

Biomarcadores enzimáticos em *Holothuria grisea* (Selenka, 1867) expostas ao chumbo, cádmio e cobre

Enzyme biomarkers in *Holothuria grisea* (Selenka, 1867) exposed to lead, cadmium and copper

Edgar R Pereira^{1,4}, Antônio Jesus D Cogo^{2,4}, Zilma Maria A Cruz^{3,4,*}

1. Mestrando em Ecologia de Ecossistemas; 2. Mestre em Biociências e Biotecnologia (UENF); 3. Professor Titular IV, Bolsista de Produtividade FUNADESP; 4. Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental e Genotoxicidade, Universidade Vila Velha (UVV). Rua Comissário José Dantas de Melo, n° 21. Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil. CEP 29102-920

*Autor para correspondência: zilma@uvv.br

Resumo Alguns elementos traço são capazes de se ligar a cadeias laterais de aminoácidos, inibindo a função biológica das proteínas. O presente trabalho avaliou a resposta das enzimas: acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE), fosfatase alcalina (ALP) e fosfatase ácida (AcP) em *Holothuria grisea*, expostas a concentrações de sulfato de cobre (0,05; 0,075 e 0,10 mg/L de cobre), acetato de chumbo (0,05; 0,10 e 0,20 mg/L de chumbo) e cloreto de cádmio (0,30; 0,40 e 0,50 mg/L de cádmio). O bioensaio foi desenvolvido em processo semi-estático e, após 96 horas, músculos longitudinais, gônadas, intestino e órgão arborescente foram retirados e processados para as determinações enzimáticas. A atividade da AChE e BChE foram detectadas somente em músculo longitudinal (45 mU/mg e 22 mU/mg de proteína respectivamente) e a exposição ao cádmio resultou em maiores percentuais de inibição. ALP foi detectada em intestino (873 mU/mg de proteína) e apresentou sensibilidade ao chumbo. Valores similares foram encontrados para AcP, detectada em órgão arborescente, cuja atividade foi de 852 mU/mg de proteína. Os maiores percentuais de inibição das fosfatases foram detectados aos indivíduos expostos ao chumbo. Os resultados indicam a possibilidade de *H. grisea* ser utilizada como bioindicador nos programas de monitoramento do ambiente costeiro, uma vez que os marcadores bioquímicos utilizados apresentaram sensibilidade aos metais pesados.

Palavras-chaves: *Holothuria grisea*, AChE, BChE, ALP, AcP

Abstract Some heavy metals have the ability to bind with the side chains of amino acids that form proteins, inhibiting their specific activity. The aim of this study was to evaluate the response of enzymes: acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (AcP) in tissues of *Holothuria grisea*, exposed to different concentrations of copper lead and cadmium. *H. grisea* were

collected at Santa Cruz beach, Aracruz, ES, and transferred to aquaria containing solutions of copper sulphate (0.05, 0.075 and 0.10 mg / L copper), lead acetate (0.05, 0.10 and 0.20 mg / L lead) and cadmium chloride (0.30, 0.40 and 0.50 mg / L cadmium). The bioassay was conducted in semi-static process, and after 96 hours, longitudinal muscles, gonads, intestines, arborescent organ were removed and processed for enzyme determination. AChE and BChE were detected in longitudinal muscle (45 mU/mg and 22 mU/mg protein respectively). Cadmium was the metal that cut the largest percentages of these enzymes. ALP was detected in intestine (873 mU/mg protein) and showed sensitivity when exposed to lead. Similar values were found for AcP were detected in arborescent organ, whose activity was 852 mU/mg protein. The highest values of inhibition were detected for individuals exposed to lead. The results indicate the possibility of *H. grisea* be used as a bioindicator in programs monitoring the coastal environment, once that the biochemical markers used showed sensitivity to heavy metals.

Keywords: *Holothuria grisea*, AChE, BChE, ALP, AcP.

Introdução

A presença de resíduos nos ecossistemas marinhos interfere diretamente no ciclo biológico natural do ambiente (Viselina e Luk'Yanova 2000, Quintaneiro *et al.* 2006). O litoral do Espírito Santo, além de apresentar várias comunidades pesqueiras, atrai turistas pela diversidade de ecossistemas e está exposto aos impactos causados por ação antrópica.

Metais como cobre, zinco e ferro são essenciais aos processos bioquímicos e fisiológicos em diversos organismos, porém tóxicos

quando em excesso. Por outro lado, cádmio, chumbo e mercúrio, são metais não essenciais e deletérios para o organismo quando em pequenas concentrações (Zagatto e Bertoletti, 2006). A utilização de bioindicadores constitui ferramenta importante na avaliação da toxicidade nos ambientes e a escolha de determinada espécie tem relação com seu deslocamento entre ambientes, sua presença em várias regiões e ainda sua resistência aos agentes impactantes (Quintaneiro *et al.* 2006, Napierska *et al.* 2009). Alterações metabólicas, histológicas e danos ao material genético, são formas de acompanhar a ação dos metais no organismo bioindicador. As enzimas, em especial, são utilizadas como biomarcadores desses elementos por serem ativadas ou inibidas quando expostas ao agente contaminante (Quintaneiro *et al.* 2006, Napierska *et al.* 2009).

A elevada concentração do cobre no ambiente deve-se principalmente às atividades humanas nos processos de mineração, de fundição, corrosão de tubulações, manufatura de moedas, inseticidas, fungicidas, algicidas, desinfetantes, tintas antiincrustantes e pigmentos industriais (Pedrozo 2003, Zagatto e Bertoletti 2006). Estudos demonstraram o potencial do cobre como elemento de rápida acumulação nas brânquias do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* e o decréscimo no conteúdo de glutathione, seguido de recuperação ao longo do tempo de exposição em meio sem o metal (Canesi *et al.* 1999).

Alterações na atividade da fosfatase ácida foram descritas por Rajalakshmi e Mohandas (2005) em bivalve *Lamellidens corrianus* quando expostos a altas concentrações de cobre, com resposta maior em brânquias quando comparada ao hepatopâncreas. Peixes da espécie *Esomus danricus*, demonstraram alterações comportamentais como perda no equilíbrio, natação errática e agrupamento dos indivíduos. Além disso, foi constatada a inibição das enzimas da defesa antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase (Vutukuru *et al.* 2006).

Por outro lado, a assimilação do chumbo nos ecossistemas aquáticos é determinada pela sua biodisponibilidade, que em geral, é mais reduzida quando em presença de matéria orgânica ou partículas minerais. Vários organismos aquáticos apresentam a capacidade de assimilar e acumular altas concentrações de chumbo (Li *et al.* 2009).

O cádmio é encontrado em pequenas quantidades na natureza e interfere diretamente no sistema de defesa antioxidante dos bivalves marinhos, como demonstrado por Company *et al.* (2009) em *Bathymodiolus azoricus*. Os autores observaram elevação na atividade das enzimas SOD e CAT em brânquias de indivíduos coletados em fontes hidrotermais. Quando comparado aos ensaios realizados em manto do animal, os autores concluíram que as brânquias são os órgãos mais afetados devido ao contato direto com o meio externo. O metal apresenta capacidade de bioacumulação em diferentes níveis tróficos.

Estudo com o peixe *Sparus aurata* demonstrou que a acumulação do metal nos tecidos é proporcional à concentração e tempo de exposição, o que resulta na elevação de metalotioneínas e da atividade da glutiona-s-transferases (Bouraoui *et al.* 2008).

A acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) desempenha papel essencial no mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise do substrato acetilcolina (ACh) em ácido acético e colina (Marcel *et al.* 1998). A AChE é importante enzima regulatória na transmissão de impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas (Milatovic e Dettbarn 1996, Muller *et al.* 2002). A inibição da enzima resulta no acúmulo de acetilcolina, que provoca estimulação descontrolada do sistema nervoso e pode levar o indivíduo a morte (Varó *et al.* 2008).

A butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8), anteriormente chamada de colinesterase do soro, pseudocolinesterase e colinesterase não específica, hidrolisam vários ésteres de colina, entre eles a acetilcolina e heptanoilcolina, porém mais eficiente na hidrólise da butirilcolina. A função da BChE no organismo e o seu substrato natural permanecem desconhecidos, apesar de existirem hipóteses que relacionam a BChE à proteção da AChE (Whittaker e Britten 1986) e ao metabolismo de lípidos (Kutty 1980). A BChE e AChE apresentam 53% de homologia na sequência de aminoácidos, principalmente, na região do sítio ativo. As duas enzimas apresentam respostas similares a diversos inibidores (Lockridge *et al.* 1987, Schumacher *et al.* 1997).

As fosfatases catalisam a hidrólise de uma grande variedade de ésteres de ortofosfatos e reações de transfosforilações. Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido encontradas em animais, vegetais e em microrganismos. As fosfatases são classificadas em: fosfatases alcalinas (EC 3.1.3.1), fosfatases ácidas (EC 3.1.3.2) e proteínas fosfatases (Aoyama 2003). A principal diferença está relacionada ao pH de catálise.

A ALP pertence a um grupo de enzimas inespecíficas, que catalisam a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino. Estudos sugerem estar a enzima associada ao transporte lipídico no intestino e aos processos de calcificação óssea (Alves e Arruti, 2009). A ALP se apresenta na forma tetramérica, quando na superfície externa da célula, e dimérica quando liberada por ação das fosfolipases C e D (Vieira 1999).

A ACP designa um grupo heterogêneo não-específico de fosfatases que exibem pH ótimo entre 4,5 e 7, e catalisam a hidrólise de monoéster ortofosfórico liberando álcool e um grupo fosfato (Alves e Arruti 2009)

Os estudos sobre contaminação por elementos traço têm utilizado várias espécies e, os organismos marinhos por sua vez, são os mais estudados devido às respostas induzidas pelos poluentes (Regoli *et al.* 1998, Cajaraville *et al.* 2000). *Holothuria grisea* (pepino do mar) ingere todo o tipo de sedimento marinho para fazer uso da matéria orgânica nele adsorvida. Desta forma, a quantificação de elementos traço nesse organismo pode ser um indicativo da presença de contaminantes neste ambiente (Anadraj *et al.* 2002).

O constante monitoramento dos ecossistemas naturais permite a detecção de alterações no ambiente, atitude essencial para ações corretivas e educativas (Krüger 2001). O acompanhamento da saúde de um ambiente passa pela utilização de biomarcadores bioquímicos ou celulares, capazes de indicar a presença de contaminantes nesse meio, nos fluidos corporais, nas células ou tecidos (Livingstone 1993).

O objetivo do estudo é avaliar respostas metabólicas das enzimas

acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, fosfatase alcalina e fosfatase ácida em tecidos de *H. grisea*, expostos aos elementos traço, como fonte de informação para monitoramento em ambientes marinhos.

Métodos

Bioensaio

Indivíduos de *Holothuria grisea*, com aproximadamente 15 cm, foram coletados na Praia de Santa Cruz, município de Aracruz, ES, área utilizada como referência por apresentar a baixa atividade urbana, industrial e agropecuária. Os espécimes foram transportados para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental e Genotoxicidade, Universidade Vila Velha (UVV) e transferidos para aquários, com aeração constante.

Após período de aclimação, grupos com três indivíduos foram acondicionadas, aleatoriamente, em dez aquários, com capacidade de 5 litros. No aquário controle, eles foram expostos somente a água do mar. Nos outros, os espécimes foram expostos às seguintes concentrações de metais: primeiro grupo: 0,05; 0,075 e 0,1 mg/L de Cu^{2+} ; segundo grupo: 0,05; 0,1 e 0,2 mg/L de Pb^{2+} ; terceiro grupo: 0,3; 0,4, e 0,5 mg/L de Cd^{2+} . Durante o período do bioensaio em processo semi-estático, a temperatura do ambiente foi mantida em $23,0 \pm 1,5^\circ \text{C}$, com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h escuro.

Para as trocas diárias, água foi coletada na Praia da Costa, Vila Velha, ES e as determinações das características físico-químicas foram acompanhadas por meio de aparelho Multiparâmetro Yellow Springs, YSI-85. O pH foi aferido em peagâmetro digital portátil Quimis Q-400he e a transparência da água foi avaliada com uso de disco de Sechi.

Após 96 h, os organismos foram anestesiados em solução 0,01% de benzocaína e sacrificados para a retirada do órgão arborescente, dos músculos longitudinais, do intestino e das gônadas. Os tecidos foram homogeneizados em solução tampão (1:5 p/v), de acordo com os ensaios enzimáticos a serem desenvolvidos e centrifugados em centrífuga refrigerada Sorvall Biofuge Stratos. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima. Todas as determinações enzimáticas foram realizadas em triplicatas à 25°C . As atividades foram acompanhadas em aparelho Espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham, Biosciences).

Determinação da acetilcolinesterase

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, e centrifugados a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C . A atividade da AChE foi determinada segundo método de Guilhermino *et al.* (2006). O meio de reação (1 mL) continha 100 mM tampão fosfato de potássio, pH 7,5; acetiltiocholina 0,4 mM e 5,5-dithiobis (2-nitrobenzóico acid) 0,27 mM, à 25°C . A reação foi acompanhada a 412 nm. Uma unidade de enzima foi definida como quantidade capaz de transformar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por miligrama de proteína.

Determinação da butirilcolinesterase

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, e centrifugados a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C . A atividade da BChE foi determinada segundo adaptações de Guilhermino *et al.* (2006). O ensaio enzimático foi desenvolvido em meio (1 mL) contendo 100 mM tampão fosfato de potássio, pH 7,5; butiriltiocholina 0,4 mM e 5,5-dithiobis (2-nitrobenzóico acid) 0,27 mM, à 25°C . A reação foi acompanhada a 412 nm. Uma unidade de enzima foi definida como quantidade capaz de transformar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por miligrama de proteína.

Determinação da fosfatase alcalina

Os tecidos foram homogeneizados em 50 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,8, contendo ethylenediaminetetraacetic - EDTA 1 mM, e centrifugados a 15.000 x g, durante 15 minutos a 4°C . A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método descrito por Barred (1972) e modificado para utilização de p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como substrato (Reichardt, Overbeck e Steubing, 1967; Jamet, Aleya e Devaux, 1995). O meio de reação (1 mL) continha 20mM tampão bicarbonato-ácido carbônico, pH 9,2; MgCl_2 100 mM e p-NP100mM. As amostras foram incubadas durante 10 minutos à 25°C e a reação interrompida pela adição de 1mL de NaOH 1M, seguida de centrifugação a 3000 x g. A formação de p-nitrofenol foi acompanhada a 405nm. Uma unidade de enzima foi definida como quantidade capaz de transformar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por miligrama de proteína.

Determinação da fosfatase ácida

Os tecidos foram homogeneizados em 20 mM tampão de acetato de sódio, pH 5,0, contendo 1mM PMSF em relação 1:10 (p/v) e centrifugados a 15000 x g durante 15 minutos, a 4°C . A atividade da AcP foi determinada segundo método descrito por Barred (1972) e modificado para utilização de p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como substrato (Reichardt *et al.* 1967, Jamet *et al.* 1995). O meio de reação (1 mL), continha 20mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0; pNPP 2 mM e MgCl_2 2 mM. As amostras foram incubadas durante 10 minutos à 25°C e a reação interrompida pela adição de 1mL de NaOH 1M, seguida de centrifugação a 3000 x g. A formação de p-nitrofenol foi acompanhada a 405nm. Uma unidade de enzima foi definida como quantidade capaz de transformar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por miligrama de proteína.

Proteínas totais

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

Análise estatística

A normalidade foi verificada pelo teste K^2 , baseado nos momentos de curtose e simetria (Zar 1999). Atendendo a premissa da normalidade,

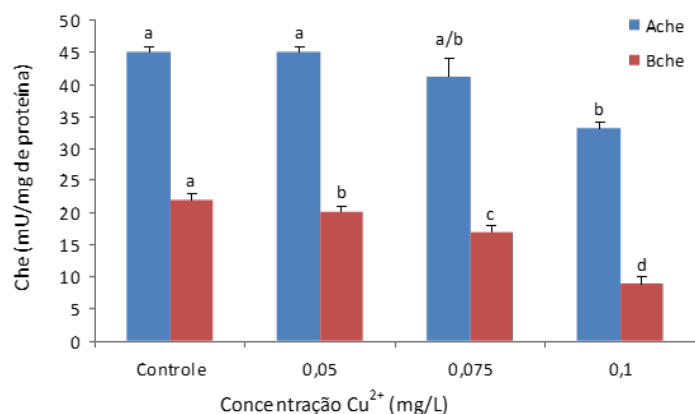


Figura 1 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE) em músculo longitudinal de *Holothuria grisea*, após 96 h de exposição ao cobre (Cu²⁺). A atividade enzimática foi expressa em mU/mg de proteína. Os valores representam a média de três indivíduos. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

as atividades das enzimas dos organismos expostos aos metais foram analisadas pela regressão linear simples. A atividade enzimática foi utilizada como variável dependente e a concentração dos metais como variável independente. Diferenças entre os tratamentos foram analisados pelo one-way ANOVA ($p \leq 0,05$), e *a posteriori*, o teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas no programa Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

Resultados

Durante as 96 h de exposição aos metais não foram observados evisceração da *H. grisea* e o comportamento do equinodermo, durante o período experimental, não apresentou qualquer diferença daquele do ambiente natural. As características físico-químicas da coluna d'água, coletada para as trocas diárias, não apresentaram alterações, assim como a água utilizada nos bioensaios, conforme observado na Tabela 1. A transparência da água, *in situ*, apresentou diferenças no primeiro e quarto dias de coleta.

Acetil e butirilcolinesterase

O tecido muscular, utilizado como controle, apresentou

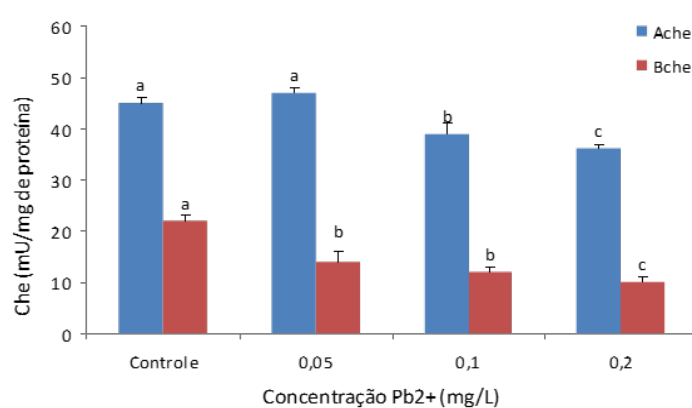


Figura 2 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE) em músculo longitudinal de *Holothuria grisea*, após 96 h de exposição ao chumbo (Pb²⁺). A atividade enzimática foi expressa em mU/mg de proteína. Os valores representam a média de três indivíduos. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

atividade significativa de AChE, com valor de 45 mU/mg proteína. Entretanto, somente os indivíduos expostos a concentração de 0,10 mg/L de cobre apresentaram percentual de inibição de 26,27% ($p \leq 0,05$), quando comparada ao controle. Os ensaios em presença de 0,05 e 0,075 mg/L do metal inibiram, de forma significativa, a acetilcolinesterase. Por sua vez, a butirilticolinesterase apresentou valores menores de atividade quando comparada à acetilticolinesterase. Os valores de percentuais de inibição foram: 0,05 mg/L cobre, 9,1%; 0,075 e 1,0 mg/L cobre, 22,73 % e 59,0%, respectivamente, como pode ser observado na Figura 1.

Por outro lado, o chumbo foi mais inibidor quando em concentração de 0,20 mg/L. A atividade da acetilcolinesterase foi reduzida em 21,74%, quando relacionada ao controle, enquanto que em 0,10 mg/L do metal, o percentual de inibição foi somente 15,22%, porém ainda significativo ($p \leq 0,05$). A resposta da butirilcolinesterase em ensaio com 0,05 mg/L chumbo foi representativa, com valor de 36,37% em relação ao controle. Exposição às concentrações 0,01 e 0,20 mg/L do metal, também promoveram redução na atividade enzimática, com valores de 45,46% e 54,55%, respectivamente, conforme Figura 2.

O cádmio demonstrou potencial inibitório mais expressivo em tecido muscular. Em concentrações 0,30 mg/L; 0,40 mg/mL e 0,5 mg/mL do metal, a acetilcolinesterase foi inibida 19,57%; 26,09% e

Tabela 1 Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis físico-químicas da coluna d'água coletada para o bioensaio com *Holothuria grisea*.

Dias	pH	CE ¹ (μ S/cm)	OD ² (mg/L)	Salinidade (ppt)	Temperatura (°C)	Transparência (cm)
1	8,19 \pm 0,08	54,6 \pm 0,15	7,50 \pm 0,31	38,9 \pm 0,06	21,8 \pm 0,15	29,0 \pm 3,0
2	8,28 \pm 0,04	56,5 \pm 0,26	6,44 \pm 0,15	38,9 \pm 0,12	23,4 \pm 0,20	90,0 \pm 2,0
3	8,24 \pm 0,02	56,6 \pm 0,06	6,30 \pm 0,13	39,2 \pm 0,06	23,20 \pm 0,10	102,7 \pm 2,1
4	8,38 \pm 0,07	58,8 \pm 0,74	7,07 \pm 0,23	39,3 \pm 0,15	23,20 \pm 0,10	64,0 \pm 1,0

1. Condutividade Elétrica; 2. Oxigênio Dissolvido; Dia 1 - Coleta na Praia de Santa Cruz. Dias 2, 3 e 4 - Coleta na Praia da Costa.

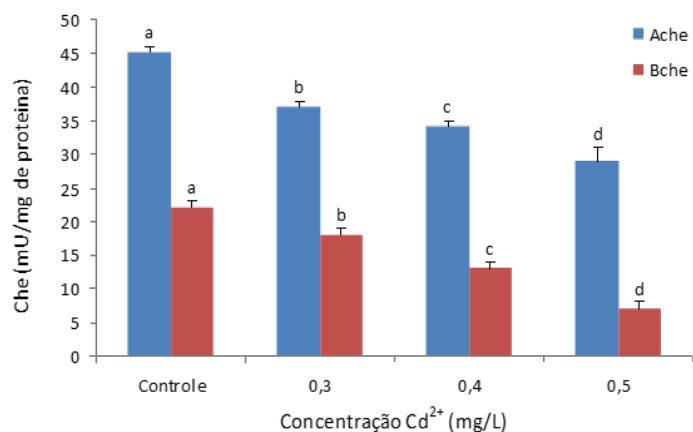


Figura 3 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE) em músculo longitudinal de *Holothuria grisea*, após 96 h de exposição ao cobre (Cd²⁺). A atividade enzimática foi expressa em mU/mg de proteína. Os valores representam a média de três indivíduos. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

36,96%, respectivamente. A butirilcolinesterase, no mesmo tecido, foi inibida em 68,19% quando em concentração de 0,5 mg/L. Esse valor foi superior quando comparado às concentrações menores: 0,40 mg/L (40,91%) e 0,30mg/L (18,19%), conforme Figura 3.

Fosfatase alcalina

Dos tecidos estudados, somente o intestino apresentou atividade fosfatásica, com valor de 873 mU/mg proteína no tecido controle. Quando exposta à concentração 0,05 mg/L de cobre, a inibição foi 19,5%, resultado não significativo quando comparado à exposição de 0,75 mg/L, porém ambas significativas quando relacionados ao controle. Como pode ser observado na Figura 4, concentração de 0,10 mg/L do metal inibiu 50,5% da atividade, valor bem superior quando comparados aos resultados anteriores.

O chumbo foi o metal que promoveu maior percentual inibitório em todas as concentrações. Como demonstrado na Figura 5, a inibição nos organismos expostos 0,05 mg/L do metal, foi 39,0% quando comparadas ao controle. A exposição a 0,1 mg/L resultou em inibição

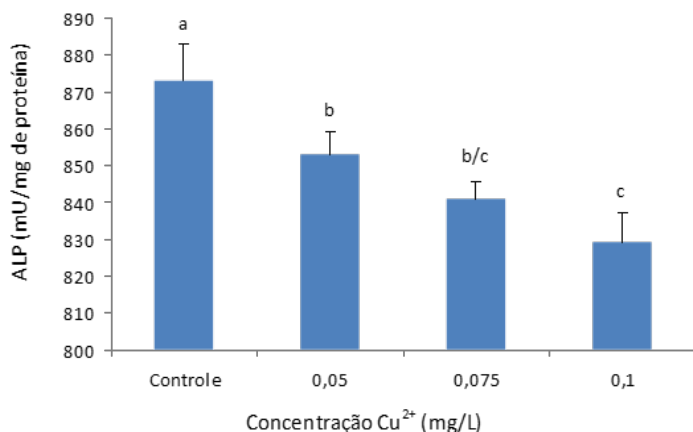


Figura 4 Atividade da Fosfatase alcalina (ALP) em intestino de *Holothuria grisea*, após 96 h de exposição ao cobre (Cu²⁺). A atividade enzimática foi expressa em mU/mg de proteína. Os valores representam a média de três indivíduos. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

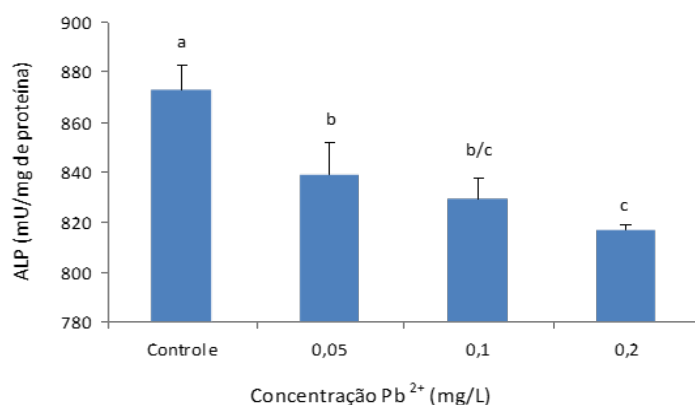


Figura 5 Atividade da Fosfatase alcalina (ALP) em intestino de *Holothuria grisea*, expostas ao chumbo (Pb²⁺), durante 96h. O controle foi desenvolvido sem o metal. A atividade enzimática foi expressa em mU/mg de proteína. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples. Os valores representam a média de três indivíduos (n=3), com 03 determinações enzimáticas por equinoderma.

de 50,5%. Entretanto, o maior percentual foi observado em presença de 0,2 mg/L de chumbo, com 64,47% de inibição.

Em relação ao cádmio, a inibição mais expressiva foi detectada em concentração de 0,5 mg/L, com valor de 61,9%, quando relacionado ao controle. Os percentuais de inibição foram proporcionais se for considerado a concentração 0,3 mg/L e 0,5 mg/L do metal. Quando analisados os resultados é possível constatar certa proporcionalidade entre eles. O metal, em qualquer das concentrações utilizadas, é responsável pela inibição da atividade da fosfatase alcalina de intestino de *H. grisea*, como demonstrado na Figura 6.

Fosfatase ácida

O órgão arborescente foi o único a apresentar atividade para a fosfatase ácida. Dos traços de metais estudados, o chumbo foi responsável pelo maior percentual inibitório, com valor 27,0% em concentração 0,10 mg/L. Como pode ser observado na Figura 7, a inibição promovida pelas concentrações 0,05 mg/L e 0,075mg/L do metal, não apresentou diferenças significativas quando relacionadas ao controle ($p \geq 0,05$).

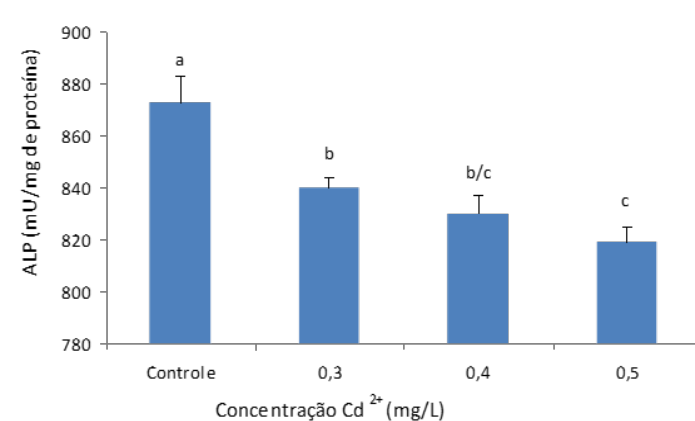


Figura 6 Atividade da Fosfatase alcalina (ALP) em intestino de *Holothuria grisea*, após 96 h de exposição ao cobre (Cd²⁺). A atividade enzimática foi expressa em mU/mg de proteína. Os valores representam a média de três indivíduos. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

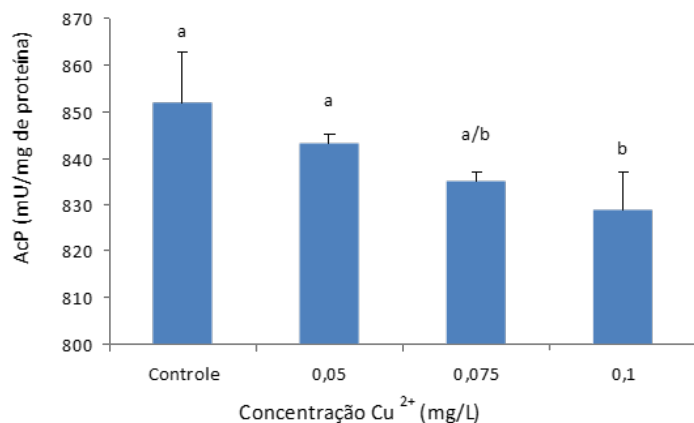


Figura 7 Atividade da Fosfatase ácida (AcP) em órgão arborescente de *Holothuria grisea*, após 96 h de exposição ao cobre (Cu²⁺). A atividade enzimática foi expressa em mU/mg de proteína. Os valores representam a média de três indivíduos. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

O chumbo, por sua vez, resultou em inibições significativas em ensaios com 0,05 mg/L, 0,010 mg/L e 0,20 mg/L, quando comparadas ao controle, com valores de 23,5%; 43,5% e 57,6%, respectivamente. Entretanto, as atividades específicas em indivíduos expostos à 0,10 mg/L e 0,20 mg/L não apresentaram diferenças significativa entre si, somente quando relacionadas ao controle (Figura 8).

Por outro lado, o cádmio foi responsável pelos menores percentuais de inibição da AcP em órgão arborescente. As atividades enzimáticas no controle e aos expostos ao cádmio 0,3 mg/L, não apresentaram diferenças significativas, ao contrário do observado em relação à exposição as concentrações 0,4 mg/L e 0,5 mg/L (24,7% e 28,2%), respectivamente, como pode ser observado na Figura 9.

Discussão

Os estudos desenvolvidos com a exposição de *H. grisea* aos metais traços levaram em consideração a quantidade de sedimentos

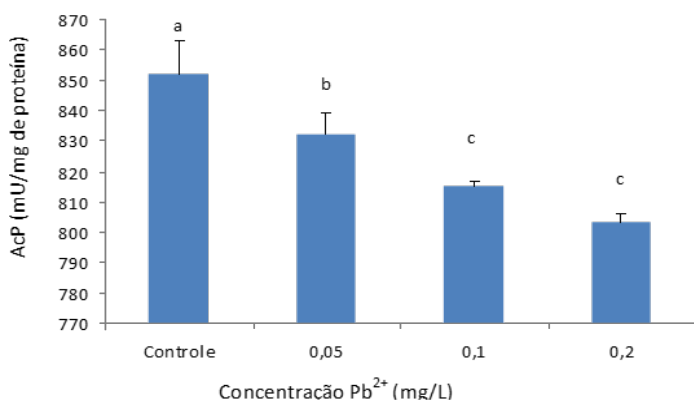


Figura 8 Atividade da Fosfatase ácida (AcP) em órgão arborescente de *Holothuria grisea*, após 96 h de exposição ao chumbo (Pb²⁺). A atividade enzimática foi expressa em mU/mg de proteína. Os valores representam a média de três indivíduos. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

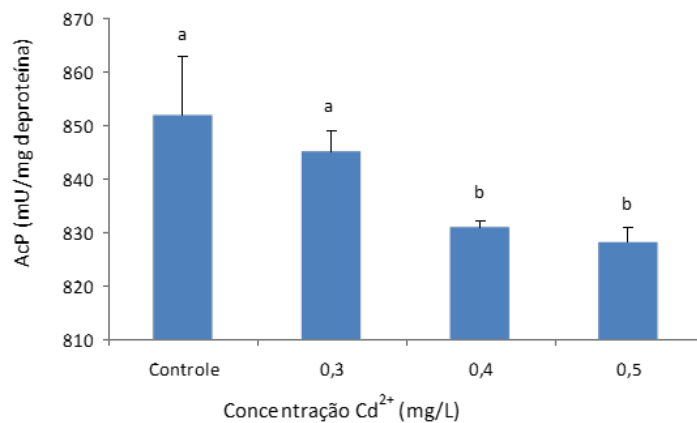


Figura 9 Atividade da Fosfatase ácida (AcP) em órgão arborescente de *Holothuria grisea*, após 96 h de exposição ao cádmio (Cd²⁺). A atividade enzimática foi expressa em mU/mg de proteína. Os valores representam a média de três indivíduos. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

presente no intestino e a biodisponibilidade do metal na caracterização de inibição enzimática. Desta forma, foi realizado a priori, um estudo piloto para caracterizar a LD₅₀ dos metais. Nesta etapa foi considerada a concentração dos metais, a evisceração ou não do equinodermo, o potencial contrátil muscular e a integridade da epiderme.

A manutenção da temperatura ambiente, oxigenação e fotoperíodo foram etapas importantes, com valores o mais próximo possível daqueles observados no ambiente natural. Isso pode ser comprovado pelas determinações realizadas *in situ*, (Tabela 1), muito próximo aos constatados em laboratório (pH= 8,20; CE= 56,5; OD= 7,4 mg/L; Salinidade= 38,5 ppt; T= 25°C). Esta proximidade de valores descarta a possibilidade de alterações enzimáticas promovidas pelo estresse gerado pelo calor ou por alterações na oxigenação dos indivíduos. Outra característica do bem estar animal foi a resposta contrátil, comum da espécie.

A exposição de *H. grisea* aos metais traços resultou em alterações nas enzimas relacionadas à transmissão de impulsos nervosos, à fosfatase ácida e à fosfatase alcalina. Resultados semelhantes foram observados em bivalves marinhos, segundo Gu Jing *et al.* (2006). Além disso, estudos sobre bioacumulação de metais pesados em invertebrados foram relatados por Martín-Díaz *et al.* (2005); Firat *et al.* (2008) e Templemen e Kingsford, (2010), também em órgãos arborescente e músculo longitudinal, de Holothuroidea (Anandraj *et al.* 2002). Entretanto, não existem na literatura estudos sobre atividade enzimática em *H. grisea* expostas aos metais, e o que se observa são estudos da concentração de metais neste organismo.

Acetilcolinesterase

A inibição da AChE no tecido muscular de *H. grisea*, pode estar relacionado a facilidade de absorção desse metal e sua acumulação no tecido, como descrito por Jing *et al.* (2006).

Segundo Jemec *et al.* (2007) alterações na atividade da AChE, quando exposta a concentrações de cobre, está relacionada a capacidade do metal em substituir o cofator da enzima, resultando na incapacidade de sua interação com o substrato, resultando

em inibição significativa. Por outro lado, a redução da atividade enzimática, quando exposta ao chumbo, pode estar associada a capacidade do metal em interagir facilmente com grupamentos sulfidrila da cadeia polipeptídica da proteína (Jemec *et al.* 2007), o que leva a enzima a perder sua conformação tridimensional, resultando na redução da sua capacidade catalítica.

Vários estudos demonstram a inibição da acetilcolinesterase tanto em invertebrados (Regoli *et al.* 1998, Company *et al.* 2004), como em vertebrados (Bainy *et al.* 1996, Vutukuru *et al.* 2006). A inibição promovida pelo cádmio sobre a AChE de músculo longitudinal pode estar associada à interação do metal com o sítio aniônico da enzima, como descrito por Company *et al.* (2006). O metal interfere na degradação da acetilcolina, importante neurotransmissor, o que resulta no acúmulo do substrato nas sinapses. Esse evento provoca alterações motoras que podem culminar na morte do indivíduo (Vutukuru *et al.* 2006).

O cádmio, comparado aos outros metais utilizados, foi o que provocou maior inibição. Estudos com outros invertebrados marinhos também resultaram em inibição da AChE pelo metal (Company *et al.* 2004, Company *et al.* 2006). Uma possibilidade para a inibição da atividade da AChE, observada em *H. grisea*, é a redução no processo de transcrição do RNA, como comprovado por Woo *et al.* (2009). Os autores estudaram o efeito da concentração de 1000 ppb de Cd em peixes e o resultado foi 50% de redução na expressão gênica no tecido hepático.

Butirilcolinesterase

Em termos gerais, um conjunto de fatores pode contribuir para as diferenças nas respostas enzimáticas observada quando os organismos são expostos aos agentes contaminantes, como proposto por Vieira *et al.* (2009). Entre estes fatores estão: a espécie estudada, as propriedades da enzima isolada de cada tecido, as condições experimentais, o tempo e a intensidade de exposição, a estrutura química dos compostos, concentração dos poluentes, dentre outros. Segundo Jing *et al.* (2006), cada espécie apresenta uma resposta enzimática característica, quando se considera todas essas variáveis.

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram conformidade com vários autores que relatam, *in vitro*, a redução na atividade da BChE em invertebrados marinhos quando expostos a metais pesados, como por exemplo, os bivalves da espécie *Adamussium colbecki* expostos ao cobre e mercúrio (Regoli *et al.* 1998).

A inibição causada pelo cobre, em músculo longitudinal de *H. grisea*, pode ser causada pela ligação do metal ao sítio catalítico da enzima, considerando a capacidade da molécula em se ligar aos metais (Regoli *et al.* 1998). Efeitos semelhantes foram relatados em oligoquetas da espécie *Tubifex tubifex* (Mosleh *et al.* 2006).

A redução na atividade específica da BChE pelo chumbo, pode estar relacionada a inibição observada pelo cobre. Além disso, o chumbo apresenta capacidade de interagir facilmente com grupamentos sulfidrila da cadeia polipeptídica formadores da proteína, o que causa a perda de estruturas responsável pela função

biológica da enzima e, conseqüentemente, redução em sua atividade catalítica (Company *et al.* 2006).

O cádmio induziu alterações significativas na atividade específica da BChE em *H. grisea*, considerando a resposta de 68,19% de inibição no músculo longitudinal. Esta inibição também pode estar relacionada aos transtornos resultantes da acumulação do metal no tecido e a desestruturação da enzima, o que a impede de se ligar ao substrato e realizar a catalise (Company *et al.* 2006).

Fosfatase alcalina

A inibição da atividade enzimática de organismos expostos às diferentes concentrações de metais pesados, como ocorreu em *H. grisea*, também é relatada em outros organismos aquáticos. Segundo Company *et al.* (2006) ocorreram inibições de fosfatase alcalina e outras enzimas isoladas de *Bathymodilus azoricus* quando expostas ao cádmio, cobre e mercúrio.

Apesar das diferentes respostas da enzima aos efeitos de contaminantes, os resultados em *H. grisea* são corroborados com os observados em outros estudos, uma vez que, grande número de invertebrados expostos aos metais pesados apresentou redução significativa na atividade da enzima (Chandran *et al.* 2005, Company *et al.* 2006, Vutukuru *et al.* 2006, Jing *et al.* 2006).

Além disso, as respostas enzimáticas podem estar associadas a bioacumulação dos metais pesados que pode variar em cada tipo de tecido ou ainda, em cada organismo indicador, como avaliado no trabalho de Firat *et al.* (2008). Essa variação também pode ocorrer em *H. grisea*, uma vez que concentrações de cobre e zinco foram detectadas em órgão arborescente e músculo longitudinal de *Holothuria leucospilota*, em estudos desenvolvidos por Anadraj *et al.* (2002).

No presente estudo, as concentrações de cobre utilizadas provocaram reduções significantes na atividade da enzima após 96 horas de exposição. Os resultados permitem supor, que o maior percentual inibitório observado no intestino esteja relacionado às suas características de absorção, considerando a concentração constante do metal ao longo do tempo do bioensaio, assim como a excreção dos sedimentos contidos no intestino, o que expõe o órgão à sua maior capacidade de absorção. Esta suposição está embasada nos dados de bioacumulação de cobre em tecido visceral de *Holothuria mexicana*, no qual a concentração do cobre foi superior aos outros metais estudados. (Laboy-Nieves e Conde 2001).

Os resultados observados, no presente trabalho, comprovam a redução da atividade específica da ALP no intestino, o que permite supor que a concentração do chumbo, cádmio e cobre foi responsável pela inibição desta enzima. Esse resultado é coerente com os descritos por Berrahal *et al.* (2007) ao estudarem o efeito do cobre em atividades enzimáticas de vertebrados expostos a diversos traços de metais pesados.

Fosfatase ácida

No presente estudo, as concentrações de cobre, chumbo e cádmio provocaram reduções significativas na atividade da enzima.

Os resultados permitem supor, que o maior percentual inibitório de determinado metal esteja relacionado às suas características de absorção. Esta inibição está relacionada à constante exposição do órgão arborescente ao metal, devido seu contrato direto para as trocas gasosas. Esta suposição é confirmada pelos dados de bioacumulação de cobre em tecido respiratório de *H. mexicana* descrito por Laboy-Nieves e Conde (2001).

Estudos desenvolvidos em *Mytilus galloprovincialis* expostos a metais demonstraram inibição da atividade da AcP, em todos os tecidos isolados, resposta semelhante ao descrito para outros invertebrados marinhos expostos a concentrações de traços de metais pesados (Bocchetti *et al.* 2008).

Respostas significativas foram observadas no presente estudo, o que sugere interferência dos metais na estrutura da enzima de forma a alterar sua atividade específica. Considerando a afinidade de metais pelas cadeias laterais de alguns aminoácidos é possível supor uma associação que promove a redução na atividade específica (Company *et al.* 2006).

De forma geral, os espécimes de *H. grisea* apresentaram boa resistência quando expostas às concentrações traços dos metais e o cádmio foi responsável pelo maior percentual de inibição, tanto da AChE como da BChE isolada de músculo longitudinal. Valores menores de inibição enzimática foram observados em indivíduos expostos ao chumbo. Em relação ao chumbo, o maior poder inibitório foi observado na Fosfatase acida de órgão arborescente e na fosfatase alcalina de intestino. A sensibilidade das fosfatases foi menor nos organismos expostos ao cobre. Com estes resultados é possível afirmar que o equinodermo *H. grisea* pode ser utilizado como bioindicador de ambientes poluídos com cobre, chumbo e cádmio, em programas de monitoramento ambiental, uma vez que apresentaram grande sensibilidade quando expostas aos metais.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro da UVV, FAPES e FUNADESP, e à FUNADESP pela bolsa de produtividade em pesquisa de Zima Maria A Cruz.

Referências

Alves C, Arruti R (2009) Hiperfosfatemia transitória benigna da infância. *Acta Ortopédica* 17: 23-34.

Anandraj A, Maeshall DJ, Gregory MA, McClurg, TP (2002) Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (mollusca: bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. *Comparative Biochemistry Physiology* 132: 355-362.

Aoyama H, Silva, TMA, Miranda MA, Ferreira CV (2003) Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova* 26: 896-900.

Bainy ACD, Saito E, Carvalho PSM, Junqueira VBC (1996) Cholinesterase activity in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* 34: 151-162.

Barred AJ (1972) Lysosomal enzymes. In: Dingle JT (ed) *Lysosomoes: a laboratory handbook*. North-Holland, Amsterdam, pp. 46-135.

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

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

Bourauoi Z, Banni M, Ghedira J, Clerandau C, Guerbej H, Narbonne JF, Boussetta H (2008) Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation of sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiology Biochemistry* 34: 201-207.

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

Canesi L, Viarengo A, Leonzio C, Filipelli M, Gallo G (1999) Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology* 46: 67-76.

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

Company R, Serafim A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B, Fiala-Médioni A (2004) Effect of cadmium, copper and Mercury on cholinesterase activities in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Environmental Research* 58: 377-381.

Company R, Serafim A, Cosson R, Camus L, Shillito B, Fiala-Médioni A, Bebianno MJ (2006) The effect of cadmium on phosphatase and cholinesterase and the susceptibility in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Biology* 148: 817-825.

Company R, Serafim A, Cosson R, Camus L, Shillito B, Fiala-Médioni A, Bebianno MJ (2009) The effect of cadmium on antioxidant responses and the susceptibility to oxidative stress in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Biology* 148: 817-825.

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

Gu Jing LY, Xie L, Zhang R (2006) Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry Physiology* 144: 184-190.

Guilhermino L, Lopes MC, Carvalho AP, Soares AMVM (2006) Inhibition of cholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* 32: 727-738.

Jamet D, Aleya L, Devaux J (1995) Diel changes in the alkaline phosphatase activity of bacteria in a phytoplankton in the hypereutrophic Villerest Reservoir. *Hydrobiologia* 301: 49-56.

Jemec A, Drobne D, Tisler T, Trebse P, Ros M, Sepcic K (2007) The applicability of acetylcholinesterase and glutathioneS-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology* 144: 303-309.

Jing G, Li Y, Xie L, Zhang R (2006) Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 144:184-190.

Krüger LE (2001) Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. *Desenvolvimento e Meio Ambiente* 4: 37-43.

Kutty KM (1980) Biological function of cholinesterase. *Clinic Biochemistry* 193: 265-75.

Laboy-Nieves EN, Conde JE (2001) Metal levels in eviscerated tissue of shallow-water deposit-feeding holothurians. *Hydrobiologia* 459: 19-26.

- Li M, Liu Z, Xu Y, Cui Y, Li D, Kong Z (2009) Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Anelida, Oligochaeta). **Chemosphere** 74:621-625.
- Livingstone DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology** 57: 195-211.
- Lockridge O, Bartels CF, Vangham TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL (1987) Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. **Journal Biology Chemistry** 262: 549-557.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Martín-Díaz ML, Blasco J, Canales MG, Sales D, DelValls TA (2005) Bioaccumulation and Toxicity of Dissolved Heavy Metals from the Guadalquivir Estuary After the Aznalcólar Mining Spill Using *Ruditapes philippinarum*. **Archives Environmental Contamination Toxicology** 48: 233-241.
- Milatovic D, Dettbarn WD (1996) Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic subcutaneous paraoxon application in rat. **Toxicology and Applied Pharmacology** 136:20-28.
- Mosleh YY, Paris-Palacio S, Biagianni-Risbourg S (2006) Metallothioneins induction and enzymatic activity response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. **Chemosphere** 64: 121-128.
- Muller TC (2002) Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochimica et Biophysica Acta** 1587:92-98.
- Marcel V, Palacios LG, Pertuy C, Masson P, Fournier D (1998) Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. **Biochemistry Journal** 329: 329-334.
- Napierska D, Barsiene J, Mulkiewicz E, Podolska M, Rybakovas A (2009) Biomarker responses in flounder *Platichthys flesus* from the Polish coastal area of the Baltic Sea and applications in biomonitoring. **Ecotoxicology** 18: 846-859.
- Pedrozo MFM (2003) Cobre. In: Azevedo AA, Chasin AAM (ed) **Metais – Gerenciamento da Toxicidade**. São Paulo, Atheneu-Intertox, pp 143-185.
- Quintaneiro C, Monteiro M, Pastorinho R, Soares AMVM, Nogueira AJA, Morgado F, Guilhermino L (2006) Environmental pollution and natural populations: A biomarkers case study from the Iberian Atlantic coast. **Marine Pollution Bulletin** 52: 1406-1413.
- Rajalakshmi S, Mohandas A (2005) Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 62: 140-143.
- Regoli F, Nigro M, Orlando E (1998) Lysosomal and antioxidant responses to metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquatic Toxicology** 40:357-392.
- Reichardt WJ, Overbeck J, Steubing L (1967) Free dissolved enzymes in lake waters. **Nature** 216: 1345-1347.
- Scremin OU, Li MG, Scremin AM, Jenden DJ (1997) Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex. **Brain Research Bulletin** 42: 59-70.
- Templemen MA, Kingsford MJ (2010) Trace element accumulation in *Cassiopea* sp. (Scyphozoa) from urban marine environments in Australia. **Marine Environmental Research** 69: 63-72.
- Varó I, Amat F, Navarro JC (2008) Acute toxicology of dichlorvos to *Aphamnicis iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterases effects on this species. **Aquatic Toxicology** 88: 53-61.
- Vieira JGH (1999) Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia** 43: 415-422.
- Vieira LR, Gravato C, Soares AMVM, Morgado F, Guilhermino L (2009) Acute effects of copper and cadmium on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior. **Chemosphere** 76: 1416-1427.
- Viselina TN, Luk'yanova ON (2000) Cadmium-induced changes in the activity of Carbohydrate Metabolism Enzymes in Mollusks. **Russian Journal of Marine Biology** 26: 289-291.
- Vutukuru SS, Chintada KRM, Rao JV, Anjaneyulu Y (2006) Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase, cholinesterase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry** 32: 221-229.
- Whittaker M, Britten JJ (1986) E1h, a new allele at cholinesterase locus 1. **Human Heredity** 37: 54-58.
- Woo S, Yum S, Park HS, Lee TK, Ryu JC (2009) Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 149: 289-299.
- Zagatto PA, Bertolotti E (2006) **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**. São Paulo, Rima.
- Zar JH (1999) **Bioestatistical Analyses**. New Jersey, Prentice-Hall Press.