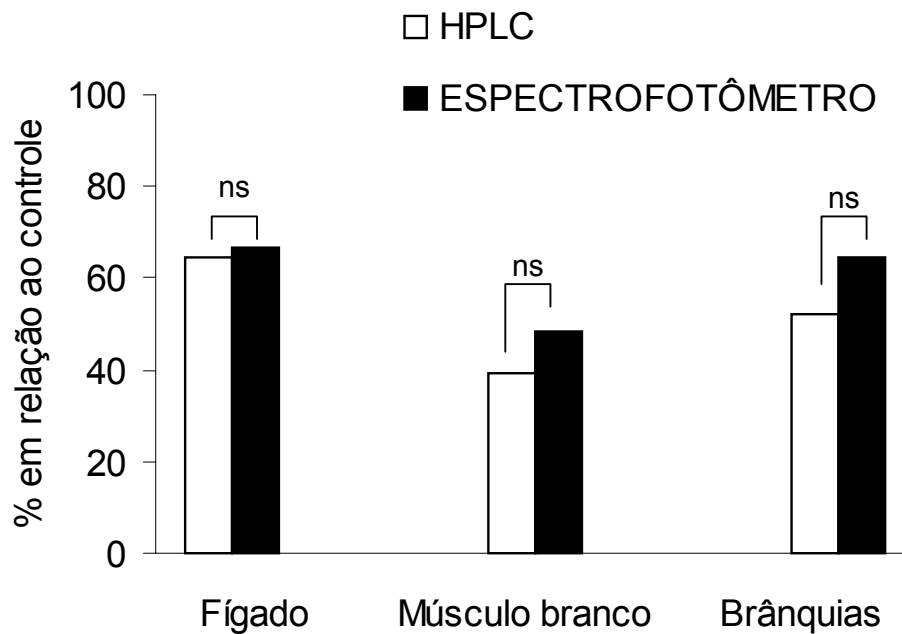
ZHANG, Z. et al. Selenium and glutathione peroxidase mRNA in rat glioma. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 73, p. 67-76, 2000.

ZUBERBUEHLER, C.A. et al. Effects of selenium depletion and selenium repletion by choice feeding on selenium status of young and old laying hens. **Physiol. Behav.**, v. 87, p. 430-440, 2006.

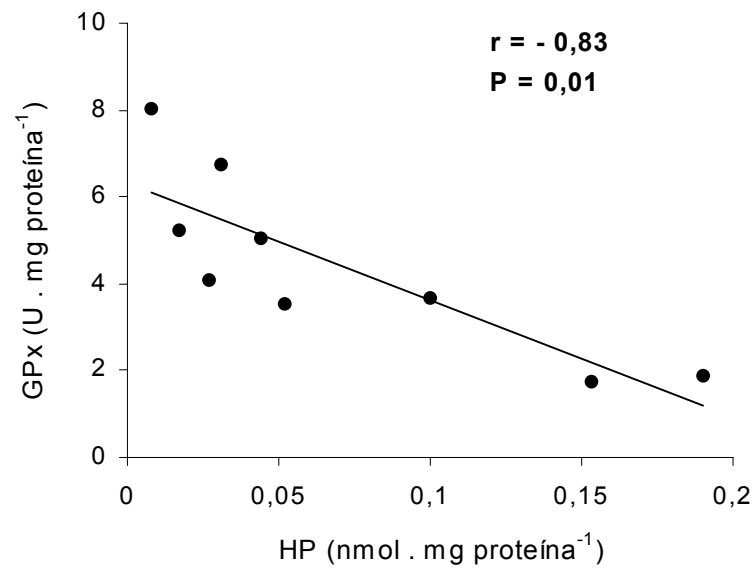
8 APÊNDICES



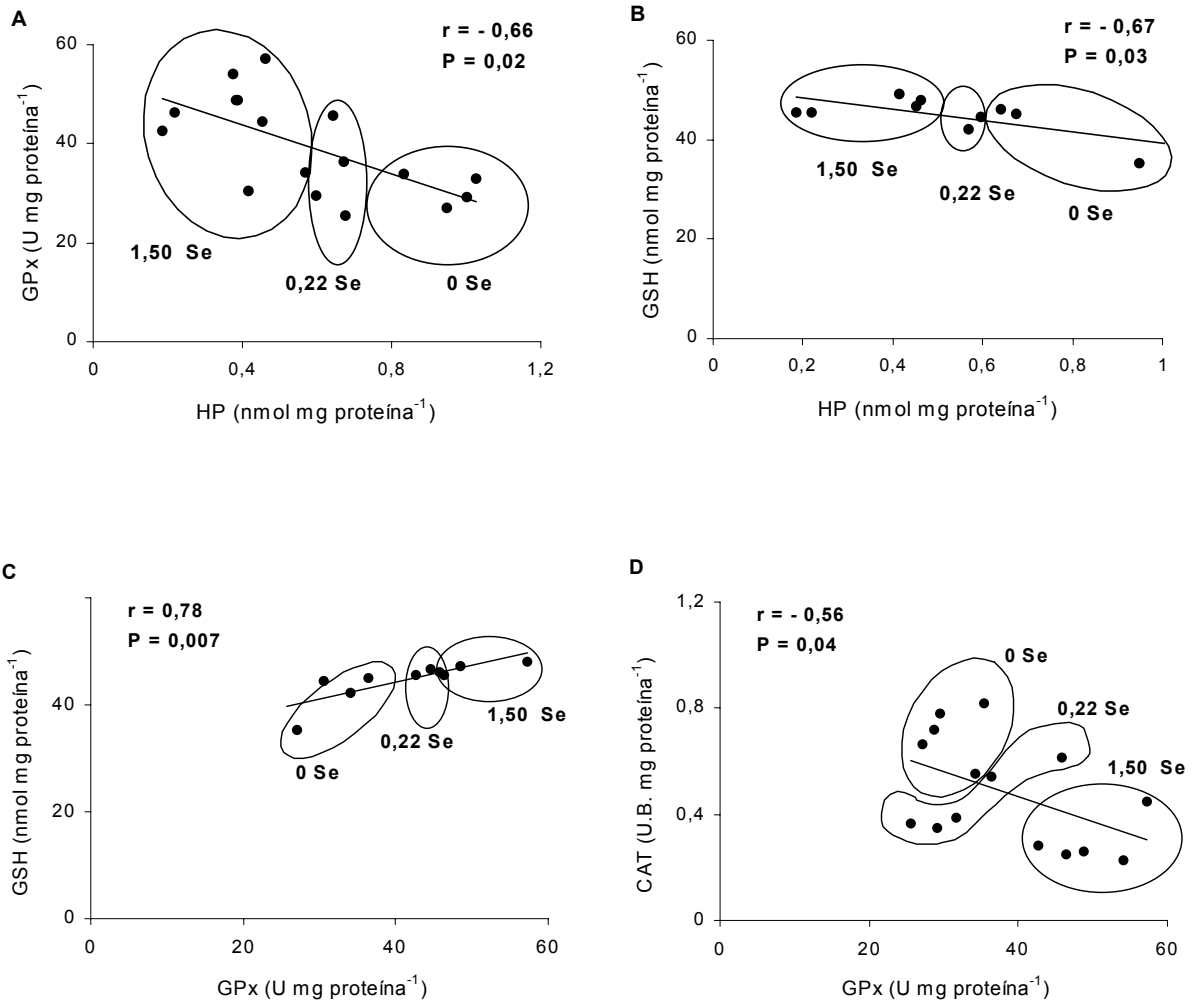
Apêndice 1: Curva-padrão de metil paration (Folisuper 600 BR[®]).



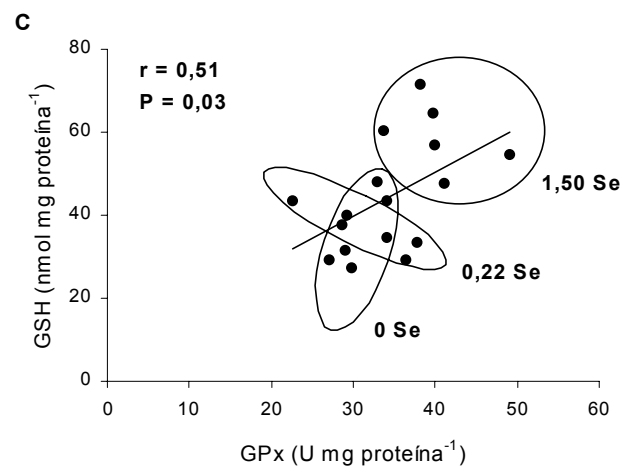
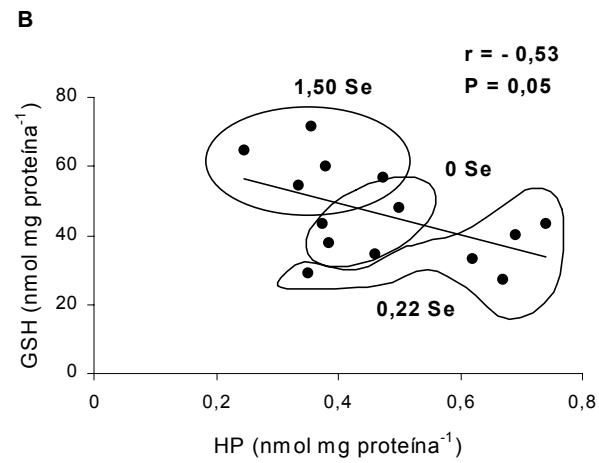
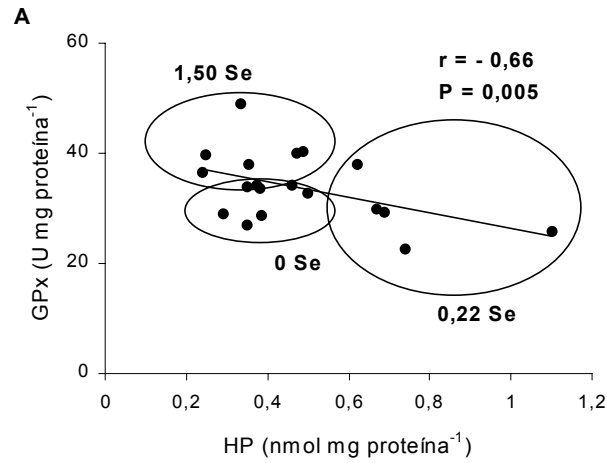
Apêndice 2: Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos de HPLC e espectrofotometria para a determinação de GSH nos tecidos dos animais do protocolo experimental I.



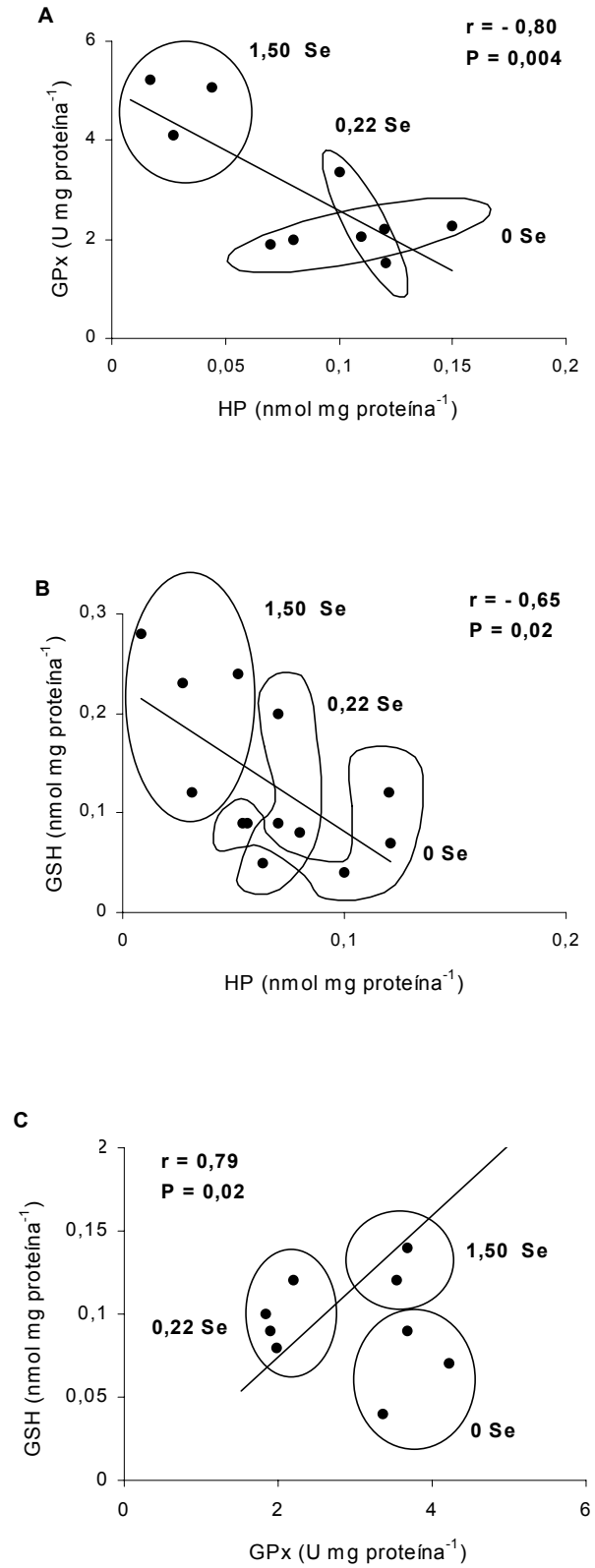
Apêndice 3: Correlação observada nos eritrócitos dos animais expostos ao MP e arraçados com dieta contendo 1,5 mg Se.Kg⁻¹.



Apêndice 4: Correlações observadas no músculo branco dos animais expostos ao MP em função dos diferentes tipos de arraçamento (0, 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹). A: HP versus GPx; B: HP versus GSH; C: GPx versus GSH; D: GPx versus CAT.



Apêndice 5: Correlações observadas nas brânquias dos animais expostos ao MP em função dos diferentes tipos de arraçoamento (0, 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹). A: HP versus GPx; B: HP versus GSH; C: GPx versus GSH.



Apêndice 6: Correlações observadas nos eritrócitos dos animais expostos ao MP em função dos diferentes tipos de arraçamento (0, 0,22 e 1,5 mg Se.Kg⁻¹). A: HP versus GPx; B: HP versus GSH; C: GPx versus GSH.