

# Efeitos da associação de benzo(a)pireno e 17- $\beta$ -estradiol em biomarcadores de biotransformação em tilápias *Oreochromis niloticus*.

**Tatiana Oliveira Moneró**

Química Ambiental, formada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Mestranda em Saúde, Ambiente e Sustentabilidade pela Universidade de São Paulo (USP/FSP). Analista de Gerenciamento de Risco Toxicológico na Intertox Ltda. E-mail: [t.monero@intertox.com.br](mailto:t.monero@intertox.com.br)

**Aline Cristina Ferreira Rodrigues**

Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Genética do IBILCE/UNESP.

**Eduardo Alves de Almeida**

Professor de Bioquímica e Toxicologia Ambiental no Departamento de Química e Ciências Ambientais da UNESP de São José do Rio Preto

**Resumo**

A vida dos organismos aquáticos é afetada com a intensa contaminação ambiental. Os sistemas bioquímicos envolvidos na biotransformação dos contaminantes podem ser usados como biomarcadores nos organismos para o diagnóstico de contaminação ambiental. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e os desreguladores endócrinos (DEs) são compostos vastamente encontrados no meio e, apesar de virem recebendo atenção dos pesquisadores, ainda há muito a se conhecer de seus efeitos nos organismos quando estão presentes associados. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos em biomarcadores bioquímicos de metabolização da exposição ao HPA benzo(a)pireno (BaP) em organismos pré-expostos ao DE 17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) e os efeitos do  $E_2$  em organismos pré-expostos ao BaP. Foram usados peixes machos da espécie *Oreochromis niloticus* e analisadas a atividade da etoxi-resorufina *O*-deetilase (EROD), benziloxi-resorufina *O*-desbenzilase (BROD), pentoxi-resorufina *O*-despentilase (PROD) e glutathione *S*-transferase (GST) no fígado após 5 e 10 dias. No menor período avaliado a pré-exposição ao  $E_2$  não inibiu a atividade da EROD, porém no maior período de exposição, a pré-exposição ao  $E_2$  diminuiu a indução da enzima pelo BaP. A pré-exposição ao BaP induziu a EROD a ponto de sua atividade não ser inibida pela posterior exposição ao  $E_2$ , nos dois períodos experimentais. No menor período avaliado, a pré-exposição ao  $E_2$  potencializou a indução da PROD em relação à exposição apenas ao BaP. A pré-exposição ao  $E_2$  e posterior exposição ao BaP induziu a atividade da BROD mais acentuadamente no maior período avaliado comparado com o menor período. A pré-exposição ao  $E_2$  diminuiu a atividade da GST em relação à exposição exclusiva ao BaP, nos dois períodos experimentais. Todos os biomarcadores se mostraram sensíveis à exposição ao BaP e  $E_2$  associados, principalmente a atividade da EROD. De modo geral, os biomarcadores se mostraram mais sensíveis à pré-exposição ao  $E_2$  seguida de exposição ao BaP.

MONERÓ, T.; RODRIGUES, A.C; ALMEIDA, E.A. Efeitos da associação de benzo(a)pireno e 17- $\beta$ -estradiol em biomarcadores de biotransformação em tilápias *Oreochromis niloticus*. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.6, n.2, p.32-61, Jun.2013

*Palavras-chave:* *Oreochromis niloticus*, benzo(a)pireno, 17  $\beta$ -estradiol, P450, glutathiona S-transferase

## **Abstract**

The life of aquatic organisms is affected by intense environmental contamination. The biochemical systems involved in detoxification of contaminants can be used as biomarkers in the diagnosis of organisms' reaction to environmental contamination. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and endocrine disruptors (EDs) are compounds widely found in the environment and despite the attention recently received from researchers, their effects on organisms are not yet well known. The objective of this study was to evaluate the effects on biochemical biomarkers of exposure to PAH metabolism of benzo (a) pyrene (BaP) in organisms pre-exposed to DE 17  $\beta$ -estradiol (E2) and the effects of E2 in organisms exposed to pre- BaP. We used male fish species *Oreochromis niloticus* and analyzed the activity of O-ethoxy-resorufin deetilase (EROD), O-benzyloxy-resorufin debenzylase (BROD), O-pentoxide-resorufin depentylase (PROD) and glutathione S-transferase (GST) in the liver after 5 and 10 days. In the shorter period assessed the pre-exposure to E2 did not inhibit the activity of Erode, but in the longer period of exposure, pre-exposure reduced the E2 enzyme induction by BaP. Pre-exposure to BaP induced a diminish activity to the point of not being inhibited by subsequent exposure to E2 in both experimental periods. In the shorter period assessed the pre-exposure to E2 enhanced the induction of PROD on BaP exposed only. Pre-exposure to E2 and subsequent exposure to BaP induced BROD activity increased more sharply in the study period compared with the shortest period. Pre-exposure to E2 degrades the activity of GST in relation to exclusive exposure to BaP in both experimental periods. All biomarkers were sensitive to exposure to

BaP and E2 mainly when associated. In general biomarkers were more sensitive to pre-exposure to E2 followed by exposure to BaP.

*Keywords:* *Oreochromis niloticus*, benzo[a]pyrene, 17  $\beta$ -estradiol, P450, glutathione S-transferase

## **Introdução**

Com o crescente aumento populacional e o conseqüente e elevado consumo da água, esta vem sendo um recurso alvo de atenção por diversos setores. A água é um fator muito importantes na manutenção das funções vitais dos seres vivos e a contaminação do ambiente aquático é, hoje, uma grande preocupação de ambientalistas e órgãos de saúde pública. O consumo de água contaminada pode causar danos severos aos organismos, entretanto, a poluição aquática só recebeu a devida atenção após ser atingido um limite a partir do qual foi possível perceber graves conseqüências nos ecossistemas e em seus organismos.

Atividades industriais, agrícolas e domésticas são responsáveis pelo uso de mais de um terço da água doce disponível, sendo grandes causadoras da contaminação destas águas por numerosos compostos sintéticos. As águas contaminadas atingem rios, lagos, nascentes e oceanos contendo uma infinidade de xenobióticos<sup>1</sup> em diversas concentrações, causando prejuízo para muitas espécies aquáticas e ameaçando a biodiversidade de ecossistemas. Muitos dos compostos lançados nos ambientes aquáticos podem sofrer biomagnificação através da cadeia alimentar e, conseqüentemente, atingir locais distantes de seu ponto inicial de descarga, fazendo com que a poluição chegue, também, em áreas onde não há atividade humana significativa (SARKAR, 2006).

Dentre os diversos poluentes, podemos destacar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e os desreguladores endócrinos, como o hormônio estrogênico natural 17 $\beta$ -estradiol (E2). Estes contaminantes podem ser introduzidos no meio aquático por diversas vias, causando perturbações ao ambiente e uma série de distúrbios metabólicos nos organismos (LEMAIRE; LIVINGSTONE, 1993; STEGEMAN et al., 1992).

1. Xenobiótico: qualquer substância química ou molécula estranha ao sistema biológico em questão, originada externamente ou internamente a ele.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma família de compostos caracterizada por possuir dois ou mais anéis aromáticos condensados. Estes compostos têm ampla distribuição e são encontradas como constituintes de misturas complexas na maioria dos compartimentos ambientais. Até o começo do século XX havia um equilíbrio entre a produção e a degradação natural de HPAs, sendo a sua concentração baixa e constante. Com o aumento do desenvolvimento industrial, esse equilíbrio foi perturbado e a razão entre a produção e a degradação de HPAs tem aumentado gradativa e substancialmente (CRESSER et al., 1993; TREVELIN, 1992).

Devido à sua natureza lipofílica, os HPAs podem penetrar facilmente nas membranas biológicas e se acumular nos organismos vivos (TUVIKENE, 1995), sendo que a taxa de hidrocarbonetos aromáticos acumulados nos organismos aquáticos é altamente específica (NORTON et al., 1985).

Um dos HPAs que merece destaque é o benzo(a)pireno (BaP, Figura 1), cuja formação se dá pela combustão incompleta de material orgânico (principalmente a exaustão de motores a diesel ou a gasolina), da queima de carvão, a fumaça de cigarro, além de vários processos industriais (FIEDLER; MUCKE, 1991; JACOB et al., 1991; HARVEY, 1985). Devido ao seu caráter ubiqüitário, o benzo(a)pireno é mutagênico e carcinogênico, se

mostrando uma grande ameaça à saúde dos organismos (VANDER HURK, 2006).

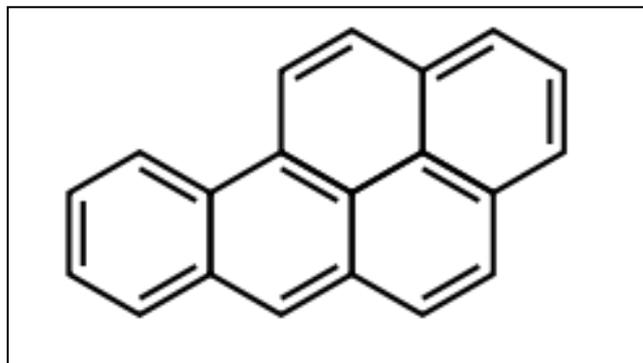


Figura 1 - Estrutura molecular do Benzo(a)pireno.

Os sanitaristas e biólogos têm se preocupado, também, com os hormônios sexuais, notadamente os estrógenos, que são compostos extremamente ativos biologicamente. Os estrógenos têm sido referidos como agentes etiológicos de feminilização em animais aquáticos e causadores de câncer. Os estrógenos naturais 17  $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e o sintético 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), desenvolvidos para uso médico em terapias de reposição hormonal feminina e métodos contraceptivos, são os que despertam maiores preocupações, pela constante introdução ao ambiente (SOTO et al., 2009).

A mudança de padrões quanto a atividade sexual dos jovens atualmente causou um aumento exorbitante no consumo de contraceptivos, que são eliminados através da urina e por consequência são levados pela rede coletora de esgoto aos corpos de água.

O uso indiscriminado de hormônios estrogênicos na bovinocultura, suinocultura, avicultura e aqüicultura também são responsáveis por uma boa parte desses contaminantes nos mananciais. Além disso as fêmeas de modo geral, contribuem para a contaminação do meio aquático pois, em condições normais, excretam hormônios estrogênicos no ambiente.

Westerhoff et al. (2005) mostrou que os métodos convencionais de MONERÓ, T.; RODRIGUES, A.C; ALMEIDA, E.A. Efeitos da associação de benzo(a)pireno e 17- $\beta$ -estradiol em biomarcadores de biotransformação em tilápias *Oreochomis niloticus*. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.6, n.2, p.32-61, Jun.2013

tratamento de efluente doméstico remove menos de 25% dos desreguladores endócrinos (Des) estrogênicos.

O 17 $\beta$ -estradiol (Figura 2) é o principal hormônio estrogênico humano. Possui 18 carbonos com um anel fenólico que é o componente estrutural responsável pela alta afinidade em ligar-se ao receptor de estrogênio e elucidar a resposta estrogênica (HUBER et al., 2004).

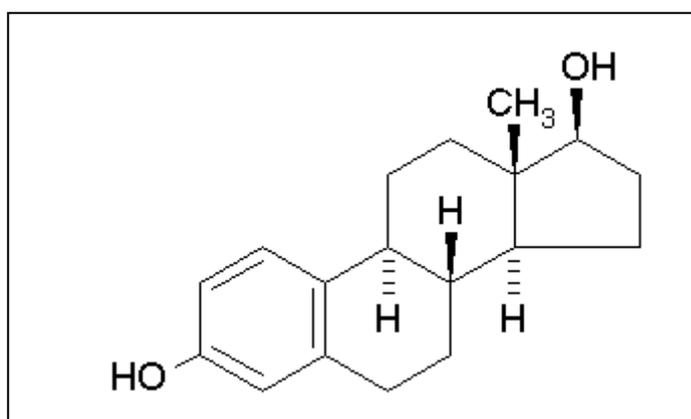


Figura 2 - Estrutura molecular do 17 $\beta$ -estradiol.

### Biomarcadores de contaminação

O estudo do nível de contaminação aquática pode ser realizado de diversas maneiras. Dentre elas, a análise de biomarcadores de contaminação é bastante eficaz. A principal razão para o uso dos biomarcadores em estudos ambientais é porque são capazes de prover indicações sobre os efeitos dos contaminantes em questão.

Os biomarcadores são definidos como sendo respostas biológicas aos poluentes ambientais medidas nos fluidos e tecidos corpóreos de um organismo ou em seus excretas, como fezes e urina. Uma das vantagens de se utilizar esta metodologia é o fato de que os biomarcadores são significativamente alterados na fase inicial da contaminação, evitando que a intoxicação chegue a um ponto impossível de ser revertido. (VAN DER OOST et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization-WHO - 1993), os biomarcadores são divididos em três classes:

- Biomarcadores de exposição: indicam a exposição de um organismo a uma ou mais substâncias químicas, porém, não fornecem informação sobre o grau de efeitos adversos que a exposição pode causar.
- Biomarcadores de efeito: demonstram efeitos adversos no organismo através da medida de parâmetros bioquímicos, fisiológicos, comportamentais ou qualquer outra alteração nos tecidos ou fluidos que possa ser classificada como associada a uma mudança no estado de saúde do indivíduo.
- Biomarcadores de susceptibilidade: indicam a capacidade de um organismo em responder às alterações de exposição a um contaminante específico, envolvendo fatores genéticos e alterações nos receptores celulares, que podem afetar a susceptibilidade de um organismo à exposição.

Dentre os biomarcadores mais utilizados, destacam-se sistemas bioquímicos relacionados com o estresse oxidativo e a biotransformação de xenobióticos.

### **Fases do metabolismo de biotransformação**

O processo de metabolização de xenobióticos é dividido em três fases, sendo as fases *I* e *II* (Figura 3) correspondentes à biotransformação, enquanto que a fase *III* está relacionada com a excreção dos produtos da biotransformação.

O complexo enzimático citocromo P450 e as glutatona-S-transferases (GSTs) constituem as principais enzimas de biotransformação de fases *I* e *II*, respectivamente. Portanto, o aumento da atividade de tais enzimas em um dado organismo, pode indicar a exposição dos organismos a contaminantes ambientais (VAN DER OOST et al., 2003).

Assim alterações nos níveis da atividade das enzimas de biotransformação de xenobióticos podem ser utilizadas como biomarcadores.

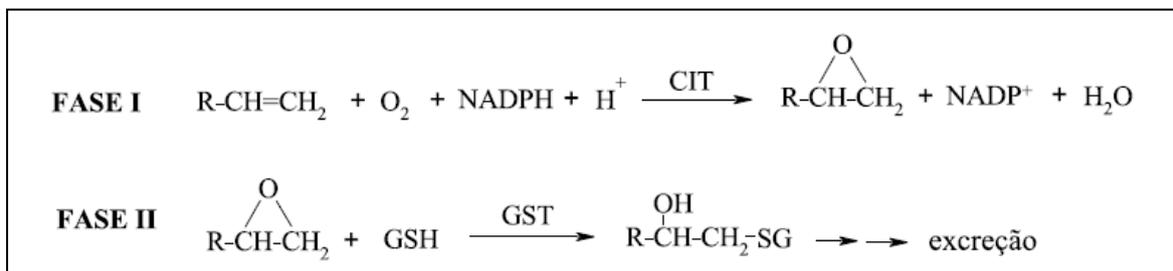


Figura 3 – As principais reações das fases do metabolismo de xenobióticos.

De acordo com Van der Oost et al. (2003), a primeira fase do metabolismo de detoxificação, expõe ou adiciona grupos funcionais com átomos de oxigênio reativos através de reações de oxidação, redução ou hidrólise. Por isso, essa fase se caracteriza por transformar compostos lipofílicos em produtos mais solúveis em água, facilitando, assim, a excreção destes metabólitos. As principais reações dessa fase são catalisadas por enzimas monooxigenases microsossomais como o citocromo P450 (cit P450), citocromo b<sub>5</sub> e NADPH citocromo P450 redutase, para a maioria dos xenobióticos.

O complexo enzimático citocromo P450 é formado por heme-proteínas ligadas às membranas principalmente de retículos endoplasmáticos lisos de células hepáticas (VAN DER OOST et al., 2003). Essa família de enzimas está envolvida com o metabolismo oxidativo de uma grande quantidade de substratos, como drogas, xenobióticos, compostos endógenos, entre outros. Entretanto, alguns compostos intermediários originados nesse metabolismo podem, por vezes, ser altamente reativos e acabar interagindo com muitas biomoléculas (SARASQUETE;SEGNER, 2000).

A subfamília P450 1A (CYP1A) é um dos biomarcadores bioquímicos de contaminação aquática mais estudado e existem fortes evidências de que, em peixes, a indução dessa isoforma está relacionada à exposição a HPAs

(VAN DER OOST et al., 2003). Para se verificar a atividade catalítica da CYP1A, utiliza-se a análise da atividade enzimática da 7-etóxi-resorufina 0-deetilase (EROD), característica dessa isoforma. Esta análise é um método cinético que mede a 0-dealquilação do substrato não fluorescente 7-etóxi-resorufina em um produto fluorescente, a resorufina (SARASQUETE e SEGNER, 2000) (Figura 4).

Outras isoformas podem ser medidas igualmente através do uso de outros substratos fluorescentes, ou cujo produto seja fluorescente, como a metóxi (MR), pentóxi (PR) e benzóxi-resorufina (BR). Segundo alguns autores, em peixes, a atividade de P450 frente a estes substratos são indicativos das isoformas 1 A2 (MR), 2B (PR) e 3B (BR) do citocromo P450 (NICARETA, 2004; ARUKWE, et al., 2008). Porém, existem controvérsias sobre as corretas atribuições a isoformas específicas frente a cada um destes substratos.

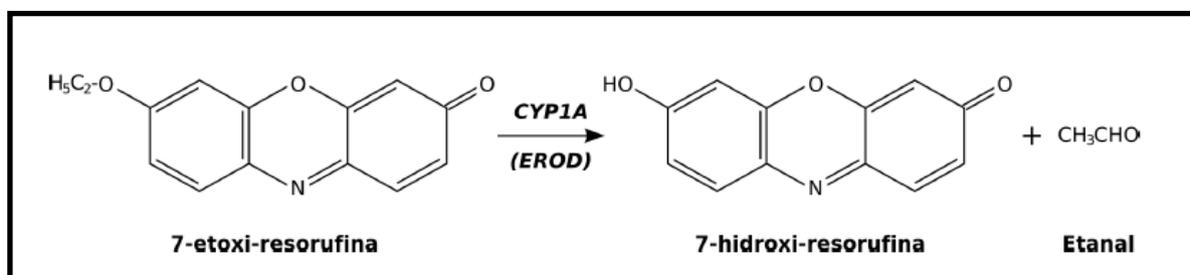


Figura 4 - Reação mostrando atividade do citocromo P450 sobre a 7-etóxi-resorufina.

Adaptado de Whyte *et al.*

O metabolismo da fase *II* envolve a adição de um ligante endógeno, geralmente um grupo polar, ao xenobiótico ou a seus metabólitos, para facilitar ainda mais sua excreção (VAN DER OOST et al., 2003). As glutionasS-transferases (GST) são uma das classes de enzimas que desempenham essa função.

As GST são um grupo de enzimas da fase *II* que catalisa a reação de conjugação do tripeptídeo glutadiona(glutamil-cisteinil-glicina) na forma

reduzida (GSH) com uma variedade de compostos eletrofilicos, envolvendo a detoxificação de intermediários reativos, assim como de alguns peróxidos orgânicos. A maioria dos estudos que determinam a atividade de GST total utiliza o substrato artificial 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB, Figura 5) por ser substrato para a maior parte das isoformas de GSTs (VAN DER OOST et al., 2003)

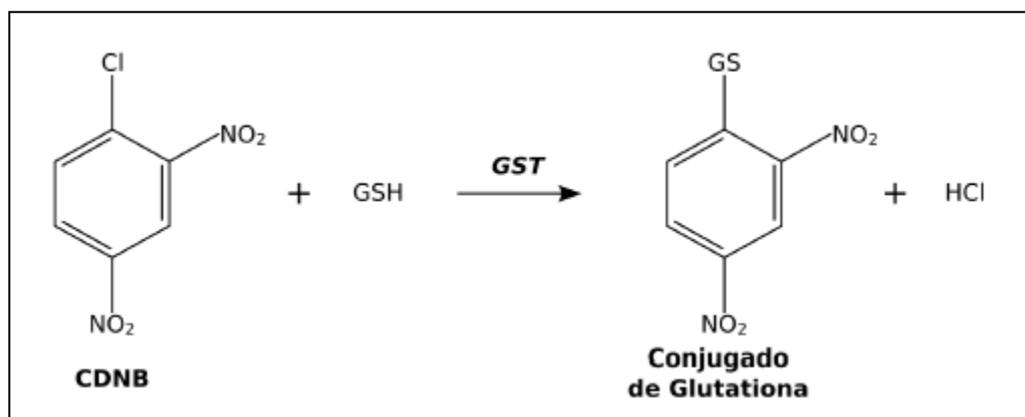


Figura 5 - Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDBN. A GSH é introduzida na posição 1 no lugar do Cl, dando origem a um conjugado de glutaciona.

### Efeito de misturas de contaminantes em organismos aquáticos

Existem muitos estudos que avaliam os efeitos bioquímicos dos contaminantes isolados nos organismos (ORUC, 2010; WILLS et al., 2010; VILLA-CRUZ, 2009), mas somente estudos recentes tratam de efeitos de misturas de contaminantes em biomarcadores bioquímicos, sendo que a maioria desses estudos trata de biomonitoramento ambiental (IWANOWICZ et al., 2011; LU et al., 2011).

Sabe-se que a resposta a contaminantes combinados pode ser maior ou menor que a soma dos efeitos de cada um deles isoladamente, podendo-se ter:

- Efeito Aditivo: efeito final igual à soma dos efeitos de cada um dos agentes envolvidos;

- Efeito Sinérgico: efeito maior que a soma dos efeitos de cada agente em separado);
- Potencialização: o efeito de um agente é aumentado quando em combinação com outro agente;
- Antagonismo: o efeito de um agente é diminuído, inativado ou eliminado quando se combina com outro agente.

A avaliação dos efeitos de multixenobióticos, uma situação atualmente corriqueira nos ambientes aquáticos, é de extrema valia uma vez que pouco se conhece a esse respeito e os trabalhos já realizados sobre o assunto são bastante escassos e geralmente tratam de misturas de contaminantes de uma mesma categoria como, dois ou mais poluentes orgânicos, diferentes pesticidas, DEs.

Estudos relatam que o BaP, em altas concentrações, é indutor da GST e EROD e que o E2 é inibidor da EROD, mas não há estudos que relatam a associação dos dois compostos, quando o organismo é pré-exposto a um desses e posteriormente é exposto ao outro, não se conhecendo então os efeitos dessa interação na atuação das duas enzimas. Não se sabe também, se a ordem de exposição seqüencial de compostos tóxicos pode acarretar em respostas diferentes, ou seja, se ao pré-expor os peixes ao E2, seguido do BaP, se a resposta será a mesma que pré-expor os animais ao BaP seguido do E2. Também já foi mostrado em trabalho anterior no nosso laboratório que o E2 induz a BROD e a BROD (BITENCOURT et al, 2011) e assim optamos por testar se o BaP tem o mesmo efeito e esse a associação dos dois contaminantes potencializam o efeito.

Assim esse estudo avaliou se a metabolização desses dois compostos em misturas potencializa ou reduz a atividade das enzimas durante as fases *I* e *II*, visando fornecer informações importantes que contribuirão para a discussão e compreensão de achados bioquímicos em biomonitoramento aquático de ambientes sujeitos a mistura de contaminantes.

## **Peixes como sentinelas em estudos da qualidade da água**

É comum a utilização de invertebrados no monitoramento ambiental, pois são componentes majoritários dos ecossistemas e apresentam abundância populacional (MARTINEZ et al., 1992; PÉQUEUX, 1995). Entretanto, o número de trabalhos em que peixes são empregados como sentinelas da qualidade dos ecossistemas aquáticos vem aumentando com o tempo. No Brasil, ainda são poucos os estudos de campo que avaliam as respostas biológicas de espécies nativas aos eventuais contaminantes presentes no ambiente (WINKALER et al., 2001). Os peixes ocupam os mais diversos ambientes aquáticos e são de grande importância comercial, já que fazem parte da dieta de muitos países e, em alguns deles, são a principal fonte de proteínas. Assim, vários trabalhos fazem uso destes animais para avaliar o efeito do estresse causado por variações no ambiente aquático.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie amplamente utilizada como organismo sentinela em estudos de contaminação de ambientes de água doce. A espécie é de origem africana, foi introduzida no Brasil em 1971 em açudes do nordeste, e no sudeste em 1982. Atualmente, no estado de São Paulo, é a principal espécie cultivada em aquicultura como fonte alimentar. É reconhecida pela sua sensibilidade em responder rapidamente às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

### **Abjetivo**

O objetivo central desse projeto foi avaliar diversas respostas bioquímicas decorrentes de exposição ao poluente orgânico benzo(a)pireno e ao desregulador endócrino 17 $\beta$ -estradiol isoladamente e em misturas em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Dentre os biomarcadores de contaminação ambiental, foram analisados sistemas relacionados com a biotransformação de xenobióticos da fase *I* (atividade EROD, BROD e PROD) e fase *II* (atividade da GST);

### Objetivos específicos

As hipóteses testadas avaliaram se a pré exposição ao E2 inibe a atividade EROD a ponto de não ser induzida pela posterior exposição ao BaP, se a pré-exposição ao BaP induz a atividade EROD a ponto de não ser inibida pela posterior exposição ao E2 e se a pré-exposição a um dos compostos seguida da exposição ao outro induz mais significativamente a GST, a BROD e a BROD do que no grupo só exposto a um composto.

Assim, o presente trabalho teve por intuito o diagnóstico da exposição dos peixes aos contaminantes isoladamente, e verificar quais modificações ocorrem nestas respostas quando os peixes são expostos a misturas complexas dos mesmos.

### Metodologia

A espécie de peixes utilizada no experimento foi a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Foram usados 91 peixes machos com peso de  $64,01 \pm 13,90$  g e tamanho de  $12,4 \pm 1,16$  cm, mantidos em aquários com 100 L de água, sob constante aeração e temperatura controlada de  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , privados de alimentação.



Figura 6- Tilápia do nilo - *Oreochromis niloticus*

O experimento de exposição dos peixes foi realizado na EMBRAPA-Jaguariúna/SP em abril de 2010. Foram usadas as concentrações de 0,3 mg/L de benzo(a)pireno e 5 µg/L de 17β-estradiol diluídos em acetona, adicionados nos aquários conforme o Quadro 1. Acetona foi adicionada também nos grupos controle.

Inicialmente os aquários foram montados e enchidos com 100L de água, constantemente aerada por meio de aeradores. Colocaram-se então os peixes e, após 48 h se iniciou a adição dos contaminantes, de acordo com o Quadro I. No total foram usados 14 aquários, sendo 7 deles usados para exposição por 5 dias e os outros 7 expostos por 10 dias. Os desenhos experimentais de adição dos contaminantes foram iguais para os dois períodos de exposição. O aquário I não recebeu tratamento, sendo considerado o grupo controle. Os aquários 2 e 5 receberam tratamento com E2 no tempo zero e, após 3 dias, o aquário 5 recebeu tratamento com BaP. Os aquários 3 e 6 receberam tratamento com BaP no tempo zero e, após 3 dias, foi adicionado o E2 no aquário 6. Dois outros aquários, sem nenhum tratamento no tempo zero (4 e 7), receberam tratamento com E2 (aquário 4) e BaP (aquário 7) após 3 dias.

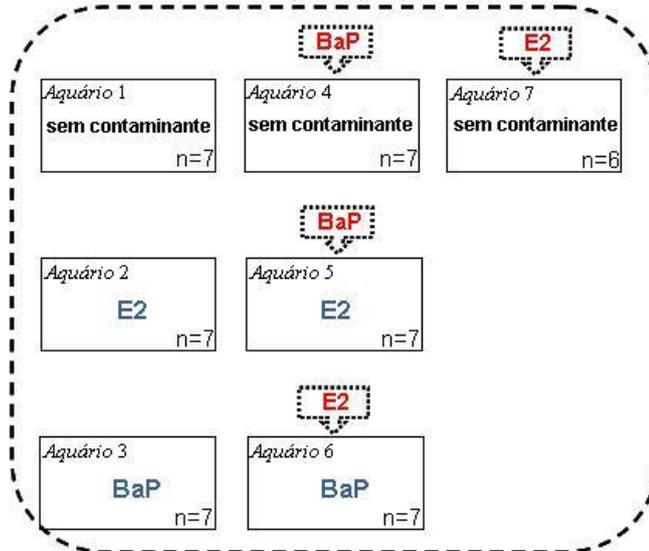
Os peixes do primeiro grupo de 7 aquários foram coletados após 5 dias do início das adições dos contaminantes (tempo zero), enquanto que os animais dos 7 aquários restantes (Grupo II) foram coletados após 10 dias. Portanto, a disposição dos aquários com os respectivos contaminantes ficou a seguinte:

- Aquário 1: sem contaminantes
- Aquário 2: exposto somente a E<sub>2</sub> nos 5 dias
- Aquário 3: exposto exposto somente a BaP nos 5 dias
- Aquário 4: sem contaminantes nos 2 primeiros dias e depois exposto a BaP por 2 dias
- Aquário 5: pré-exposto a E<sub>2</sub> por 3 dias e posteriormente a BaP por 2 dias
- Aquário 6: pré-exposto a BaP por 3 dias e posteriormente a E<sub>2</sub> por 2 dias

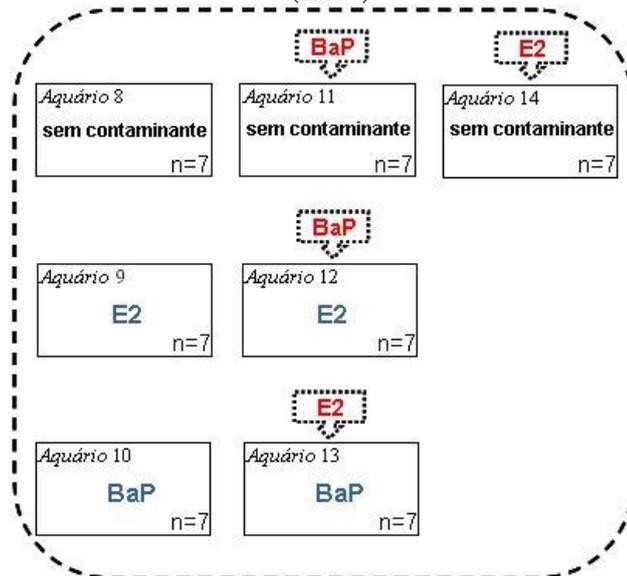
- Aquário 7: sem contaminantes nos 3 primeiros dias e depois exposto a E<sub>2</sub> por 2 dias
- Aquário 8: sem contaminantes
- Aquário 9: exposto somente a E<sub>2</sub> nos 10 dias
- Aquário 10: exposto exposto somente a BaP nos 10 dias
- Aquário 11: sem contaminantes nos 3 primeiros dias e depois exposto a BaP por 7 dias
- Aquário 12: pré-exposto a E<sub>2</sub> por 3 dias e posteriormente a BaP por 7 dias
- Aquário 13: pré-exposto a BaP por 3 dias e posteriormente a E<sub>2</sub> por 7 dias
- Aquário 14: sem contaminantes nos dois primeiros dias e depois exposto a E<sub>2</sub> por 7 dias

No dia 12/04: montar os aquários, encher com água, colocar todos os peixes e oxigenar  
 No dia 14/04: adicionar os compostos, conforme especificado dentro de cada aquário (em azul)  
 No dia 17/04: adicionar o outro contaminante (em vermelho)  
 No dia 19/04: sacrificar todos os animais do QUADRO II  
 No dia 24/04: sacrificar todos os animais do QUADRO III

**QUADRO II**  
Sacrificar no 5º dia  
(19/04)



**QUADRO III**  
Sacrificar no 10º dia  
(24/04)



Quadro 1 - Esquematização do experimento

### **Processamento das amostras**

Os peixes tiveram os fígados dissecados e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Amostras de tecidos foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, sacarose 0,5M; pH 7,4; contendo inibidores de protease (PMSF 100 $\mu\text{M}$ ), e centrifugados a 9168 x g por 20 minutos. A fração sobrenadante foi coletada e centrifugada novamente a 50.000 x g por 60 minutos, para a obtenção das frações citosólica e pellet.

### **Avaliação da atividade do Citocromo P450**

A atividade de citocromo P450 foi avaliada pela especificidade de três isoformas pelos substratos: Etoxirosorufina *O*-desetilase (EROD), Benziloxirosorufina *O*-desbenzilase (BROD) e Pentoxirosorufina *O*-despentilase (PROD). As atividades da EROD, BROD e PROD foram medidas segundo o método de Burke e Mayer (1985) modificado. Extratos microsomais protéicos do fígado foram avaliados em um espectrofluorímetro por 3 min.

### **Glutathione S-transferase**

Na fração citosólica, avaliou-se a atividade da GST pelo método de Keen, Habig e Jakoby (1976). O aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm em espectrofotômetro durante 1 minuto.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistica 7.1. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Diferenças significativas detectadas entre os grupos foram aceitas para valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Atividade da EROD

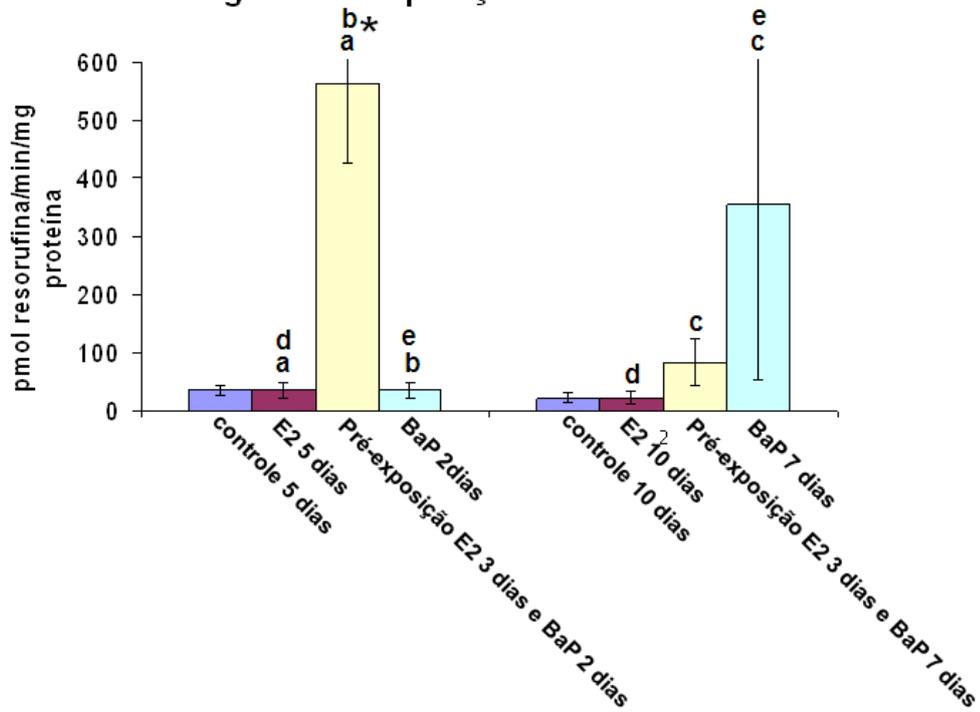
Conforme pode-se observar na Figura 7, a atividade da enzima não foi afetada pela exposição ao E<sub>2</sub> nos períodos analisados. O grupo pré-exposto ao E<sub>2</sub> e posteriormente exposto ao BaP apresentou uma indução significativa na atividade da EROD quando comparado com os grupos expostos aos contaminantes isoladamente no menor período estudado. O grupo pré-exposto ao E<sub>2</sub> seguido da exposição ao BaP por 7 dias apresentou menor atividade da EROD quando comparado com a atividade do grupo exposto somente ao BaP por 7 dias e não apresentou diferença significativa em relação ao grupo exposto somente ao E<sub>2</sub>.

O grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto ao E<sub>2</sub> por 2 dias apresentou indução da EROD quando comparado aos grupos expostos exclusivamente ao E<sub>2</sub> e ao BaP, por 2 e 5 dias respectivamente ao BaP. Também o grupo pré-exposto ao BaP e exposto posteriormente ao E<sub>2</sub> por 7 dias apresentou maior atividade da EROD quando comparado aos grupos expostos exclusivamente ao E<sub>2</sub> e BaP. A atividade da enzima foi maior no grupo exposto ao BaP por 5 dias do que no grupo exposto por 10 dias e menor no grupo exposto ao E<sub>2</sub> por 7 dias do que no grupo exposto por 2 dias.

### Atividade da BROD

A atividade da BROD está representada na figura 8. O grupo pré-exposto ao E<sub>2</sub> e posteriormente exposto ao BaP por 7 dias apresentou indução significativa da BROD quando comparada com o grupo pré-exposto ao E<sub>2</sub> e posteriormente exposto ao BaP por 2 dias. Os demais tratamentos não apresentaram resultados significantes para  $p < 0,05$ .

EROD no fígado: pré-exposição ao E2 seguida de exposição ao BaP



EROD no fígado: pré-exposição ao BaP seguida de exposição ao E2

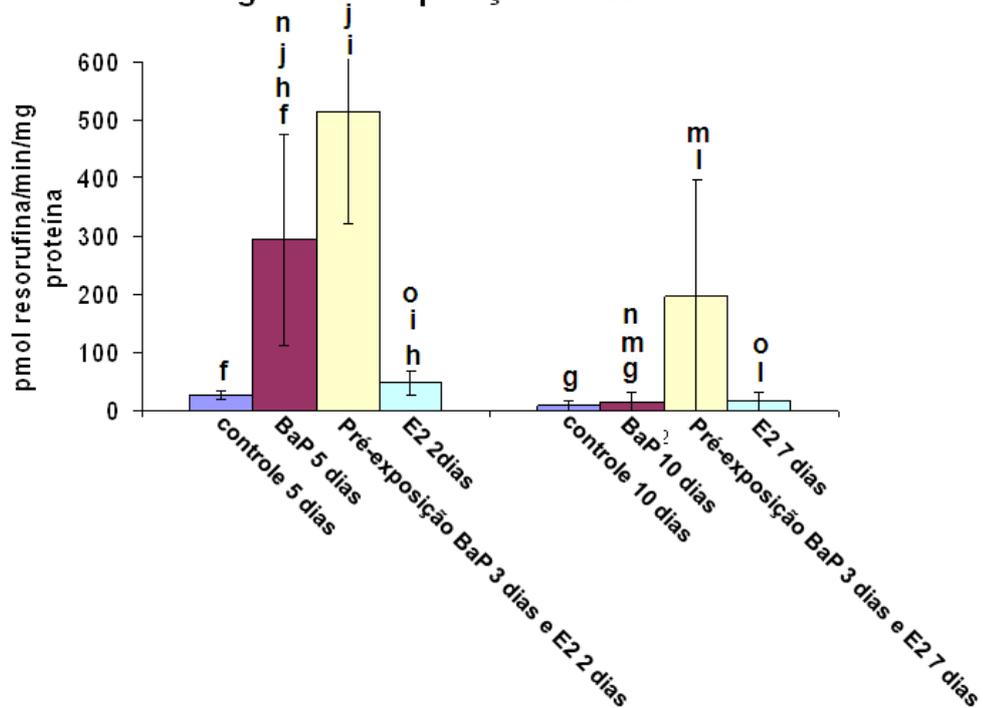


Figura 7 - Atividade da etóxi-resorufina O-desalquilase (EROD) no fígado de tilápias após exposição a misturas de benzo(a)pireno (BaP) e 17β-estradiol (E2). Letras iguais indicam diferença significativa para  $p < 0,05$ . \* indica diferença entre o grupo pré-exposto ao E2 3 dias e BaP 7 dias para  $p < 0,05$ .

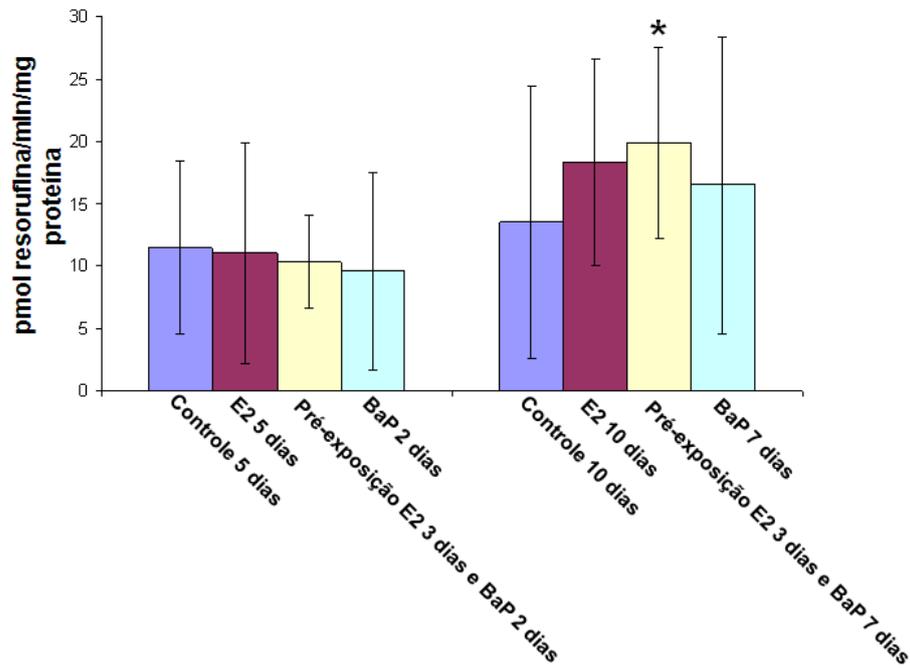
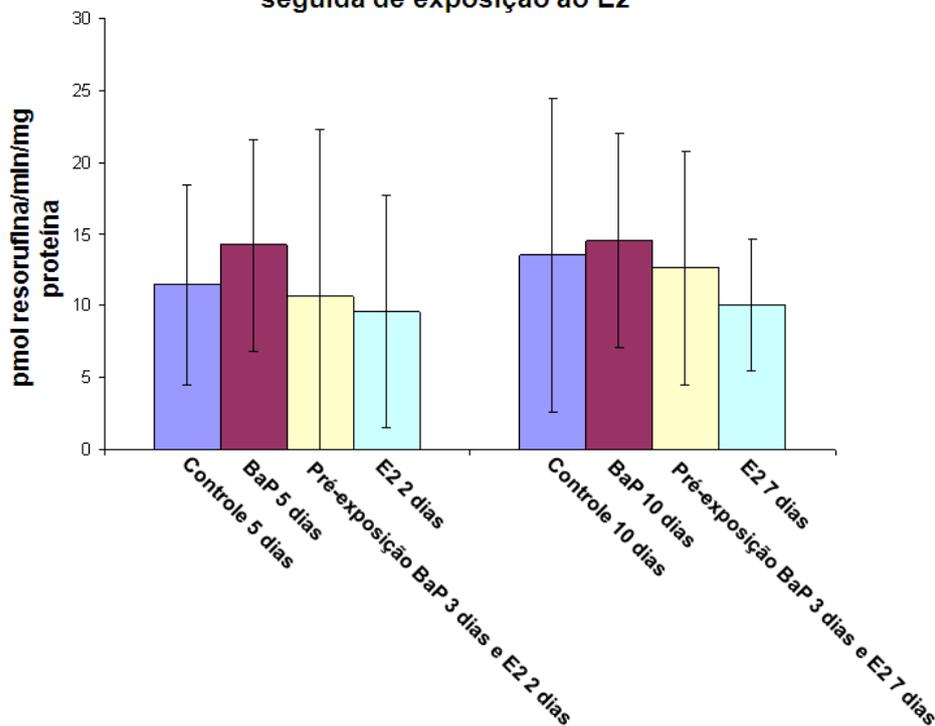
BROD no fígado: pré-exposição ao E2  
seguida de exposição ao BaPBROD no fígado: pré-exposição ao BaP  
seguida de exposição ao E2

Figura 8 - Atividade da benzil-resorufina O-desalquilase (BROD) no fígado de tilápias após exposição a misturas de benzo(a)pireno (BaP) e 17 $\beta$ -estradiol (E2). \* indica diferença entre o grupo pré-exposição E2 3 dias e BaP 2 dias para  $p < 0,05$ .

MONERÓ, T.; RODRIGUES, A.C.; ALMEIDA, E.A. Efeitos da associação de benzo(a)pireno e 17- $\beta$ -estradiol em biomarcadores de biotransformação em tilápias *Oreochromis niloticus*. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.6, n.2, p.32-61, Jun.2013

### **Atividade da PROD**

A atividade da PROD está representada na Figura 9.

O grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto ao BaP por 2 dias apresentou indução da PROD quando comparado com os grupos expostos exclusivamente ao BaP por 2 dias e ao E2 por 5 dias. A atividade da enzima foi significativamente maior no grupo exposto à mistura de E2 e BaP no menor período de tempo quando comparado ao maior período.

O grupos expostos ao BaP por 5 e 10 dias apresentaram indução da PROD porém não diferiram entre si. O E2 não alterou a atividade da enzima em relação aos grupos controles mas a atividade do grupo exposto ao hormônio por 7 dias foi maior do que no grupo exposto por 2 dias.

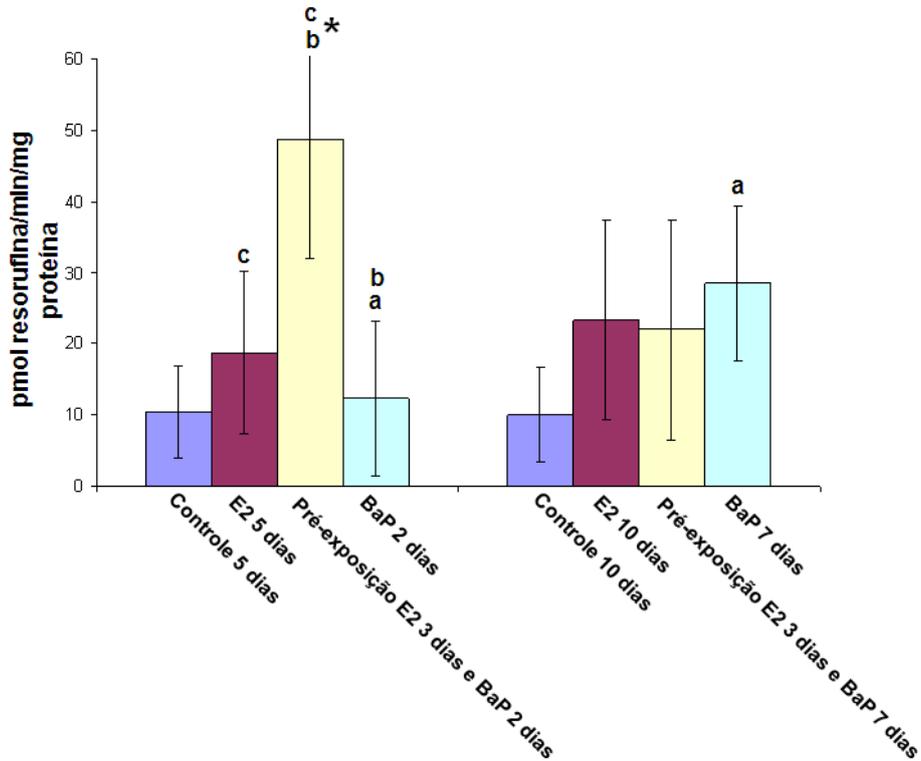
Os demais tratamentos não alteraram significativamente a atividade da enzima.

### **Atividade da GST**

A atividade da GST está representada na Figura 10. O E2 induziu a atividade da enzima somente após 5 dias de tratamento e os grupos expostos ao BaP apresentaram indução da atividade da enzima nos dois períodos avaliados. A atividade da GST foi maior no grupo exposto ao BaP por 2 dias do que no grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto ao BaP por 2 dias e também foi maior no grupo exposto ao BaP por 7 dias do que no grupo pré-exposto ao E2 e posteriormente exposto ao BaP por 7 dias.

O BaP induziu a GST após 5 e 10 dias e no grupo exposto somente ao BaP por 5 dias a atividade da enzima foi maior do que no grupo pré-exposto ao BaP e posteriormente exposto ao E2 por 2 dias. Os demais tratamentos não afetaram significativamente a atividade da enzima.

PROD no fígado: pré-exposição ao E2  
seguida de exposição ao BaP



PROD no fígado: pré-exposição ao BaP  
seguida de exposição ao E2

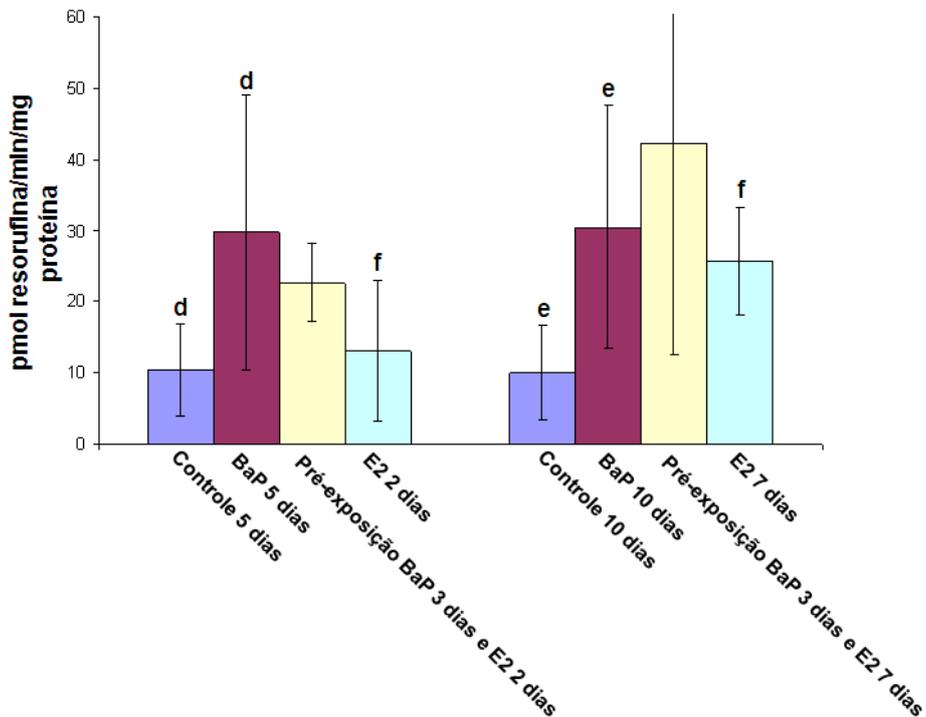


Figura 9 - Atividade da pentil-resorufina O-desalquilase (PROD) no fígado de tilápias após exposição a misturas de benzo(a)pireno (BaP) e 17 $\beta$ -estradiol (E2). Letras iguais indicam diferença significativa para  $p < 0,05$ .

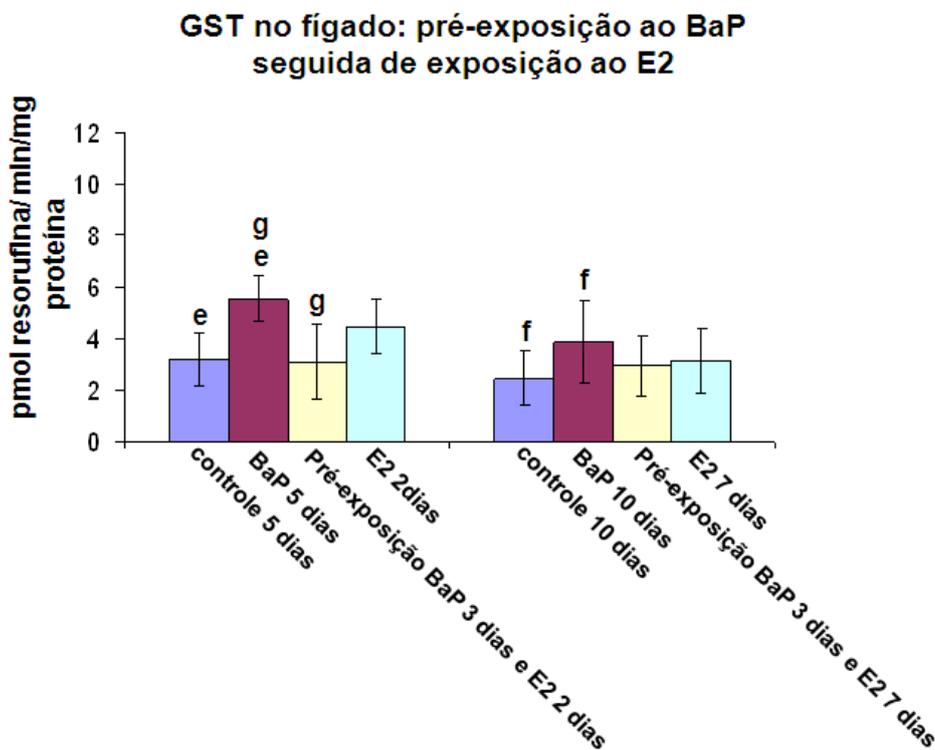
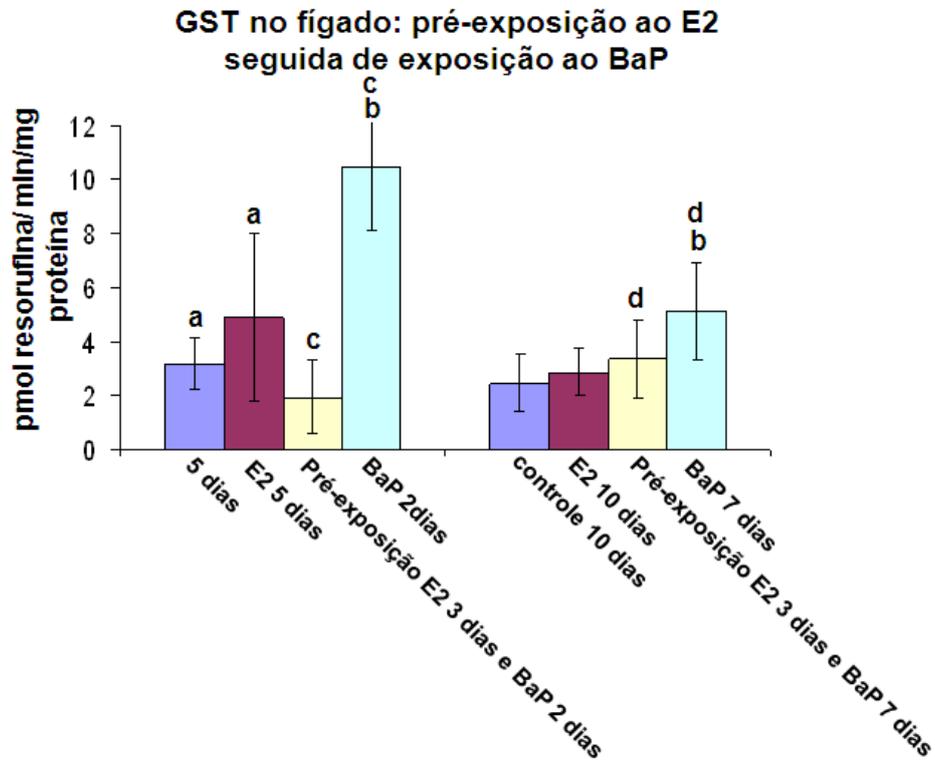


Figura 10 - Atividade da glutathione S-transferase (GST) no fígado de tilápias após exposição a misturas de benzo(a)pireno (BaP) e 17 $\beta$ -estradiol (E2). Letras iguais indicam diferença significativa para  $p < 0,05$ .

## Discussão

O fígado é um órgão importante quando se considera a ação dos poluentes químicos sobre o peixe, pois é o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos e, por isso, é potencialmente vulnerável à ação tóxica de um xenobiótico. Devido à sua função na biotransformação de xenobióticos e sua sensibilidade a eles, esse órgão tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes por agentes químicos orgânicos e inorgânicos (HINTON et al., 1992). Portanto, o fígado dos peixes é considerado um órgão-alvo para estudos de contaminação ambiental, justificando, assim, a análise da atividade das enzimas neste órgão.

Estudo prévio em nosso laboratório revelou que o BaP a 0,5 mg/L induziu a EROD na espécie *Oreochromis niloticus* (TRIDICO et al., 201). Em outro estudo em nosso grupo, Bitencourt et al. (2011) avaliaram os efeitos do E<sub>2</sub> nas concentrações de 5 e 15  $\mu$ g/L, no qual significativos aumentos na BROD e PROD foram observados. Baseado nesses dados, optamos por testar as concentrações de 0,3 mg/L do BaP e assim avaliar se essa concentração um pouco mais baixa causa indução da EROD e se a concentração de 5  $\mu$ g/L do hormônio causa efeitos nos mesmos parâmetros.

O aumento da atividade de enzimas de biotransformação de fases I e II, como citocromo P450 e glutathione S-transferase (GST), respectivamente, são considerados os primeiros sinais biológicos da presença de poluentes no meio ambiente (van der Oost et al., 2003).

A EROD é comumente utilizada para verificar a indução do citocromo P450 1A em peixes expostos a vários contaminantes, principalmente

aosHPAs (VAN DER OOST et al., 2003). Sendo o BaP um HPA, estudos relatam que o composto é indutor da EROD.

No entanto, o composto E2 é conhecido por inibir a atividade da EROD em peixes (VACCARO et al., 2005), porém o mecanismo que leva a essa inibição foi muito pouco esclarecido. Navas e Segner (2001) tentaram elucidar esse mecanismo e relatam que ocorrem dois eventos, inibição direta pelo E2 do sítio catalítico da enzima CYP 1A e inibição da transcrição de CYP 1A pela ligação E2-ER (receptor-estrógeno). Assim a atividade EROD é considerada também um biomarcador sensível a hormônio estrogênico.

Navas e Segner (2001) observaram que a indução da atividade EROD pela  $\beta$ NF ( $\beta$ -naftoflavona) em hepatócitos de truta não é afetada pela presença do E2. No presente estudo a EROD se mostrou induzida pelo BaP, mais acentuadamente no menor período de exposição do que no maior o que pode sugerir a recuperação do organismo no decorrer do tempo. No entanto, o E2 não afetou a atividade da enzima de forma inversa, sugerindo que a concentração e/ou período de exposição testados não foram suficientes para inibir a enzima. A mistura dos dois contaminantes apresentou resultados intrigantes quanto à atividade da EROD.

A mistura do E2 com o BaP nos animais testados, no maior período analisado, mostrou que o efeito inibidor do E2 se sobressai em relação ao efeito do indutor BaP, pois, na mistura, a atividade da EROD se mostrou menor do que no grupo exposto somente ao BaP. No menor período analisado, os resultados foram adversos, pois o grupo exposto somente ao BaP, mostrou menor atividade da enzima do que o grupo exposto à mistura. Esses dados foram intrigantes no sentido de que, apesar do E2 causar inibição da EROD quando estudado isoladamente, apresentou um efeito contrário na presença do indutor BaP, resultando em um efeito de potencialização (o efeito de um agente é aumentado quando em combinação com outro agente). Assim, os resultados podem sugerir que o fator tempo de

exposição pode diferir no tipo de resposta em relação ao estímulo da biotransformação.

Já a mistura do BaP com o E2, em ambos os períodos analisados, mostrou que o efeito indutor do BaP se sobressai ao efeito inibidor do E2, pois houve maior indução da EROD nos grupos expostos às misturas do que nos grupos expostos somente ao BaP.

Os resultados obtidos com as misturas sugerem que a pré-exposição a um outro contaminante pode diferir na resposta da biotransformação desses contaminantes associados.

A associação dos dois contaminantes apresentou uma diminuição da atividade da GST durante o período de 5 dias comparado com a exposição aos dois contaminantes isoladamente. E, na exposição por 10 dias, a mistura dos dois contaminantes apresentou uma menor atividade do que somente ao grupo exposto exclusivamente ao BaP. Estes resultados sugerem que o E2 age de forma a minimizar os efeitos causados pelo BaP, apresentando um efeito antagônico (o efeito de um agente é diminuído, inativado ou eliminado quando se combina com outro agente).

A atividade da PROD como indicativo da isoforma 2B (Trust et al., 2000) e a atividade da BROD como indicativo da isoforma 3A (Hagemeyer et al., 2010) são biomarcadores também sensíveis, porém são estudados com menos frequência em peixes e outros organismos aquáticos, sendo a BROD ainda menos avaliada. As atribuições de atividade da BROD e PROD às isoformas específicas de P450 em peixe ainda não são conclusivas na literatura.

Meimberg *et al.* (1997) observaram indução da EROD, BROD e PROD em gastrópodes expostos a Aroclor 1254 (composto formado por mistura de bifenilas policloradas). Estudo prévio em nosso laboratório mostrou a indução da BROD por 5 e 15 µg/L de E2 e indução da PROD por 15 µg/L (Bitencourt et al. 2011).

Porém, nesse estudo a BROD se mostrou induzida por 5 µg/L do E2 apenas no grupo pré-exposto ao hormônio e posteriormente exposto ao BaP, no maior período de exposição em relação ao menor período de exposição, sugerindo a atuação da isoforma 3A na metabolização de organismo exposto à mistura dos contaminantes. Nossos resultados não sugerem a atuação da isoforma na metabolização dos contaminantes individualmente, nas concentrações e períodos testados.

A PROD se mostrou um biomarcador mais sensível do que a BROD frente às exposições testadas. A exposição à mistura do E2 com o BaP, no menor período de tempo, induziu mais acentuadamente a enzima do que nos grupos expostos ao BaP e E2 individualmente, sugerindo, dessa forma, um efeito sinérgico (efeito de um é potencializado pela presença do outro) dos dois contaminantes sobre a isoforma 2B.

Tridico et al (2010) observou indução da GST em *Oreochromis niloticus* após exposição a 0,5 mg/L de BaP. No entanto, sabe-se que durante a fase II da metabolização dos hormônios esteróides a UDPGT (uridina difosfato glicuronil transferase), tem papel fundamental sobre esses compostos, mais do que a GST (Guillemette et al., 2004; Solé et al., 2003). O presente estudo mostrou que também a GST atuou nesse processo após 5 dias de exposição, podendo ser considerada um biomarcador para exposição ao E2 a curto período.

A associação dos dois compostos afetou a atividade das enzimas de forma adversa, principalmente no menor período analisado. A atividade da GST no menor período experimental se mostrou maior nos grupos expostos exclusivamente ao BaP do que nas misturas. Como, de um modo geral, as misturas de E2 e BaP diminuíram a atividade da GST, os resultados sugerem que a mistura pode afetar o organismo de forma a agravar o quadro de intoxicação, acarretando uma diminuição na resposta da metabolização dos compostos em associação.

## 7. Conclusão

Os resultados sugerem que a associação do E2 como BaP reduz a atuação da GST na metabolização desses compostos pelos peixes em curto período de exposição. Com relação à EROD, de modo geral, o efeito de indução do BaP se sobrepõe ao efeito de inibição do E2, e o E2 parece modular de forma positiva a indução da EROD na presença do BaP. A PROD é induzida pelo BaP e a pré-exposição ao E2 potencializa esse efeito em curto período de exposição. A pré-exposição ao E2 seguida de exposição ao BaP induziu a BROD no maior período de exposição. Sendo assim, recomenda-se que os efeitos da associação do BaP e E2 devam ser considerados na interpretação dos resultados apresentados pelos organismos expostos à mistura desses contaminantes em estudos de biomonitoramento ambiental.

## 7. Agradecimentos

Agradecemos à EMBRAPA e à FAPESP por confiarem no nosso trabalho e pela parceria estabelecida.

## 8. Referência Bibliográfica

ARUKWE, A.; NORDUDTOG, T.; KORTNER, T.; MORTENSEN, A.; A. S.; BRAKSTAD, O. G. **Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil.** *Environmental Research*, 2008, p. 362-370

BITENCOURT, F.; FRIGHETTO, R.T.S.; QUEIROZ, J.F.; LOSEKANN, E.; LUIZ, A.J.B.; ALMEIDA, E.A. **PROD and BROD Modulation in Nile Tilapia after Exposure to 17  $\beta$ -estradiol.** *Journal of Life Sciences* n. 5, p. 287-90, 2011.

BRAMMELL, B.F.; PRICE, D.J.; BIRGE, W.J.; HARMEL-LAWS, E.M.; HILTRON, J.A.; ELSKUS, A. **Differential sensitivity of CYP1A to 3,3',4',4-tetrachlorobiphenyl and benzo(a)pyrene in two *Lepomis* species.** *Comparative Biochemistry Physiology . Toxicology and Pharmacology.*, v. 152, p. 42-50, 2010.

COSTA, J.; FERREIRA, M.; REIS-HENRIQUES, M.A. **Exposure route as a key factor in benzo(a)pyrene detoxification in Nile tilapia.** *15th. International Symposium "Pollutant Responses in Marine Organisms" (PRIMO 15)*, 17-20 Maio. Bordéus, França. [poster](#) 2009

CRESSER, M.; KILLHAM, K.; EDWARDS, T. **Soil Chemistry and its Applications**, Cambridge, New York, p.322. 1993

CURTIS, L.R.; GARZON, C.B.; ARKOOSH, M.; COLLIER, T.; MYERS, M.S.; BUZITIS, J.; HAHN, M. E. **Reduced cytochrome P4501A activity and recovery from oxidative stress during subchronic benzo[a]pyrene and benzo[e]pyrene treatment of rainbow trout.** *Toxicology and Applied Pharmacology.* v. 254, p. 1-7, 2011.

FIEDLER, H.; MUCKE, W. **In The Handbook of Environmental Chemistry**; Hutzinger, O., Ed.; Springer Verlag, Berlin, v. 3G. 1995

GUILLERMETTE, C.; BÉLANGER, A.; LÉPINE, J. **Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview.** *Breast Cancer Research.*, v. 6, n. 6, p. 246-54, 2004.

HAGEMEYER, C.E.; BURCK, C.; SCHWAB, R.; KNOTH, R.; MEYER, R.P. **7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase activity as a marker for measuring cytochrome P450 CYP3A induction in mouse liver.** *Analytical Biochemistry.* 2010.

HARVEY, R. G. **In Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis**, Harvey, R. G.; Ed.; American Chemical Society, Washington, DC, p. 371. 1985

HENSON, K.L.; GALLAGHER, E.P. **Glutathione S-Transferase Expression in Pollution-Associated Hepatic Lesions of Brown Bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from the Cuyahoga River, Cleveland, Ohio.** *Toxicology Science.*, v. 80, p. 26–33, 2004.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S.

MONERÓ, T.; RODRIGUES, A.C.; ALMEIDA, E.A. **Efeitos da associação de benzo(a)pireno e 17- $\beta$ -estradiol em biomarcadores de biotransformação em tilápias *Oreochomis niloticus*.** *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v.6, n.2, p.32-61, Jun.2013

**Histopathologic Biomarkers.** In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.** *Boca Raton: Lewis Publishers*, 1992. cap. 4, p. 155 –196.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. **Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes.** *American Fisheries Society Symposium*, n. 8, p. 51- 66, 1990.

HUBER, M. M., TERNES, T. A., VON GUNTEN, U. **“Removal of Estrogenic Activity and Formation of Oxidation Products during Ozonation of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol”**, *Environment Science and Technology*, v. 38, pp. 5177-5186, 2004.

IWANOWICZ, L.R.; BLAZER, V.S.; HITT, N.P.; MCCORMICK, S.D.; DEVAULT, D.S.; OTTINGER, C.A. **Histologic, immunologic and endocrine biomarkers indicate contaminant effects in fishes of the Ashtabula River.** *Ecotoxicology*, 2011

JACOB, J.; KARCHER, W.; BELLUARDO, J. J.; DUMLER, R.; BOENKE, A. **Fresenius J. Analytic Chemistry.** P. 340, 755. 1991

LEMAIRE, P.; LIVINGTONE, D. R. 1993. **Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and mussel *Mytilus edulis*.** *Trends Comp. Biochemistry. Physiology*. v. 1, p. 1119-50

LU, G.; YAN, Z. WANG, Y.; CHEN, W. **Assessment of estrogenic contamination and biological effects in Lake Taihu.** *Ecotoxicology*, v 20, p. 974-81., 2011.

MARTINEZ, C. B. R.; SUADICANI, S. O.; FERRONI, E. N.; MOREIRA, G. S. **Effect of benzene on the swimming activity of *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea).** *Brazilian J. Med. Biol. Res.* V. 25, p. 487 – 490, 1992. In: SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores de contaminação aquática.** Londrina, 2004

MEIMBERG, H.; SCHRENK, C.; STEINBERG, C.; KLARENBERG, A.; KETTRUP, A. **Induction of ethoxy, pentoxu- and benzoxyresorufin-O-dealkylase in limnetic gastropods via Aroclor 1254.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 4, p. 183-88, 1997.

MUNRO, A.W.; GIRVAN, H. M.; MCLEAN, K. J. **Variations on a (t)heme–novel mechanisms, redox partners and catalytic functions**

MONERÓ, T.; RODRIGUES, A.C; ALMEIDA, E.A. Efeitos da associação de benzo(a)pireno e 17- $\beta$ -estradiol em biomarcadores de biotransformação em tilápias *Oreochomis niloticus*. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.6, n.2, p.32-61, Jun.2013

**in the cytochrome p450 superfamily. *Natural Products Report*, v. 24, n. 3, p. 585–609, 2007**

NAVAS, J.M.; SEGNER, H. **Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. *Chemico-Biological Interactions* v. 138,p. 285-98, 2001.**

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis*. (Mestrado), Curitiba, 2004.**

NORDBERG, J.; AMÉR, E. S. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biology and Medicine*, v. 31, n. 11, p. 1287–312, 2001**

NORTON, W.N.; MATTIE, D. R.; KEARNS, C. **Lesions induced by aromatic hydrocarbons, *Am. J. Pathol.*, Louisiana, v. 118 , n. 3, p. 387–397. 1985**

ORUC, E. **Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio* (L.). *Environmental Health Perspectives* .v. 118, p. 1376-81, 2010.**

PARENTE, E.M.; DE OLIVEIRA, A.C.A.X.; SILVA, I.B.; ARAÚJO, F.G.; PAUMGARTTEN, F.J.R. **Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere.*, v. 54,p.1613–18, 2004**

PÉQUEUX, A. **Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*. v. 1, n.15, p. 1 – 60, 1995**

SARASQUETE, C.; SEGNER, H. **Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Science Total Environmental*, v. 247, p. 313–332, 2000.**

SARKAR, A.; RAY, D; SHIRIVASTAVA, A.N., SARKER, S. **Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15(4): 333-340. 2006**

SOLÉ, M.; RALDUA, D.; PIFERRER, F.; BARCELÓ, D.; PORTE, C. **Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 136, n. 2, p. 145-56, 2003.

SOTO, A. M.; RUBIN, B. S.; SONNENSCHNEIN, C. **Interpreting endocrine disruption from an integrative biology perspective.** *Molecular and cellular endocrinology*.v.304, p. 3-7, 2009.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E.; WEISBROD, R.; WOODIN, B. R.; JOY, J. S.; NAJIBI, S.; COHEN, R. A. 1995. **Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells.** *Molecular Pharmacology*.v. 47, n. 2, p. 296-306

TREVELIN, W. R. **Otimização da Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em sistemas aquosos.** Dissertação (Mestrado)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p.83. 1992

TRIDICO, C.P.; RODRIGUES, A.C.F.; NOGUEIRA, L.; DA SILVA, D.C.; MOREIRA, A.B.; ALMEIDA, E.A. **Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon.** *Ecotoxicology Environmental Safety*.v .73, p; 858-63, 2010.

TRUST, K.A.; RUMMEL, K.T.; SCHEUHAMMER, A.M.; BRISBIN, I.L.; HOOPER, M.J. **Contaminant Exposure and Biomarker Responses in Spectacled Eiders (*Somateria fischeri*) from St. Lawrence Island, Alaska.** *Environmental Contamination and Toxicology*, 2000

TUVIKENE, A. **Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).** *Ann. Zool. Fennici*, Tartu, v. 32, p. 295–309. 1995

VACCARO, E.; MEUCCI, V.; INTORRE, L.; SOLDANI, G.; DI BELLO, D.; LONGO, V.; GERVASI, P.G.; PRETTI, C.. **Effects of 17 $\beta$ -estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*).** *Aquatic Toxicology*.,v. 75,p. 293-305, 2005.

VAN DER HURK.. **Bile fluorescence, hemoxygenase induction, and increased biliverdin excretion by mixtures of environmental toxicants.** *Aquatic Toxicology*, v. 77, p. 202-9, 2006.

MONERÓ, T.; RODRIGUES, A.C; ALMEIDA, E.A. Efeitos da associação de benzo(a)pireno e 17- $\beta$ -estradiol em biomarcadores de biotransformação em tilápias *Oreochomis niloticus*. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.6, n.2, p.32-61, Jun.2013

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. **“Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesment: a review”**. *Environmental Toxicology Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003

VILLA-CRUZ, V.; DAVILA, J.; VIANA, M. T.; VAZQUEZ-DUHALT, R. **Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) and its phytochemical sulforaphane in balanced diets on the detoxification enzymes levels of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a carcinogenic and mutagenic pollutant**. *Chemosphere*, v. 74, p.1145-51, 2009.

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.; IWAMA, G. **Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes**. *The Journal of Experimental Biology*. v. 199, p. 2467-75, 1996.

WESTERHOFF, P.; YOON, Y.; SNYDER, S.; WERT, E. **Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes**. *Environmental Science Technology*. v. 39, n. 17, p. 6649-63, 2005

WILLS, L.P.; JUNG, D.; KOEHRN, K.; ZHU, S.; WILLET, K.L.; HINTON, D.E.; DI GIULIO, R.T. **Comparative chronic liver toxicity of benzo[a]pyrene in two populations of the atlantic killifish (*Fundulusheteroclitus*) with different exposure histories**. *Environmental Health Perspectives*. v 20, p. 974-81, 2011

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. dos R. **Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná**. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 2, p. 507 – 514, 2001.