

## Avaliação Toxicológica da Progesterona em biomarcadores de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Charlene Soares Rocha<sup>1</sup>\*, Rafaela Zanella Puchale<sup>2</sup>, Indianara Fernanda Barcarolli<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup> Mestranda em Ciências Ambientais, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brasil

<sup>3</sup> Professora Associada do Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brasil.

Histórico do Artigo: Submetido em: 27/09/2021 – Revisado em: 31/10/2021 – Aceito em: 01/02/2022

### RESUMO

A crescente utilização de fármacos e a escassa legislação sobre os efeitos toxicológicos desses contaminantes emergentes na biota aquática, torna de suma importância estudos voltados à avaliação destes no meio ambiente. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade da progesterona sintética, hormônio muito utilizado principalmente pelas mulheres como método contraceptivo, como um agente tóxico em relação aos biomarcadores nos peixes. Sendo assim, o experimento consistiu primeiramente na aclimatação de espécimens *Oreochromis niloticus* conhecidos popularmente como Tilápia do Nilo. Posteriormente, estes exemplares foram submetidos a concentrações subletais de 200; 400; 600 e 800 µg.L<sup>-1</sup> comparadas com o grupo controle por 96 horas. Após à exposição, foram coletados os tecidos: fígado e brânquias, para análises das atividades enzimáticas da catalase (CAT) e glutatona-S-transferase (GST) e o cérebro para avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Os resultados obtidos no estudo mostraram uma inibição total da atividade enzimática da AChE entre todas as concentrações comparadas com o grupo controle no cérebro dos peixes. Em relação à catalase nota-se uma alteração positiva em ambos os tecidos analisados ocorrendo um aumento principalmente na concentração de 600 µg.L<sup>-1</sup>, e quanto à glutatona-S-transferase não houve grandes alterações em suas atividades. Desta forma, fica evidente que a progesterona sintética foi capaz de alterar o mecanismo de ação das enzimas, principalmente no sistema nervoso dos peixes, influenciando nas alterações comportamentais e fisiológicas da espécie testada.

**Palavras-Chaves:** Contaminantes Emergentes, Peixes, Biomarcadores, Enzimas.

### Toxicological Evaluation of Progesterone in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) biomarkers

### ABSTRACT

The growing use of pharmaceuticals and the scarce legislation on the toxicological effects of these emerging contaminants in aquatic biota, makes studies aimed at their evaluation in the environment of paramount importance. That said, the objective of this job was to evaluate the toxicity of synthetic progesterone, a hormone widely used mainly by women as a contraceptive method, as a toxic agent in relation to biomarkers in fish. Therefore, the experiment consisted primarily of the acclimatization of *Oreochromis niloticus* specimens popularly known as Nile Tilapia. Subsequently, these specimens were subjected to sublethal concentrations of 200; 400; 600 and 800 µg. L<sup>-1</sup> compared to the control group for 96 hours. After exposure, tissues referring to the liver and gills were collected to analyze the enzymatic activities of catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) and the brain tissue to evaluate the activity of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme. The results obtained in the study showed a total inhibition of AChE enzymatic activity among all exposed samples compared to the control group in the fish brain. Regarding catalase, there was a positive change in both tissues analyzed, with an increase mainly in the concentration of 600 µg. L<sup>-1</sup>, and as to glutathione-s-transferase, there were no major changes in its activities. This way, it is evident that synthetic progesterone was able to change the mechanism of action of enzymes, especially in the central nervous system of fish, influencing behavioral and physiological changes in the specie tested.

**Keyword:** Emerging Contaminants, Fish, Biomarkers, Enzymes.

Rocha, Charlene S, Puchale, Rafaela Z., Barcarolli, Indianara F. (2022). Avaliação Toxicológica da Progesterona em biomarcadores de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v.10, n.2, p.26-40.



## 1. Introdução

O crescimento desenfreado da população, bem como as melhorias socioeconômicas favorecem o alto uso de hormônios, como os resíduos medicamentosos, principalmente entre as mulheres. De acordo com Andrade (2013, p.15) “A ausência de uma legislação específica para a poluição hormonal e a falta de orientações quanto ao descarte destes, tem provocado este tipo de poluição ainda pouco conhecida no Brasil”. Essa falta de legislação e informação, conforme relatado por Dutra (2016), tem dificultado a proliferação do conhecimento acerca dos possíveis efeitos e riscos destes contaminantes emergentes para o meio ambiente principalmente os ecossistemas aquáticos.

Segundo Ghiselli (2006), pesquisadores alertam em relação à poluição das águas pelos poluentes emergentes, tais como: os derivados dos fármacos, os hormônios sexuais, os agrotóxicos e os resíduos de produtos industriais. Essas substâncias quando ingeridas em grandes concentrações ou em contato por tempo prolongado (como no caso dos peixes), têm potencial de interferir no funcionamento das glândulas endócrinas. Para Nascimento (2015), os contaminantes emergentes podem ter ocorrência natural ou produzida por microrganismos e, normalmente, não são controlados no ambiente, mas têm potencialidade para adentrar nele e causar efeitos significativos ou não.

Conforme Bila (2005), os hormônios são poderosas moléculas mensageiras que controlam funções essenciais do corpo podendo agir em locais específicos, regulando ou alterando determinados órgãos ou funções. Portanto, a progesterona sintética encontrada em produtos farmacêuticos são esteroides que tiveram moléculas alteradas. De acordo com Raimundo (2011), os principais usos estão relacionados aos contraceptivos, terapias de reposição hormonal e tratamento de neoplasias onde são compostos sintetizados para agirem diretamente no sistema endócrino.

Desta forma, os fármacos como levonorgestrel, o qual é utilizado para métodos contraceptivos hormonais, são avaliados em estudos voltados à toxicologia ambiental. Diante disto, Santos et al. (2016) explicam que o aumento do descarte dos esteroides naturais e dos sintéticos em ambiente aquático e ao fato destes apresentarem atividade mesmo em baixas concentrações, faz-se necessário o estudo desses efeitos na biota aquática.

Portanto, os peixes tornaram-se interessantes modelos biológicos para análises toxicológicas. Em estudos Jesus e Carvalho (2008), explicam que esses organismos constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental por tratar de grupos presentes em vários ambientes e apresentarem ampla distribuição geográfica. Conforme Matthiessen et al. (1993, p.92) “são utilizadas como substitutos para estudos de problemas de saúde humana ou como indicadores de poluição ambiental”. Por conseguinte, são considerados excelentes indicadores ambientais, por serem espécies sensíveis e diretamente afetadas por determinadas contaminações aquáticas.

Posto isso, uma das espécies escolhidas para estudos refere-se à Tilápia do Nilo. Como aponta Ignácio (2018) espécies de *Oreochromis niloticus* são grupos muito utilizados em ensaios de toxicidade por: ocuparem diferentes níveis tróficos, possuem fáceis adaptações as variações de temperatura, oxigênio dissolvido na água e largas escalas de produções no Brasil. Além disso, tem uma capacidade de sobrevivência nos mais diversos tipos de ambientes e geram dados mais precisos quanto as contaminações.

Para avaliar possíveis impactos na fisiologia desses organismos são considerados os biomarcadores bioquímicos nos estudos ambientais, como a enzima glutationa-S-transferase (GST), considerada uma enzima de biotransformação que auxilia em mecanismos de resposta aos danos causados pelos compostos químicos, atuando na conversão e eliminação dos xenobióticos e na defesa celular contra estresse oxidativo. A enzima catalase (CAT) é importante para atividades de tecidos, como rins e fígado. Sendo ela, a responsável por proteger à célula contra oxidação proveniente da formação de produtos de reações secundárias do oxigênio.

E pertencente à classe de serinas hidrolases, a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável por

catalisar a hidrólise da substância neurotransmissora acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares. Nestas sinapses, a ACh atua como um neurotransmissor, um elemento que está no neurônio e que ajuda na passagem de informação de um neurônio para o outro. Conforme explicam Barreto et al. (2020), a inibição desta enzima no interior do sítio ativo provoca perda do controle muscular e pode acarretar a morte do organismo devido a falência do sistema nervoso central (SNC).

Portanto, torna-se notório a relevância de estudos para avaliar a influência dos contaminantes emergentes nos compartimentos ambientais. Com a ausência de legislações eficientes e de monitoramentos, faz-se necessário realizar estudos mais aprofundados para quantificar, avaliar os efeitos dos poluentes emergentes como os hormônios presentes nos ambientes aquáticos e possíveis alterações desse contaminante em processos bioquímicos.

Levando em consideração esses aspectos, o presente estudo tem como objetivo principal avaliar o grau de toxicidade da progesterona sintética para a espécie *Oreochromis niloticus*, a fim de avaliar a atividade das enzimas catalase (CAT) e glutatona-S-transferase (GST) nas brânquias e nos fígados e da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro dos organismos testados.

## 2. Materiais e Métodos

O presente estudo foi realizado no laboratório de toxicologia ambiental (LABTOX), pertencente ao Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) na cidade de Lages, Santa Catarina, Brasil. Referente ao uso de animais para a pesquisa, utilizou-se os princípios éticos e leis estabelecidos pelo Código de Ética da Universidade.

### 2.1 Aclimação dos peixes

As espécies de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram adquiridas através de um criadouro de peixes da região serrana de Santa Catarina. Após a chegada no laboratório, os exemplares foram aclimatados durante 14 dias em um aquário de vidro (Figura 1) com aeração mecânica constante, temperatura ambiente de 25° C e alimentados diariamente. Esta alimentação foi composta por rações especializadas para alevinos e diariamente os reservatórios passavam por uma limpeza total ou parcial pelo método de sifonagem para manter a condição ideal do ambiente.

**Figura 1** – Aclimação dos exemplares submetidos a aeração mecânica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

## 2.2 Exposição das espécies à progesterona

Para os testes, os peixes foram transferidos para 5 aquários de vidro, sendo que foram colocados 6 espécimens em cada meio com uma quantidade de 10 L de água e aeração mecânica constante. Em relação ao composto utilizado, consistia no fármaco Microvlar® usado como método contraceptivo de baixa dose. Cada drágea compreendia a combinação de dois hormônios femininos: 0,15 mg de levonorgestrel e 0,03 mg de etinilestradiol.

Para as concentrações finais, foi obtida uma solução mãe com as pílulas de progesterona de aproximadamente 1,95 mL.L<sup>-1</sup>. Posteriormente, realizou-se cálculos para determinação do volume adicionado em cada meio e obtenção das concentrações finais utilizadas nos testes, resultando em concentrações de 200 µg.L<sup>-1</sup>, 400 µg.L<sup>-1</sup>, 600 µg.L<sup>-1</sup> e 800 µg.L<sup>-1</sup>, além do grupo controle.

## 2.3 Coleta dos tecidos

Após os espécimes de *Oreochromis niloticus* serem expostos por 96 horas ao contaminante, os peixes foram eutanasiados. O método de eutanásia escolhido consiste em uma incisão na cervical dos animais que serve para interromper a conexão entre o encéfalo e a medula espinhal. Seguidamente, realizou-se as coletas dos seguintes tecidos para determinação da atividade enzimática: brânquia, cérebro e fígado, os quais foram armazenados em eppendorf de 1,5 mL. Logo após, as amostras foram homogeneizadas em um agitador mecânico junto a uma solução tampão TRIS HCl 1M, pH igual à 8,0 e mantidas em um refrigerador a baixas temperaturas.

## 2.4 Atividade Enzimática

Para determinação da atividade enzimática dos biomarcadores da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) levou-se em consideração as enzimas acetilcolinesterase (AChE) para análise enzimática do tecido referente ao cérebro. Para as enzimas catalase (CAT) e glutathione-s-transferase (GST), os tecidos da brânquia e do fígado. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de emissão ultravioleta, modelo T70+ PG Instruments Ltd., embasado nos protocolos específicos para cada biomarcador.

### 2.4.1 Atividade Enzimática Acetilcolinesterase (AChE)

O método utilizado para determinação da AChE baseou-se no protocolo de Ellman et al. (1961) que consiste na determinação da taxa de hidrólise de iodeto de acetilcolina que gera um produto reacional, a tiocolina. Este produto da catálise enzimática, reage com o ânion 5,5-di-tio-2-nitrobenzenato (DTNB) resultando em um produto de coloração amarelada.

Para elaboração do procedimento aplicou-se 2 mL da substância fosfato monopotássico (0,1 M) em pH 7; 100 µL do reagente de cor DTNB; 100 µL do substrato iodeto de acetilcolina e 100 µL de amostra homogeneizada. Para a análise utilizou-se cubetas de polipropileno de 4 mL e foram realizadas as leituras no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 412 nm, para cada exemplar de tecido cerebral dos peixes. A atividade da enzima foi expressa em unidades de ACh por miligrama de proteína (µmol de ACh hidrolisada. mg de proteína<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>).

### 2.4.2 Atividade Enzimática Catalase (CAT)

Para determinação da CAT utilizou-se o protocolo de Beutler (1975), o qual determina a atividade enzimática por meio do consumo do peróxido de hidrogênio. Se utilizou para cada amostra 2 mL de solução

tampão de fosfato monopotássico (0,1 M) em pH 8; 20 µL amostra e 20 µL do peróxido de hidrogênio.

As leituras foram empregadas através de cubetas de quartzo de 4 ml por meio do espectrofotômetro com comprimento de onda de 240 nm para os tecidos das brânquias e fígado dos peixes. A atividade enzimática da catalase é expressa em unidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizado por miligrama de proteína (µmolde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizado. min<sup>-1</sup>. mg de proteína<sup>-1</sup>).

#### 2.4.3 Atividade Enzimática Glutaciona-s-transferase (GST)

O protocolo utilizado para determinação da atividade enzimática da GST baseou-se no método proposto por Keen, Habig e Jakoby (1976), que consiste no uso da solução tampão contendo 100 mM de 1-cloro-2,4-di-nitrobenzeno (CDNB), reagente de cor na reação de formação de tioésteres quando em contato com o tiol glutaciona reduzida (GSH).

Em cubetas de acrílico com 4 ml foram adicionados 1940 µL de tampão fosfato monopotássico (0,1M) em pH 7; 20 µL de glutaciona reduzida (GSH); 20 µL de amostra (homogeneizado); e 200 µL de CDNB. A leitura ocorreu por meio de espectrofotometria, para um comprimento de onda de 340 nm. As amostras foram realizadas para os tecidos das brânquias e fígado. A atividade da GST foi expressa em unidades de CDNB conjugado por miligrama de proteína (nmol CDNB conjugado. min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>).

#### 2.4.4 Proteínas

A determinação de proteínas totais tem como princípio de relativizar as equações propostas para a atividade enzimática dos biomarcadores. Ademais, essas proteínas no soro e líquidos biológicos tem a finalidade de obtenção de um conjunto colorimétrico. O método consiste no reagente de biureto juntamente com as soluções de sulfato de cobre, citrato trissódico, carbonato de sódio e hidróxido de sódio, reagindo com as proteínas da amostra, formando um complexo corado de cor azul, adequado à concentração proteica da amostra.

O procedimento consistiu na adição em cubetas de polipropileno de 4 mL sendo inseridas 2 mL do reagente de biureto; 50 µL da amostra; 2 mL do reagente de proteínas com 50 µL de água destilada, para formação do branco experimental; e 2 mL do reagente de proteínas totais com 50 µL do reagente de cor para formação da solução padrão. Realizou-se as leituras no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 545 nm acertando o zero com o branco. Posteriormente, obteve-se a medição final de proteínas totais expressas em mg.L<sup>-1</sup>.

#### 2.5 Análise Estatística

As análises estatísticas referentes aos resultados das atividades enzimáticas dos biomarcadores das leituras espectrais foram submetidas ao Teste de Levene para averiguar a homogeneidade das variâncias. Subsequentemente, realizou-se a Análise de Variância (ANOVA), o Teste de Dunnett como um complemento para o estudo da análise de variância e verificações de possíveis diferenças entre as amostragens com o grupo controle e posteriormente o Teste de Tukey. Todos os procedimentos estatísticos e confecções dos gráficos foram executados com o auxílio do software MS Excel®.

### 3. Resultados e Discussões

#### 3.1 Influência da progesterona em biomarcadores

No estudo as concentrações testadas para a progesterona foram de 0 para o grupo controle, 200, 400,

600 e 800  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Durante o teste de toxicidade, observou-se um elevado número de mortalidade no decorrer do tempo, totalizando em 14 espécies. Cabe ressaltar que a concentração de 800  $\mu\text{g.L}^{-1}$  foi letal para todos os organismos testados, sendo assim, esta concentração não será abordada ao longo do texto, visto que dos animais mortos não tem como realizar as análises dos biomarcadores. Já referente ao grupo controle foi o único recipiente sem mortalidade, diferente dos demais recipientes, onde todos sofreram alguma influência do composto.

Essa possível variação entre as concentrações gerou alterações fisiológicas nos exemplares, como: uma maior agitação entre as espécies, colapsos nervosos, além de uma elevada agressividade. De acordo com Hartley et al. (1998), em estudos com peixes *Oryzias latipes* para avaliar os efeitos das substâncias com atividade estrogênica, em concentrações do hormônio  $17\beta$ -estradiol de 4,0; 29,4 e 115,6  $\mu\text{g.L}^{-1}$  por 48 horas, aponta que também obteve alterações comportamentais entre as espécies testadas e uma elevada taxa de mortalidade (90%).

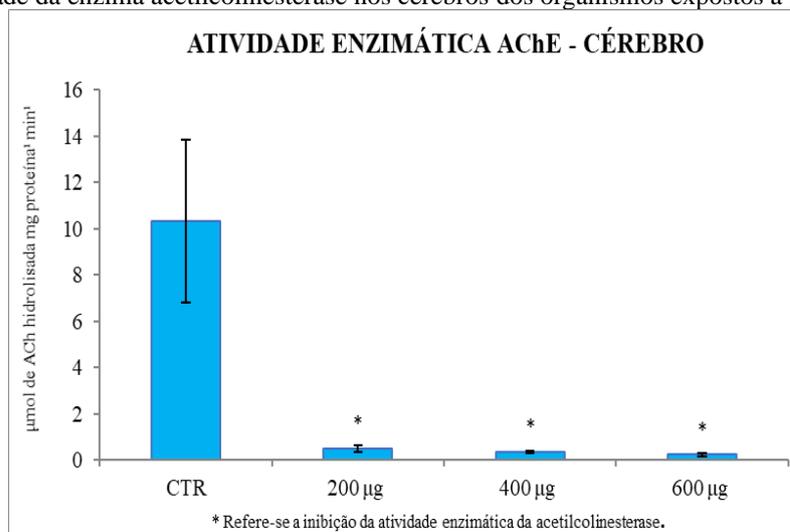
### 3.2 Atividade da AChE no cérebro

A neurotransmissão mediada pela acetilcolina é primordial para um correto funcionamento do sistema nervoso central. Conforme relatado por Golan (2009), a acetilcolina é um neurotransmissor primário de diversos sistemas neurais, notavelmente nas sinapses neuromusculares, no sistema nervoso autônomo através do cérebro. Logo, nessas ligações colinérgicas, a enzima pode causar a excitação ou inibição da sua atividade.

Desta forma, os valores correspondentes à atividade da acetilcolinesterase no cérebro das espécies testadas, demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos experimentais. Referente ao resultado obtido na ANOVA ( $p= 0,00012$ ), recorreu-se ao Teste de Dunnett relatando uma assimetria entre todas as amostragens com o grupo controle, além do Teste de Tukey também apontar essa diferença.

Os resultados obtidos estatisticamente, auxiliam na comprovação dos dados alcançados no estudo que representa uma diminuição da atividade da acetilcolinesterase em relação à contaminação da progesterona nos cérebros dos peixes analisados (Figura 2).

**Figura 2** - Atividade da enzima acetilcolinesterase nos cérebros dos organismos expostos a progesterona.



Conforme relatado por Petronilho, Pinto e Villar (2011) a inibição da atividade da AChE pode estar

relacionada a uma excitação do sistema colinérgico, interagindo com os receptores e excitando o terminal pós-sináptico, que transmitirá esta informação as demais sinapses. Além disso, Huggett et al. (1992) aponta que as alterações causadas com a inibição da AChE podem gerar consequências sérias a nível celular. Esta situação pode promover alterações nas respostas comportamentais, cognitivas e motoras, como observado neste estudo. Embora a concentração do grupo controle pareça estar muito estimulada, o dado está em conformidade com outros trabalhos, que indicam que as atividades dos tratados estejam muito inibidas em relação ao tratamento controle Huggett et al. (1992).

De acordo com Pessôa (2010) os contaminantes que interferem na transmissão colinérgica neural, podem causar tipos específicos de neurotoxicidade, inclusive levar a mortalidade das espécies. Desta maneira, nota-se que no referido teste houve uma alteração da atividade da enzima em relação ao contaminante, principalmente na concentração máxima de  $800 \mu\text{g.L}^{-1}$ , gerando um equivalente de 100% na taxa de mortalidade em relação as outras concentrações.

Além desta elevada taxa de mortalidade, foi possível verificar alterações comportamentais nos peixes, como uma maior agressividade, principalmente nas concentrações mais elevadas. Em estudos com as mesmas espécies, porém com o hormônio  $17\beta$ -estradiol (E2) livre, Silva et al. (2018) mostram que o contaminante promoveu um aumento na frequência de exibição dos comportamentos agressivos e interferiu na mortalidade dos animais.

Diante disso, Fensk (2017) afirma que em espécies como zebrafish expostas ao hormônio 17-alfa-etinilestradiol sofreram variações no comportamento dos espécimens, além de torná-los mais agressivos. Desta forma, aponta que esses distúrbios também ocorrem no sistema endócrino, alterando níveis de Estradiol e Testosterona. Sendo assim, Cunha et al. (2016) relatam que em meio hídrico os hormônios apresentam um impacto negativo no comportamento dos organismos analisados, podendo colocar em risco, não só os organismos estudados, bem como várias espécies e populações em desenvolvimento no meio aquático.

Posto isto, a inativação da AChE tem sido um campo importante no desenvolvimento de agentes farmacológicos. Conforme relatado por Sofinati (2018), em exemplares de zebrafish expostos as concentrações de hormônio sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol, explica que mesmo em baixas concentrações, essas substâncias afetaram parâmetros comportamentais e neuroendócrinos das espécies, e evidência que essas alterações podem promover efeitos negativos na reprodução e comprometer a manutenção da espécie no ecossistema.

Para Ribeiro (2014), o sistema nervoso é um dos tecidos mais atingidos pela ação dos hormônios. Sendo assim, estes contaminantes emergentes podem atuar na liberação e no metabolismo de diversos neuropeptídeos e neurotransmissores, influenciar a excitabilidade elétrica, na função sináptica e nas particularidades morfológicas dos neurônios.

Esse processo indica que os hormônios podem ativar ou inibir enzimas que agem sobre a síntese de neurotransmissores, como a acetilcolina. Diante disso, Sofinati (2018) relata que o  $17\alpha$ -etinilestradiol pode interferir na disponibilidade de colina e acetato para a síntese de ACh, podendo inibir a acetilcolinesterase. Logo, esta inibição causa um dano ao organismo em resposta à toxicidade do hormônio, interferindo no processo bioquímico da enzima.

Desta maneira, torna-se evidente que a presença de fármacos na água, destacando a progesterona usada no presente estudo, são compostos que inibem a atividade da acetilcolinesterase em espécies aquáticas. Posto isto, devido à grande relevância, torna-se de suma importância estudos toxicológicos voltados aos efeitos dos contaminantes emergentes nos ecossistemas.

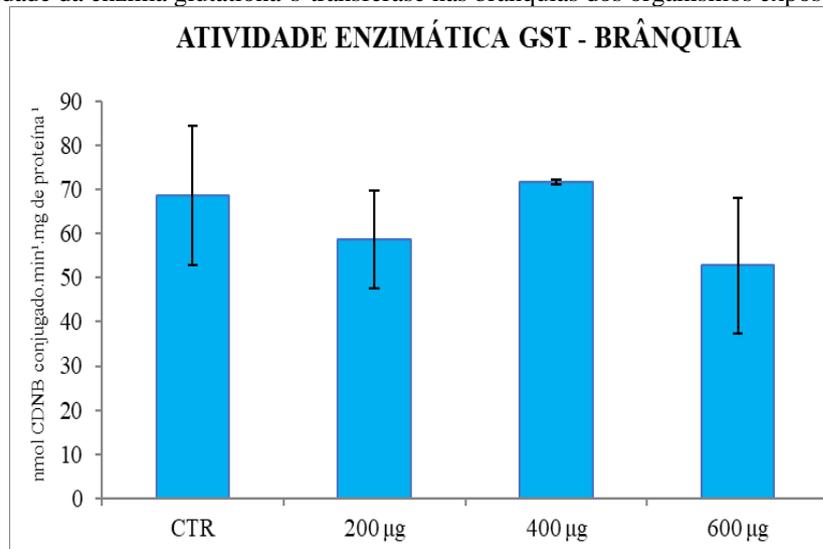
### 3.2 Atividade da GST e CAT nas brânquias

Os tecidos branquiais dos peixes são vulneráveis aos poluentes aquáticos uma vez que exibem uma

superfície de contato direto com a água, possibilitando prováveis contaminações. “As brânquias são órgãos envolvidos na respiração, equilíbrio osmótico e iônico, regulação ácido-base, excreção de resíduos nitrogenados e modulação de neurotransmissão em peixes” (Evans, Piermarini & Choe, 2005, p.177). Logo, as brânquias são um dos principais órgãos-alvo para a ação tóxica de poluentes.

Portanto, avaliou-se a atividade enzimática da GST e CAT nas brânquias dos exemplares expostos à progesterona. Os resultados estatísticos desta amostragem (Figura 3), exibem que não há diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos amostrais. Desta forma, foi obtido a avaliação da ANOVA ( $p=0,33$ ) para a GST e ( $p=0,09$ ) para a CAT. Posteriormente, recorreu-se ao Teste de Dunnett relatando uma pequena assimetria entre alguns resultados com o grupo controle em ambos os estudos enzimáticos, e ao Teste de Tukey que também apontou essas singelas diferenças.

**Figura 3** – Atividade da enzima glutationa-s-transferase nas brânquias dos organismos expostos a progesterona.

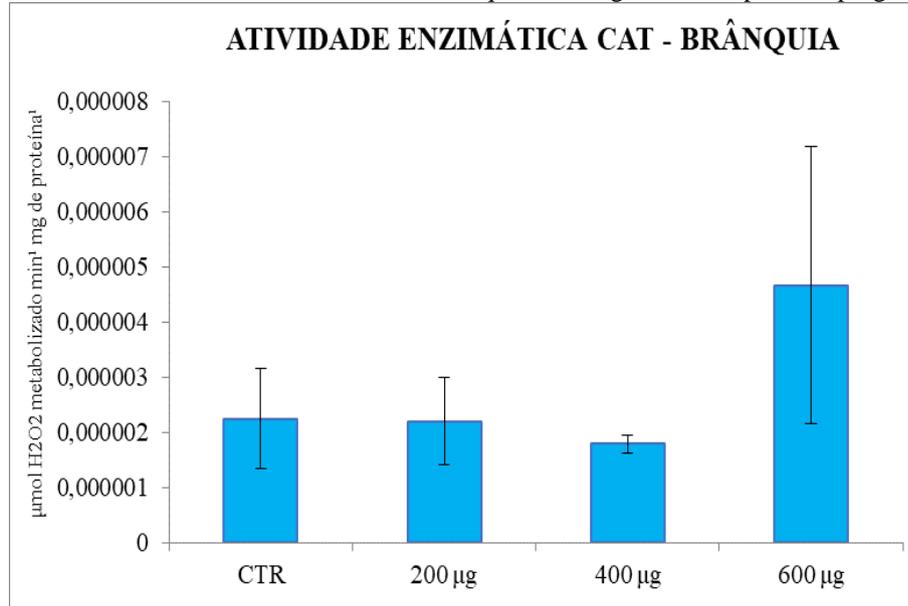


Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Na Figura 3, observa-se essas pequenas alterações entre as concentrações da atividade enzimática da GST nas brânquias dos peixes expostos ao hormônio. Portanto, perante esta contaminação a enzima glutationa-S-transferase consegue suportar a capacidade de resposta antioxidante do composto. Posto isso, é possível que a GST em níveis normais nas tilápias possa detoxificar o produto sem necessidade de grandes aumentos de expressão. Embora a concentração de  $600\mu\text{g/L}^{-1}$  esteja mais baixa em relação ao controle e as demais concentrações, não houve diferença estatística significativa. Porém, podemos considerar que há uma tendência à redução da atividade da enzima em concentrações mais elevadas de progesterona.

Wendt (2013), obteve resultados semelhantes ao estudo utilizando o hormônio  $17\alpha$ -metiltestosterona, que não mostrou diferenças nas respostas para a GST, relatando ser uma resposta positiva, pois significa que o composto utilizado não possui constituintes que alteram a atividade enzimática da enzima.

Sendo assim, os resultados no presente estudo não mostraram indução da GST, nestas condições de exposição. Logo, a progesterona sintética não afetou significativamente a produção metabólica que compete com os substratos da GST e não obteve grandes influências nos mecanismos de manutenção da homeostase do *Oreochromis niloticus*.

**Figura 4** – Atividade da enzima catalase nas brânquias dos organismos expostos a progesterona.

Em relação a Figura 4, para a atividade enzimática da CAT nos tecidos das brânquias, observa-se um aumento na atividade da enzima na concentração de 600  $\mu\text{g/L}^{-1}$  do composto. Desta maneira, Valavanidis et al. (2006) apontam que quando há um crescimento de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células, as defesas antioxidantes enzimáticas podem aumentar a sua atividade como uma resposta, a fim de eliminar ou neutralizar esses compostos. Em concordância, Ramos et al. (2014), relatam que um aumento da atividade da CAT pode ser resultado da geração de maiores quantidades de peróxido de hidrogênio, que por sua vez, é consequência de um aumento de EROs.

Para Cogo et al. (2009), a catalase refere-se a um componente de defesa antioxidante primário, e apresenta elevada atividade quando o organismo está sob estresse oxidativo, sendo considerada por este um importante biomarcador em ações de monitoramento. Moraes (2008) também afirma que uma elevação da atividade da CAT em nível tecidual, em peixes, pode significar uma possível resposta ao antioxidante do organismo.

Segundo Persch (2015), as enzimas mostram-se eficazes no combate às EROs quando tem sua atividade aumentada. Sendo assim, Oliveira et al. (2019) explicam que os altos níveis da atividade da CAT nas brânquias podem estar relacionados com o estresse ambiental e com o esforço para biotransformarem os poluentes. Da mesma forma que Ventura et al. (2002), sugerem que os níveis mais elevados de CAT estão relacionados as maiores taxas de desintoxicação dos compostos.

Desta maneira, os organismos tendem a responder aos contaminantes por meio do aumento da atividade de desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e biotransformação de xenobióticos. Sendo assim, é de suma relevância estudos voltados à análise da variação da atividade da catalase para perceber o impacto que estes contaminantes emergentes podem exercer sobre organismos aquáticos.

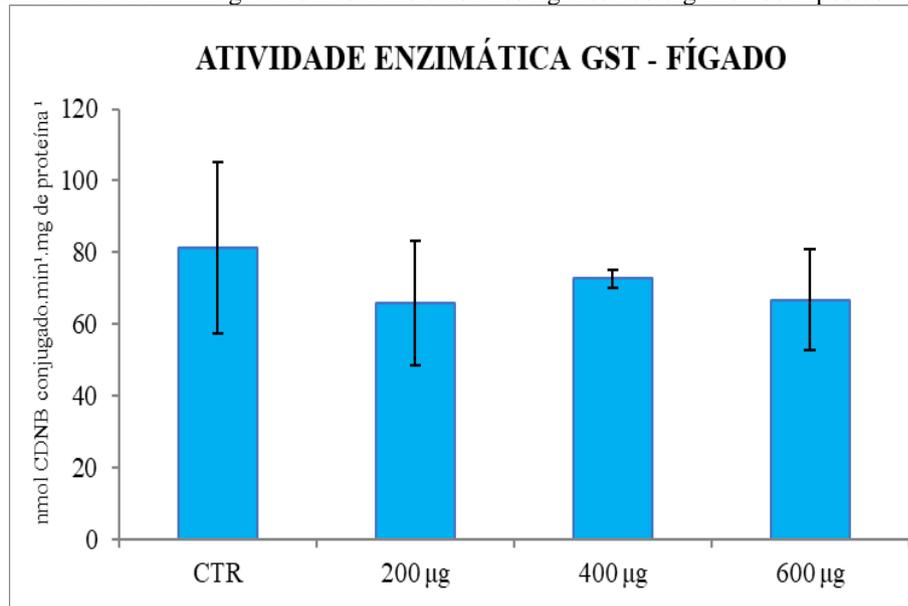
### 3.3 Atividade da GST e CAT no fígado

O fígado desempenha um papel importante em relação as funções vitais do metabolismo. De acordo com Ayadi et al. (2015), este órgão representa um principal aspecto de bioacumulação, de biotransformação e excreção de contaminantes nos peixes. Sendo assim, realiza funções essenciais como regulação, síntese de

proteínas, armazenamento de energia e excreção de xenobióticos.

Desta forma, determinou-se a atividade enzimática da GST e CAT para o fígado exposto ao contaminante. Referente aos dados estatísticos, os resultados mostraram que não há diferenças significativas entre as diferentes concentrações experimentais. Portanto, para a avaliação obtida na ANOVA ( $p=0,18$ ) para a GST e ( $p=0,13$ ) para a CAT, recorreu-se ao Teste de Dunnett relatando pequenas diferenças entre alguns resultados com o grupo controle em ambos os estudos, além do Teste de Tukey também apontar essas assimetrias entre os exemplares.

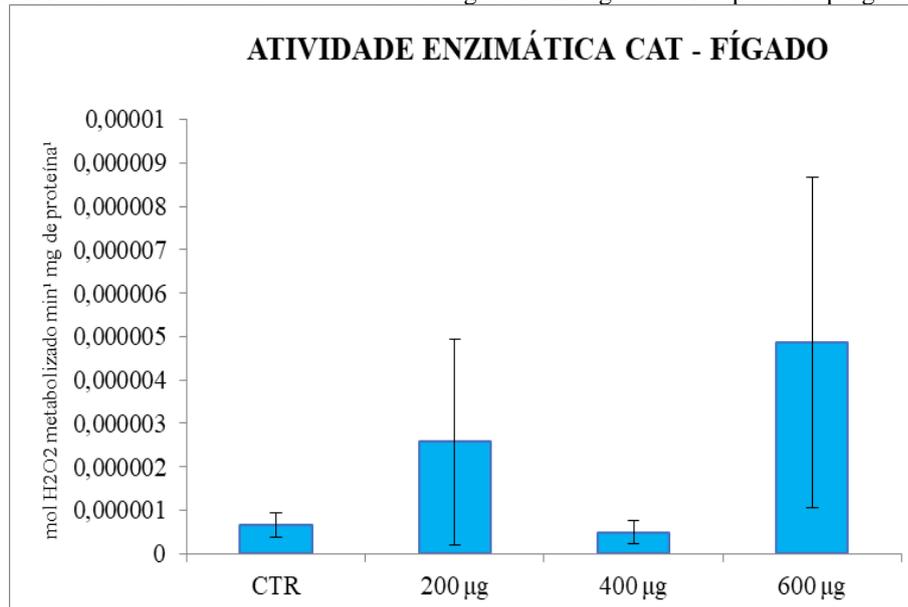
**Figura 5** – Atividade da enzima glutationa-s-transferase nos fígados dos organismos expostos a progesterona.



Observa-se na Figura 5, que não houve grandes alterações da atividade enzimática da GST no fígado dos exemplares. Portanto, neste estudo como não foram evidenciadas alterações na atividade da GST que possam indicar que, neste tecido, o metabolismo pró-oxidativo da progesterona afetou consideravelmente a atividade enzimática dos animais testados. Além disso, no trabalho de Oliveira et al. (2013) referente as espécies de zebrafish, expostas ao fármaco amoxicilina, em relação à atividade da GST também não sofreram alterações.

Em contrapartida, a tendência de aumento da atividade da GST nos primeiros dias de exposição, associada à resposta do metabolismo dos peixes, também foi reportada no trabalho de Yan et al. (2015). Esses autores enfatizam ainda que a atividade dessa enzima aumenta conforme o aumento dos fatores como o tempo de exposição e concentração de contaminante. Porém, após esse aumento, foi observado uma diminuição da atividade, e relatam que possivelmente ocorre devido ao consumo dos estoques de GST relacionado ao substrato e/ou à produção de metabólitos (decorrentes do processo de detoxificação).

Portanto, pode-se dizer que o composto não inibiu a atividade da GST no fígado. Sendo assim, nas concentrações utilizadas não houve grandes alterações quanto à atividade enzimática e/ou a GST consegue suprir as demandas deste composto. Porém, necessita-se de mais estudos voltados a essa área de pesquisa para verificar as alterações dos contaminantes emergente nos compartimentos aquáticos.

**Figura 6** – Atividade da enzima catalase nos fígados dos organismos expostos a progesterona.

A atividade da enzima CAT no fígado tem mostrado pequenas alterações de certa forma positiva em comparação ao contaminante. Além desse estudo, Nunes et al. (2015) apontam em seus testes que a atividade da CAT no fígado de *Gambusia holbrooki* e *Oncorhynchus mykiss* sofreu um aumento, quando expostas ao fármaco carbamazepina.

Martinez (2006) explica que, como as enzimas da catalase estão nos peroxissomos da maioria das células e estão envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos, é comum ocorrer alterações na sua atividade, principalmente no fígado. Para Santana et al. (2018) espécies animais, a exemplo da *Oreochromis niloticus*, são utilizadas no monitoramento de áreas poluídas. Durante os monitoramentos, a ocorrência de variações na atividade da catalase, pode tornar possível a confirmação do alto grau de poluição de determinada área.

Desta maneira, mesmo com concentrações altas de contaminações a catalase consegue se adaptar as condições e ativar seus mecanismos de defesa. Sendo assim, consegue suprir o dano causado pelo contaminante e, com isso, os resultados reforçam a importância do uso das enzimas detoxificantes como biomarcadores, os quais tem grandes potenciais para serem utilizadas na sinalização de possíveis focos de poluição ambiental.

## 5. Conclusão

Os resultados indicam inibição da atividade da acetilcolinesterase no cérebro de *Oreochromis niloticus*, sendo o resultado mais expressivo do trabalho.

As atividades da catalase e da GST não foram significativamente afetadas pelo hormônio testado nem nas brânquias e nem no fígado. Entretanto, foi observado que para a CAT no fígado houve aumento de sua atividade na concentração de 600 µg.L<sup>-1</sup>, isso significa que mesmo em um meio contaminado a enzima conseguiu ativar seus mecanismos de defesa contra o composto.

Posto isso, pode-se concluir que o uso de hormônios como agente tóxico, foi capaz de provocar alterações comportamentais e bioquímicas na espécie testada. Porém como o campo de estudo dos contaminantes emergentes atualmente ainda é escasso, no que diz respeito aos monitoramentos e legislações

pertinentes, faz-se necessário trabalhos que contemplem essa pesquisa mais a fundo avaliando estes contaminantes, principalmente a progesterona nos ecossistemas aquáticos.

## 5. Agradecimentos

Primeiramente, agradeço imensamente a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Indianara Fernanda Barcarolli por todo apoio na execução deste estudo, além da acadêmica e amiga Julia Pereira por não medir esforços para auxiliar nos testes realizados. Expresso minha gratidão à Deus, a minha família, ao meu namorado, aos meus amigos, aos meus professores, e a todas as pessoas que neste longo período acadêmico estiveram torcendo direta e/ou indiretamente pelas minhas conquistas, a vocês meu carinho, admiração e meu muito obrigada.

## 6. Referência Bibliográfica

Andrade, L. R. de. (2013). **Poluição do ambiente aquático por hormônios naturais e sintéticos: Um estudo em poços de Caldas/MG**. Dissertação de mestrado, Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino, São João da Boa Vista, SP, Brasil.

Ayadi, I., Monteiro, S. M., Regaya, I., Coimbra, A., Fernandes, F., Oliveira, M. M., Peixoto, F. & Mnif, W. (2015). Biochemical and histological changes in the liver and gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to Red 195 dye. **RSC Advances**, 5,87168-87178.

Barretto, M. L. M., Horta, D. F., Anselmo, F., Godinho, A. F., & Oliveira, A. A. F. (2020). Avaliação neurocomportamental e níveis de acetilcolinesterase cerebral em ratos expostos subcronicamente ao fipronil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 72 (1), 169-176.

Beutler, E. (1975). Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. **Grune & Straton**.

Bila, D.M. (2005). **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β-estradiol pelo processo de ozonização**. Tese de doutorado, Ciências em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Cogo, A. J.D., Siqueira, A.F., Ramos, A.C., Cruz, A.C. & Silva, A.G. (2009). Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadores de impactos ambientais. **Natureza online**, 7 (1), 37-42.

Cunha, D.L. da., Silva, S.M.C. da., Bila, D.M., Oliveira, J. L.M., Sarcinelli, P.N., & Larentis, A.L.(2016). Regulamentação do estrogênio sintético 17α-etinilestradiol em matrizes aquáticas na Europa, Estados Unidos e Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 32 (3). 1-5.

Dutra, P.M. (2016). **Hormônios em águas superficiais brasileiras: Uma avaliação preliminar sobre os possíveis riscos à vida aquática**. Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Ambientais, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

Ellman, G. L., Courtney, D., Andres, V.J., & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Pergamon Press Ltd**, 7(2), 88-95.

Evans, D.H., Piermarini, P.M., & Choe, K.P. (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas

Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiological Reviews**, 85, 97–177.

Fenske, L. (2017). **Hormônio estrogênio na água provoca alterações comportamental e desregulação endócrina em zebrafish**. Dissertação de mestrado, Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS, Brasil.

Ghiselli, G. (2006). **Avaliação das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Golan, D.E., Tashijan, A.H., Armstrong, E.J., & Armstrong, A.W. (2009). **Princípios de Farmacologia: a Base Fisiopatológica da Farmacoterapia** (2ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.

Hartley, W.R., Thiagarajah, A., Anderson, M.B., Broxson, M.W., Major, S.E., & Zell, S.I. (1998). Gonadal development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17  $\beta$ -estradiol. **Marine Environmental Research**, 46 (5), 145-148.

Huggett, R.J.; Kimerie, R.A.; Mehrie P.M., Jr, P.M., & Bergman, H.L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. (1992). CRC Press. Boca Raton, Flórida.

Ignácio, N. F. (2018). **Recuperação de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes a intoxicação aguda por fipronil**. Tese de doutorado, Biologia Aquática, Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

Jesus, T. B. De., & Carvalho, C. E. V.de. (2008). Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental em mercúrio (Hg). **Oecol. Bras.**, 12 (4), 680-693.

Keen, J. H., Habig, W. H., Jacoby, W. B. (1976). Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, 251(20), 6183-6188.

Martinez, C.B.R. (2006). **Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

Matthiessen, P., Thain, J.E., Law, R.J., & Fileman, T.W. (1993). Attempts to assess the environmental hazard posed by complex mixtures of organic chemicals in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, 26(2), 90-95.

Moraes, B.S. (2008). **Parâmetros toxicológicos em carpas (*Cyprinus carpio*) expostos a formulações comerciais de diferentes herbicidas em condições de lavoura de arroz e em laboratório**. Dissertação de mestrado, Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Nascimento, M.S. do. (2015). **Determinação de hormônios estrogênicos em água por cromatografia: uma revisão crítica de métodos analíticos**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

Nunes, B., Antunes, S. C., Gomes, R., Campos, J. C., Braga, M. R., Ramos, A. S. & Correia, A. T. (2015a). Acute Effects of Tetracycline Exposure in the Freshwater Fish *Gambusia holbrooki*: Antioxidant Effects, Neurotoxicity and Histological Alterations. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 68, 371-381.

Oliveira, S.R.S. de., Batista, W.S., Sousa, J.B.M., Noletto, K.S., Lima, I.M.A., Andrade, T.S.O.M., Cardoso, W.S., & Neta, R.N.F.C. (2019). Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 102, 802–810.

Oliveira, R., McDonough, S., Ladewing, J.C.L, Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A. & Domingues, I. (2013). Effects of oxytetracycline and amoxicillin on developing and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*), **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 36, 903-912.

Pessôa, P.C. (2010). **Avaliação dos efeitos fisiológicos e comportamentais causados por carbofuran em tilápia *Oreochromis niloticus***. Dissertação de mestrado, Biologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Persch, T.S.P. (2015). **Efeito dos herbicidas Roundup®, Primoleo® e Facet® sobre o metabolismo intermediário, o estresse oxidativo e a sobrevivência de *Rhamdia quelen* em diferentes fases de desenvolvimento**. Tese de doutorado, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Petronilho, E. C., Pinto, A.C., & Villar, J. D. F. (2011) Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, 3-14.

Raimundo, C.C.M. (2011). **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: Sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. Tese de doutorado, Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Ramos, A. S., Correia, A. T., Antunes, S. C., Gonçalves, F. & Nunes, B. (2014). Effect of acetaminophen exposure in *Oncorhynchus mykiss* gills and liver: Detoxification mechanisms, oxidative defence system and peroxidative damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 37, 1221-1228.

Ribeiro, M. S. (2014). **Análise estereológica de neurônios do corpo amigdalóide e avaliação comportamental de camundongos sob o uso de esteroides anabolizantes**. Dissertação de mestrado, Biociências aplicadas a saúde, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, MG, Brasil.

Santana, M.S., Yamamoto, F.Y., Neto, L.S., Neto, F.F., Machado, C.F.O., Ribeiro, C.A.O., Prodocimo, M.M. (2018). Diffuse sources of contamination in freshwaterfish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 149,173-181.

Santos, B.D., Silva, M.C.G., Santos, T.P., Soares, P.R.L., Silva, S.C.B.L., Cadena, M.R.S., & Cadena, P.G. (2016).Efeitos de hormônios esteroides de contraceptivos orais combinados sobre os parâmetros comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 68(2), 387-396.

Silva, M.C.G., Silva, S.C.B.L., Santos, T.P., Soares, P.R.L., Andrade, A.L.C., Cadena, M.R.S., & Cadena,

P.G. (2018). Avaliação do impacto causado pela disponibilidade de  $17\beta$ -estradiol livre ou complexado à  $\beta$ -ciclodextrina no ambiente aquático sobre *Oreochromis niloticus* (tilápia). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 70(1), 222-230.

Sofiatti, J.R.O de. (2018) **Efeitos neuroendócrinos e comportamentais do hormônio estrogênio em zebrafish**. Dissertação de mestrado, Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS, Brasil.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 64, 178-189.

Ventura, E.C., Gaelzer, L.R., Zanette, J., Marques, M.R.F. & Bainy, A.C.D. (2002). Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**, 54, 775-779.

Wendt, C.L.G.R. (2013). **Avaliação toxicológica do hormônio 17 alfa metiltestosterona em espécies aquáticas**. Tese de doutorado, Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., & Wang, J. (2015). Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 122, 54–60